

Indice

---



**Indice**

Abreviaturas	1
Abstract	5
1. Introducción	9
1.1. Primera parte: Epigenética	9
1.1.1. El Nucleosoma	9
1.1.2. Epigenética	10
1.1.3. Metilación del ADN	11
1.1.4. Enzimas implicadas en la metilación del ADN	12
1.1.5. Demetilación del ADN	14
1.1.6. Proteínas reclutadas por el ADN metilado	14
1.1.7. Modificaciones epigenéticas de las histonas	15
1.1.8. microRNA	17
1.1.9. Técnicas para el estudio de la metilación del ADN	17
1.1.10. Epigenómica	17
1.2. Segunda parte: Epigenética y Cáncer	19
1.2.1. Carcinogénesis	19
1.2.2. Epidemiología del cáncer	19
1.2.3. Metilación aberrante del ADN en cáncer	19
1.2.4. Modificaciones de las histonas en cáncer	21
1.2.5. miRNA y cáncer	21
1.2.6. Aplicaciones de la epigenética en el manejo del cáncer	21
1.3. Tercera parte: Virus	23
1.3.1. Papilomavirus	23
1.3.1.1. Tipos	23
1.3.1.2. Genoma	24
1.3.1.3. Ciclo vital del HPV	26
1.3.1.4. Transcripción	27
1.3.1.5. Replicación del genoma viral	28
1.3.1.6. Regulación de la replicación	28
1.3.1.7. Integración del ADN	29
1.3.1.8. Transformación	29
1.3.1.9. Proteína E6	30
1.3.1.10. Proteína E7	31
1.3.1.11. Proteína E5	32
1.3.1.12. Proteína E1	32
1.3.1.13. Proteína E2	32
1.3.1.14. Proteína E4	32
1.3.1.15. L1 y L2	33
1.3.1.16. Región reguladora	34
1.3.1.17. Vacuna contra el Papilomavirus Humano	34
1.3.1.18. Patogénesis de los papilomavirus	34
1.3.1.19. Cofactores	35
1.3.1.20. Cambios epigenéticos en la neoplasia cervical	35
1.3.2. Epstein-Barr Virus	36
1.3.2.1. Morfología del virión	38
1.3.2.2. Arquitectura genética	38
1.3.2.3. Ciclo infectivo	39
1.3.2.4. Expresión génica	39
1.3.2.5. Maduración y salida	39

1.3.2.6. Inducción de la transformación en linfocitos B por el EBV	40
1.3.2.7. Patología de los Herpesvirus Humanos	40
1.3.2.8. Patogénesis del EBV	41
1.3.2.9. La latencia de EBV	43
1.3.2.10. Persistencia del EBV latente en células infectadas	45
1.3.2.11. Fases de latencia en EBV	45
1.3.2.12. Replicación del ADN viral de EBV en fase latente	46
1.3.2.13. Epigenética y EBV	46
1.3.2.14. Uso del 5-aza en EBV	47
2. <i>Objetivos</i>	51
3. <i>Material y métodos</i>	55
3.1. Soluciones	55
3.2. Muestras tumorales	57
3.3. Cultivos celulares	57
3.4. Tratamiento con 5-aza-2-deoxicitidina	59
3.5. Extracción del ADN de células en cultivo	59
3.6. Análisis del estado de metilación de las islas CpG	59
3.6.1. Modificación del ADN con bisulfito sódico	59
3.6.2. Secuenciación del ADN modificado con bisulfito	60
3.6.2.1. PCR	61
3.6.2.2. Purificación del gel	62
3.6.2.3. Clonación	62
3.6.2.3.1. Ligación	62
3.6.2.3.2. Transformación	62
3.6.2.3.3. Minipreps	63
3.6.2.4. Análisis de las secuencias	63
3.6.3. PCR específica de metilación (MSP)	63
3.7. Análisis de la expresión proteica	64
3.7.1. Obtención de proteínas virales	64
3.7.2. Ensayo de Western Blot	64
3.7.2.1. Electroforesis	64
3.7.2.2. Transferencia	64
3.7.2.3. Inmunodetección con anticuerpos específicos	65
3.8. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina cuantitativo y medición por PCR cuantitativa a tiempo real (qChIP)	65
3.9. Extracción del ARN viral de líneas celulares	66
3.10. Ensayo de PCR de transcripción reversa (RT-PCR) semicuantitativa	67
3.11. Análisis de expresión de los genes virales por RT-PCR cuantitativa	67
3.12. Detección de los niveles de miR-BHRF1-1 por RT-PCR cuantitativa	68
3.13. Ensayo de interferencia con siRNA	68
3.14. Ensayo de FISH	69
3.14.1. Preparación de la muestra	69
3.14.2. Preparación de la sonda	69
3.14.3. Hibridación, desnaturalización e incubación	69
3.14.4. Lavados post-hibridación	69
4. <i>Resultados</i>	73
4.1. El metiloma de HPV16	73
4.1.1. Secuenciación genómica de bisulfito	73
4.1.1.1. Perfil de metilación en muestras cervicales humanas	73
4.1.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación	79
4.1.3. Cambios genéticos o nucleotídicos en el genoma de HPV16	79

---

4.1.4. Integración del genoma viral	80
4.1.5. Estudio de la dinámica de la metilación	81
4.1.6. Efecto del 5-aza-2'-deoxicitidina en la línea celular Caski	82
4.1.7. Interacción entre la proteína E2, su sitio de unión en URR y la expresión de las proteínas E6 y E7	82
4.1.8. Análisis del estado de metilación de la región L2 por MSP	84
4.2. El metiloma de HPV18	86
4.2.1. Secuenciación genómica de bisulfito	86
4.2.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación	89
4.2.3. Estudio de la dinámica de la metilación	90
4.2.4. Inducción de hipometilación en HPV18	91
4.2.5. Niveles de expresión de E6 y E7 en HPV18 después del tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina	92
4.2.6. Análisis del estado de metilación de la región E2 por MSP	94
4.3. El metiloma de Epstein-Barr virus	96
4.3.1. Secuenciación genómica de bisulfito	96
4.3.1.1. Metilación diferencial de los distintos promotores de EBNA	103
4.3.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación	103
4.3.3. Confirmación de los resultados obtenidos en secuenciación por MSP	104
4.3.4. Confirmación de la presencia del EBV integrado en las líneas celulares utilizadas	105
4.3.5. Efecto del 5-aza en la expresión de los genes del EBV	106
4.3.5.1. Expresión de los genes del EBV según el estado de metilación de sus promotores	107
4.3.5.2. Metilación en microRNAs	109
4.3.6. Metilación en ICF	110
4.3.7. Inducción del ciclo lítico	110
5. <i>Discusión</i>	115
5.1. El metiloma de los Papilomavirus Humanos	115
5.2. El metiloma del virus Epstein-Barr	119
5.3. Aplicaciones y perspectivas	127
6. <i>Conclusiones</i>	131
<i>Bibliografía</i>	135
ANEXO I-Análisis computacional	155
ANEXO II-Tablas de primers utilizados	157
ANEXO III-Indice de tablas y figuras	161



Abreviaturas

---



**Abreviaturas**

5-aza	5-aza-2'-deoxycytidine
aa	Aminoácido
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BL	( <i>Burkitt Lymphoma</i> ) Linfoma de Burkitt
Bp	( <i>base-pair</i> ) pares de bases de ADN
cADN	( <i>copy deoxiribonucleic acid</i> ) Acido desoxirribonucleico complementario
CIN	( <i>cervical intraepithelial neoplasia</i> ) neoplasia cervical intraepitelial
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ADN	( <i>deoxiribonucleic acid</i> ) Acido desoxirribonucleico
ARN	( <i>Ribonucleic acid</i> ) acido ribonucleico
DNMTs	( <i>ADN methyltransferases</i> ) ADN metiltransferasas
ADNsa	( <i>deoxiribonuclease</i> ) desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxi nucleótidos trifosfato
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
HDACs	( <i>histone deacetylases</i> ) histona deacetilasas
HMT	( <i>histone methyltransferases</i> ) histona metiltransferasa
HPV	( <i>human papiloma virus</i> ) papiloma virus humano
ICF	Síndrome de Inmunodeficiencia-Inestabilidad cromosómica y Anomalías faciales
IgG	Inmunoglobulina G
IFN	Interferón
Kb	Kilobase
LCL	( <i>lymphoblastoid cell lines</i> ) Línea Celular Linfoblastoide
MBD	Proteína de unión a ADN metilado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
MGMT	0-6 metilguanina-ADN-metiltransferasa
MSP	PCR específica de metilación
m/v	Relación masa/volumen
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	( <i>Polymerase chain reaction</i> ) reacción en cadena de la polimerasa
PTLD	( <i>Post Transplant Lymphoproliferative Disorder</i> ) Desorden Linfoproliferativo Post-Transplante
Rb	Retinoblastoma
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	(real time PCR) PCR en tiempo real
SAM	S-Adenosil metionina
SDS-Page	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
URR	( <i>upstream regulatory region</i> ) region reguladora del HPV
v/v	Relación volumen/volumen



Abstract

---



---

## ***Abstract***

### Background

Epigenetics of human cancer is an area of emerging research due to a growing understanding of specific epigenetic pathways and rapid development of detection technologies. Aberrant promoter hypermethylation is a prevalent phenomenon in human cancers. The best known epigenetic change in cancer is tumor suppressor genes inactivation by DNA hypermethylation due to the increased activity or deregulation of DNA methyl transferases. Increasing evidence also reveals that viral genes are one of the key players in regulating DNA methylation.

Worldwide, it has been estimated that viral infection is linked to about 15% of cancer cases. Since only a minority of human tissues affected with these viruses inevitable progress to cancer, this association is very intriguing. Thus, the molecular reasons why the infection is controlled in some cases or instead progresses to subsequent stages of tumorigenesis are largely unknown. Methylation of the viral genome appears to play a crucial role in many aspects including the regulation of viral gene expression, escape of infected cells from immune surveillance and the resistance of infected tumor cells to antiviral compounds. For the first time, the complete DNA methylomes in the mayor virus associated with human cancer -Papillomavirus and Epstein Barr- are described in this thesis. These findings might provide important clues for a better understanding of the puzzling association between cancer and viral infections.

### Methods and Findings

Using bisulphite genomic sequencing of multiple clones, which allow performing a systematic DNA hypermethylation analysis, we have obtained the DNA methylation status of every CpG dinucleotide present in the genome of the Human Papilloma Viruses 16 and 18, and in all the transcription start sites of the Epstein Barr virus. The samples analyzed here were associated with infectious diseases (such as infectious mononucleosis) and human tumours (cervical, nasopharyngeal, and lymphoma).

We have also analyzed the active changes in the viral DNA methylome and their functional relevance in the natural history of the disease.

The DNA methylomes presented here provide evidence of the dynamic nature of the epigenome in the evolution of tumorigenesis.

### Conclusions

The results obtained in this thesis indicate that the DNA methylome of the above mentioned viruses evolves from an unmethylated to a highly methylated genome in association with the progression of the disease, from asymptomatic healthy carriers, through chronically infected tissues and premalignant lesions, to the full-blown invasive tumour. The observed DNA methylation changes have a major functional impact in the biological behaviour of the viruses.

These data also provide a proof of principle for the importance of sequencing complete DNA methylomes of other organisms involved in human diseases, and of human healthy cells as well.

The study of epigenetic changes should provide a global view of gene profile in cancer, and epigenetic markers could be used for early detection, prognosis, and therapy of cancer.

Introducción

---



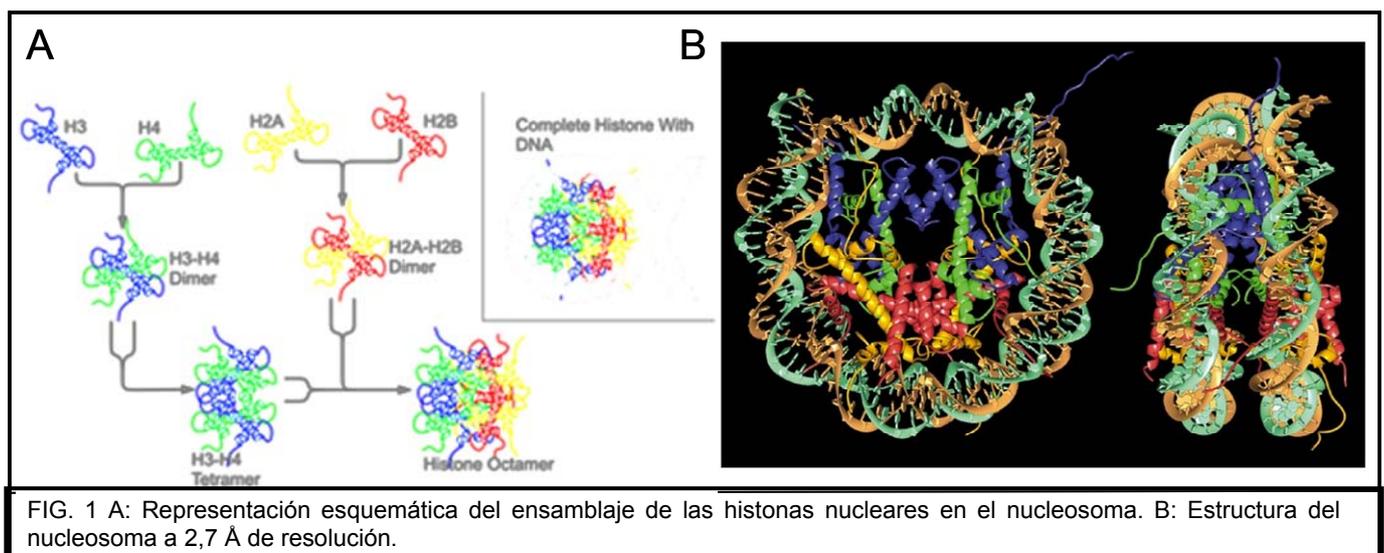
## 1. Introducción

Esta introducción se divide en tres partes: en la primera se revisan los aspectos generales de la epigenética, en la segunda se profundiza en la relación de la epigenética con el cáncer, y en la tercera se introduce a los virus asociados a cáncer objeto de estudio en esta tesis.

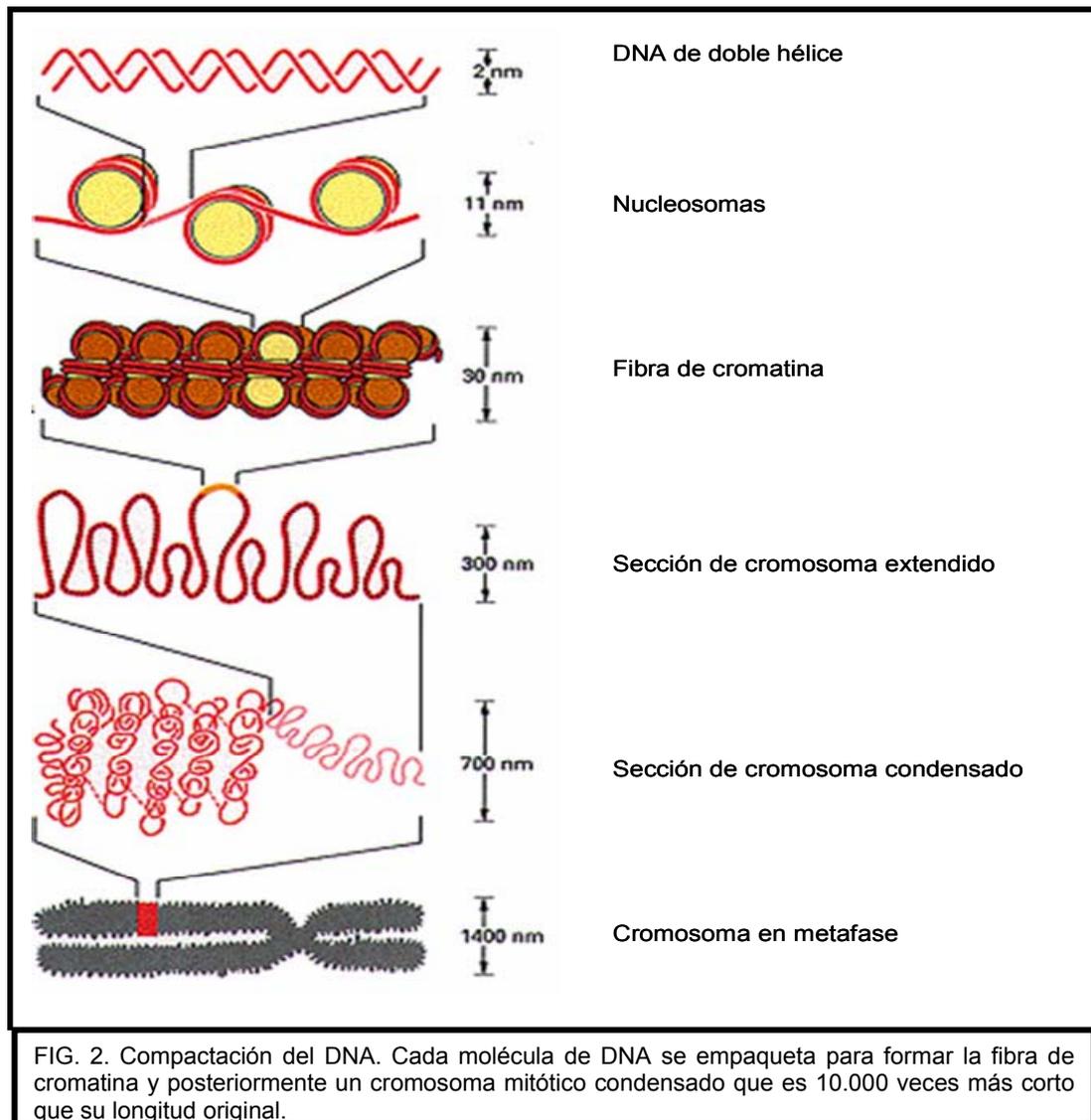
### 1.1. Primera Parte: Epigenética

#### 1.1.1. El nucleosoma

El ADN genómico de las células eucariotas se condensa y organiza en una estructura denominada cromatina en la cual interacciona con ciertas proteínas, entre las que se destacan las histonas. El nucleosoma, descrito originalmente por Kornberg en 1974, constituye la unidad fundamental y esencial de esta cromatina y está constituido por un núcleo proteico formado por un octámero de histonas. Este octámero incluye dos copias de la histona tipo H2A, dos de la H2B, dos de la H3 y dos de la H4, dando lugar a lo que se conoce como “*core*” alrededor del cual se dispone el ADN (FIG. 1).



Entre dos nucleosomas consecutivos existe un fragmento de ADN asociado a la histona H1 (*linker*) que conecta cada partícula del *core* con la adyacente. Cada octámero de histonas está rodeado por 1,7 vueltas de ADN bicatenario. La doble hélice de ADN enrollada sobre los sucesivos octámeros de histonas junto con el ADN linker, da un aspecto de “collar de perlas” cuando se observan bajo microscopio electrónico (FIG. 2)



### 1.1.2. Epigenética

La epigenética puede ser definida como el estudio de los cambios heredables en la expresión de los genes que no van acompañados por alteraciones en la secuencia de ADN y todos los mecanismos implicados en la regulación de las funciones de la cromatina. (Wolffe y Matke, 1999).

La regulación epigenética es esencial para asegurar la diferenciación celular de manera apropiada durante el desarrollo de los organismos complejos, que están constituidos por células que son genéticamente idénticas, pero estructural y funcionalmente diferentes. Los cambios epigenéticos globales son los que distinguen y definen los tejidos que conforman un organismo, evidentemente una neurona y un hepatocito tienen un fenotipo muy diferente, pese a tener exactamente la misma información genética. La epigenética también permite diferenciar entre células madre totipotenciales de células diferenciadas, y células en crecimiento de células senescentes (Ballestar y Esteller, 2005)

A pesar de ser heredables, los cambios a nivel epigenético son reversibles, por eso, la epigenética puede definirse también como un intermediario del ambiente con la genética, ya que

se observó que factores como por ejemplo la edad y la dieta provocan alteraciones en el epigenoma, que pueden producir enfermedades (Jaenisch y Bird, 2003, Liu, 2003). La importancia de la influencia de estos factores externos sobre la epigenética se demostró en gemelos homocigóticos, que a pesar de ser genéticamente idénticos, presentan diferente susceptibilidad a enfermedades en función de los hábitos de vida y el ambiente (Fraga, 2005) Las alteraciones en el funcionamiento normal de la maquinaria epigenética están involucradas en el desarrollo y progreso de ciertas patologías además del cáncer, como la arteriosclerosis, el lupus eritematoso sistémico, los síndromes ICF, ATRX (*Alpha-thalassemia X-linked mental retardation*) y el Rett (reviews: Zaina, 2005, Januchowski, 2004, Ehrlich, 2008, Tang, 2004, Kriaucionis y Bird, 2003).

### **Modificaciones Epigenéticas**

- Son químicamente estables
- Modifican el fenotipo y no el genotipo
- Son heredables
- Son reversibles
- Son modificadas por factores ambientales

Las células de los mamíferos tienen varias formas de control epigenético de la transcripción de los genes y la estructura de la cromatina: la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de las histonas, y la expresión de ARN no codificantes.

#### 1.1.3. Metilación del ADN

La metilación del anillo de citosina es la principal modificación epigenética en mamíferos, y se produce como resultado de la adición enzimática de un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5' de una citosina (Doerfler, 1983) (*FIG. 3*).

En mamíferos, las principales dianas de metilación son las citosinas que van seguidas de guaninas, los denominados dinucleótidos CpG, aunque también se describió metilación en secuencias CpA y CpT, pero en menor frecuencia.

Los dinucleótidos CpG presentan una distribución característica en el genoma, encontrándose agrupados en regiones que comprenden el 1-2% del genoma total, denominadas "islas CpG", que generalmente coinciden con los sitios promotores de los genes, aunque pueden llegar hasta el primer exón e incluso a veces hasta el primer intrón. Aproximadamente el 60% de los genes humanos están asociados a una isla CpG (Antequera, 1993). También es frecuente encontrar estas regiones ricas en di nucleótidos CpG en secuencias repetitivas satélites y centroméricas (Baylin, 2001, Esteller, 2002).

En el genoma de una célula normal, aproximadamente el 70-80% de los dinucleótidos CpG que no están asociados a una isla se encuentran metilados, incluyendo a los que se encuentran en el interior de los genes, las regiones intergénicas y los elementos repetitivos (Ehrlich, 1982). Sin embargo, a excepción del cromosoma X inactivo de las hembras en mamíferos y los genes implicados en la impronta genética, las llamadas islas CpG parecen estar protegidas de dicha modificación (Bird, 2002).

Cuando la metilación del ADN está presente en las regiones promotoras, está directamente relacionada con la represión transcripcional. La metilación del ADN se asocia a la

cromatina que no se transcribe, principalmente las secuencias repetitivas (por ejemplo las *Alu*), cromosoma X inactivo y genes que intervienen en el proceso de la impronta (*imprinting*). El *imprinting* se refiere a la metilación diferencial que ocurre en uno de los alelos ya sea materno o paterno y que establece el patrón de expresión de un determinado gen, por ejemplo *Igf2* y *H19* (Reik, 2001). Para mantener los niveles de expresión génica equilibrados, las hembras de mamíferos deben inactivar uno de sus cromosomas X, lo cual se hace mediante la metilación del mismo (Goto, 1998). El silenciamiento de este cromosoma se produce en fases tempranas de la embriogénesis y se mantiene así silenciado durante toda la vida del organismo.

La mayor parte del ADN metilado en humanos pertenece a regiones no codificantes de genoma, y que se replican con posterioridad al ADN no metilado (Bird, 1999). Por otro lado, este mecanismo estaría implicado también en evitar la transcripción de las secuencias repetitivas, endoparasíticas o trasposones, potencialmente dañinas para el genoma celular, de modo que la metilación en este caso actúa como mecanismo de defensa para conservar la integridad genómica y la estabilidad cromosómica cuando está localizada en las regiones pericentroméricas (Okano, 1999).

En mamíferos, los patrones de metilación se establecen durante el desarrollo embrionario. Inmediatamente después de la fertilización, ocurre una demetilación total en el ADN del ovocito y el espermatozoido. Después de la implantación, la metilación *de novo* instaaura los patrones de metilación normal esenciales para el desarrollo y la diferenciación de los distintos linajes celulares del embrión (Bird, 2002, Morgan, 2005).

#### 1.1.4. Enzimas implicadas en la metilación del ADN

Las enzimas responsables de la metilación del ADN son las denominadas metiltransferasas de ADN (DNMT), que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (FIG. 3). Hasta el momento, se describieron 5 DNMTs en mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L. Todas comparten un dominio C-terminal muy conservado y una porción N-terminal variable (Bestor, 2000). Entre ellas, solo DNMT1, DNMT3a Y DNMT3b tienen actividad metiltransferasa demostrada en mamíferos (Okano, 2002).

La DNMT1 tiene un peso molecular de 184 kDa, es de expresión ubicua y asociada al ciclo celular, aumentando la misma en la fase S, siendo reclutada por el antígeno de proliferación celular (PCNA) a los sitios de replicación. Es la principal responsable en mamíferos de mantener los patrones de metilación celular tras la replicación (Fuks, 2005), por eso se la conoce como DNMT de mantenimiento, propagando los patrones de metilación preexistentes, al tener mayor afinidad frente a sustratos hemimetilados.

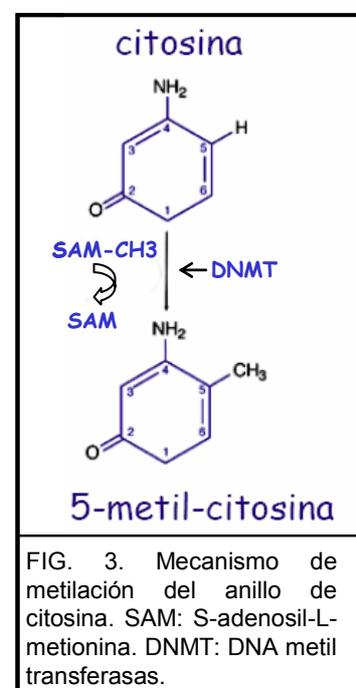


FIG. 3. Mecanismo de metilación del anillo de citosina. SAM: S-adenosil-L-metionina. DNMT: DNA metil transferasas.

La inhibición de DNMT1 suprime la tumorigénesis *in vitro* e *in vivo* (Laird, 1995) pero en células que carecen de DNMT1, la pérdida de metilación no es tan pronunciada como podría esperarse si esta fuera la única enzima responsable del mantenimiento de la metilación (Espada, 2004)

Algunos virus son capaces de interactuar con DNMT1 a través de sus proteínas, como por ejemplo el antígeno T de SV-40, que es capaz de aumentar los niveles de ARN y proteína de DNMT1, llevando a un aumento en la actividad metiltransferasa y de la metilación genómica (Slack, 1999). De forma similar, la infección con HIV-1 aumenta la expresión y la actividad de DNMT1, llevando a hipermetilación incluso del promotor del IFN- $\gamma$  (Mikovits, 1998). Además de esto, otros estudios demostraron el aumento en la metilación en determinados promotores en células infectadas con virus tumorigénicos, tales como HTLV-1, EBV y SV-40 (de Bustros, 1988).

La DNMT2 contiene 391 aminoácidos, demostró baja actividad catalítica *in vitro* (Hermann, 2003) y los ratones que carecen de esta enzima se desarrollan sin problemas aparentes (Okano, 1998). La actividad metiltransferasa de DNMT2 parece estar mas involucrada en la metilación de tARN, habiéndose demostrado que metila al tARN encargado del transporte del ácido aspártico (Goll, 2006)

### **Dominios de la Cromatina**

•**Eucromatina:** descondensada, representa los loci transcripcionalmente activos, replica tempranamente.

•**Heterocromatina:** altamente compactada, ADN silenciado, replica tardíamente. Subclasificada en:

•**Heterocromatina pericentromérica** o constitutiva, enriquecida con 3meK9H3, meK27H3 y 3meK20H4.

•**Heterocromatina facultativa**, puede convertirse en activa, presencia de 3meK27H3, 2meK9H3 y meK20H4.

En cuanto a DNMT3a y 3b, se demostró que estas enzimas se expresan principalmente durante el desarrollo embrionario, manteniendo un nivel de expresión relativamente baja pero ubicuo en tejidos adultos. Ambas poseen actividad metiltransferasa *de novo*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El síndrome ICF (Immunodeficiency-Centromeric instability-Facial abnormalities) se asocia a una mutación en DNMT3b. En estos pacientes, las células somáticas presentan hipometilación pericentromérica en los cromosomas 1 y 16, con importantes alteraciones en estas regiones (Maraschio, 1988, Xu, 1999)

La DNMT3L tiene un dominio catalítico metiltransferasa truncado, lo que la convierte en inactiva enzimáticamente. A pesar de esto, DNMT3L está involucrada en la represión epigenética al reclutar deacetilasas de histonas (HDACs) hacia promotores metilados (Aapola, 2002), estimular la actividad DNMT3a (Chen, 2002) y estimular la actividad de DNMT3a y 3b de ratón *in vitro* (Gowher, 2005).

Se sabe que existen interacciones entre todas las DNMTs, y que podrían cooperar entre sí de forma eficiente manteniendo los niveles de metilación, o expandiendo la misma a nuevos sitios del ADN.

Además, las DNMTs pueden contribuir a la formación de la heterocromatina mediante mecanismos diferentes a la metilación. Se sabe que las DNMTs interactúan con proteínas represoras, como las HDACs y las metiltransferasas de histonas (HMTs), dirigiéndolas hacia los promotores metilados (Baylin, 2001, Fuks, 2001)

#### 1.1.5. Demetilación del ADN

El establecimiento de los patrones de metilación tiene lugar durante el desarrollo embrionario y es precedido de la demetilación global del genoma. Esta demetilación también ocurre durante el proceso de gametogénesis (Bird, 2002). Se han descrito dos modelos para explicar este fenómeno: la demetilación pasiva y la demetilación activa.

La demetilación pasiva ocurre por inhibición o falta de acción de la metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1), ya sea por estar reclutada por algún cofactor o bien por la imposibilidad de unirse al ADN por presentar este último histonas acetiladas. Se produce cuando la célula avanza hacia una segunda ronda de replicación antes que la metilación de mantenimiento se haya completado. Esta forma de demetilación es lenta, y requiere de la progresión del ciclo celular.

En mamíferos, se propuso que la demetilación activa sucedía por varios mecanismos. De hecho, la existencia y la naturaleza de una demetilasa de ADN en mamíferos ha sido tema recurrente de controversia, irreproducibilidad e incertidumbre (Ooi, 2008). La demetilación activa necesita de enzimas o complejos que remuevan el grupo metilo de la citosina o bien que reemplacen el anillo completo de la metil-citosina por una citosina no metilada.

Recientemente, dos estudios publicados en *Nature* sugieren que el proceso de demetilación es llevado a cabo por las mismas enzimas que lo metilan: DNMT3a y DNMT3b (Kangaspeka, 2008, Metivier, 2008). Uno de ellos sugiere que estas enzimas poseen actividad deaminasa y propone que ambas están implicadas en una vía dinámica de metilación-demetilación que ocurre durante la transcripción de los genes.

Se propuso que MBD2, uno de los componentes de las proteínas MBD, podría reemplazar al grupo metilo por un átomo de hidrogeno (Bhattacharya, 1999), pero estos resultados no pudieron ser reproducidos por otros laboratorios (Wolffe, 1999).

Otro mecanismo propuesto involucra el proceso de reparación del ADN. Implica a las ADN glicosilasas, que cortarían la unión de la 5-metilcitosina con el ADN, siendo reemplazada luego por una citosina no metilada (Jost, 1997, Weiss, 1996, 1997), aunque esta demetilasa aun no ha podido ser clonada.

Vale la pena tener en cuenta que la demetilación asociada a la transcripción no requiere necesariamente de la actividad de una demetilasa. La unión de factores de transcripción a las secuencias tanto promotoras como no promotoras es suficiente para causar la demetilación en forma pasiva a través de la replicación.

#### 1.1.6. Proteínas reclutadas por el ADN metilado

El ADN metilado provoca el reclutamiento de distintas enzimas, factores de transcripción y represores. Además, el ADN metilado impide la unión de factores de transcripción, por ejemplo CREB (*Cyclic-AMP-Response-Element-Binding*), SP1, o proteínas involucradas en el establecimiento de la impronta génica, como por ejemplo CTCF o BORIS (*Brother Of the Regulator of Imprinted Sites*) (Jaenisch y Bird, 2003). De todas estas proteínas, destacan en importancia la familia de proteínas MBD (*methyl binding domain*), compuesta por 5 integrantes: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4. A excepción de MBD3, el resto se une a los dinucleótidos CpG metilados a través del dominio MBD. MBD4 participa en la reparación del ADN, y no en la represión transcripcional.

Estas proteínas tienen la capacidad de reconocer citosinas metiladas, a través de su dominio de unión. Excepto MBD4, el resto de las proteínas MBD median la interacción entre el ADN metilado y otros componentes de la cromatina debido a que son capaces de reclutar complejos represores que incluyen a las deacetilasas de histonas (HDAC) (Ballestar, 2001).

#### 1.1.7. Modificaciones epigenéticas de las histonas

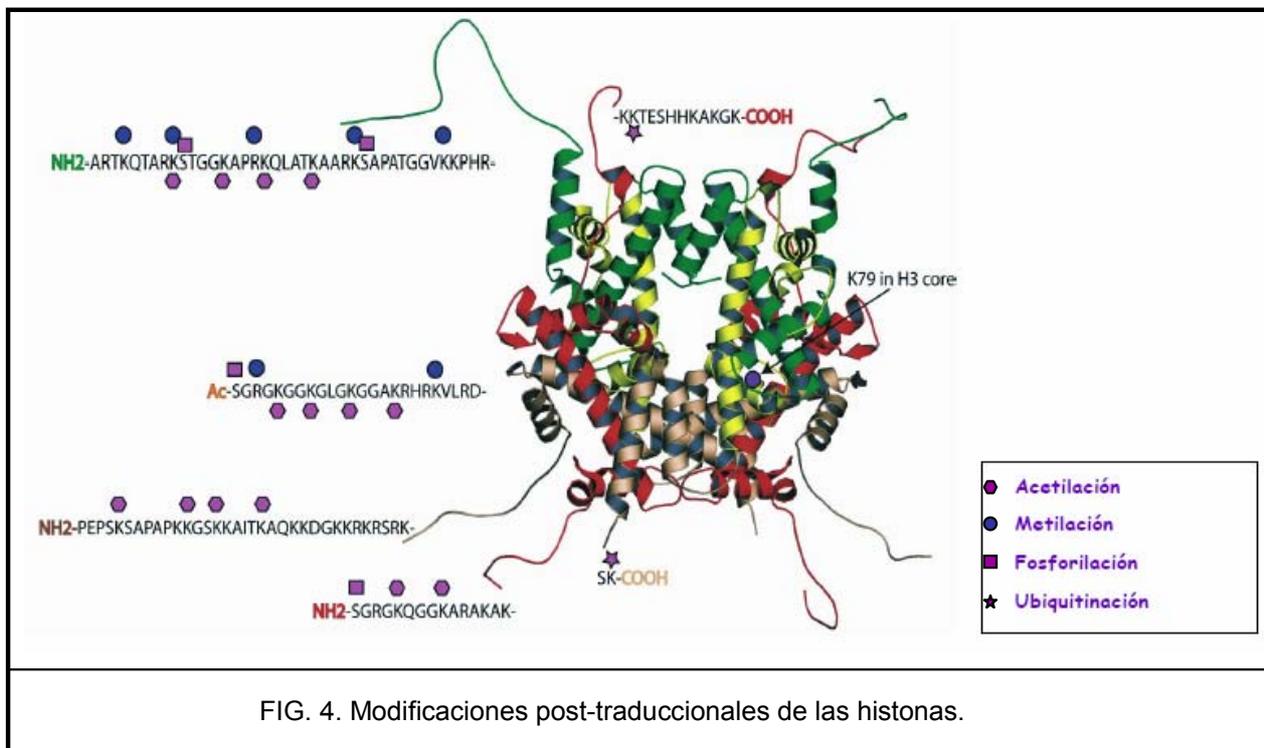
La metilación del ADN ocurre en el contexto de modificaciones químicas de las histonas. Estas proteínas, además de servir para empaquetar el ADN, participan en la regulación de la expresión génica.

La porción N-terminal de las histonas del *core* es flexible, rica en aminoácidos básicos y bastante conservada entre las células eucariotas. Como estas colas protruyen del nucleosoma, son susceptibles para interactuar con otras proteínas, como así también con enzimas que las modifiquen. Las modificaciones más comunes incluyen: acetilación de lisinas, metilación de lisinas y argininas, fosforilación de serinas y treoninas, ubiquitinación, sumoilación y biotinización de lisinas (FIG. 4).

En general la acetilación de lisinas esta asociada a activación transcripcional. Esta modificación es llevada a cabo por las enzimas conocidas como acetiltransferasas de histonas (*histone acetyl transferasas*, HATs), y es revertida por las deacetilasas de histonas (*histone deacetylases*, HDACs). La acetilación de lisinas influencia la interacción de las histonas con otras macromoléculas. Por un lado, la carga positiva de la lisina desaparece cuando se acetila, y de esta forma interfiere con el contacto entre la histona y el ADN, ARN u otras proteínas. Por otro lado, la acetilación representa un lugar de acoplamiento para proteínas que contienen regiones bromodominio, encargadas de la regulación de la transcripción.

La metilación de lisinas se produce tanto en heterocromatina (K9H3, K27H3 y K20H4) como en eucromatina (K4H3, K36H3 y K79H3), y a su vez pueden encontrarse mono, di o trimetiladas (Kouzarides, 2002). La metilación no altera la carga de la lisina, pero si incrementa su hidrofobicidad. Esta modificación es llevada a cabo por enzimas denominadas metiltransferasas de histonas (*histone methyl transferasas*, HMTs), que utilizan SAM (S-adenosil-L-metionina) como donante del grupo metilo. Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que la metilación de histonas era la modificación más estable, pero actualmente se describieron varias enzimas capaces de revertir esta modificación. La primera en describirse fue

la LSD1 (*lysine specific demethylase 1*), cuyo sustrato más habitual es la lisina 4 de H3 (Shi, 2004) y posteriormente se sumaron las proteínas con dominio JmjC, por ejemplo la JHDM1A y JMJD3, entre otras (Kubicek, 2004, Hong, 2007).



La metilación de argininas se relaciona tanto con represión como con activación transcripcional. La arginina puede metilarse en posición R8H3, R17H3 y R3H4. Hay descritas 7 PRMT (*protein arginine methyl transferases*), que también utilizan SAM como dador de grupo metilo.

La fosforilación de serinas y treoninas es una modificación asociada a procesos mitóticos y activación transcripcional. Es llevada a cabo por las enzimas MSK1/1 y RSK2, y en el caso de la fosforilación de la serina 10 en H3, está relacionada con la condensación mitótica de la cromatina (Wei, 1999).

Existen además variantes de las histonas clásicas, como la H3.3, H2AZ, H2ABbd o la H2A.X, que se localizan en regiones especializadas de la cromatina. A diferencia de las histonas canónicas, éstas no se sintetizan en la fase S del ciclo, y son incorporadas a la cromatina de forma independiente a la replicación del ADN.

Todas estas modificaciones junto con la metilación del ADN y la presencia de ARN no codificante actúan de forma controlada para regular la estructura de la cromatina y la expresión de los genes a través del ciclo celular. Todas ellas están interconectadas y dependen unas de otras para permitir a la célula almacenar y transmitir a la descendencia la información que no está codificada en el ADN.

A partir de esta idea, se propuso lo que se conoce como “código de histonas”, que plantea que las modificaciones de las histonas, actuando de forma combinada o secuencial en una o

varias histonas, son reconocidas por diferentes proteínas que determinan las funciones específicas derivadas de tales modificaciones. (Strahl y Allis, 2000)

#### 1.1.8. microRNA

Los microRNAs (miRNA) son unas moléculas pequeñas de aproximadamente 22 nucleótidos de ARN no codificante de cadena sencilla que reprimen la expresión génica. Esto lo llevan a cabo por degradación o inhibición de la traducción del ARN mensajero, también intervienen en procesos como la formación de heterocromatina centromérica.

Tienen un papel importante en la proliferación, rearrreglos genómicos, apoptosis y diferenciación celular (He, 2004, Miska, 2005, John, 2004). Muchas características únicas de los miRNAs, entre las que se cuentan su pequeño tamaño, la falta de colas poliadeniladas, y su tendencia a unirse a sus RNAm diana mediante secuencias parcialmente complementarias, los han convertido en un gran desafío a la hora de estudiarlos con más detalle. Se estima que aproximadamente un 30% de los genes son regulados por miRNA (Rajewsky, 2004).

#### 1.1.9. Técnicas para el estudio de la metilación del ADN

El ADN es una biomolécula muy dinámica, lo que se refleja en la gran diversidad y complejidad de los mecanismos que la regulan.

En la última década se desarrollaron múltiples abordajes para el análisis de la metilación. La secuenciación por bisulfito rápidamente se destacó como la favorita para el análisis de metilación del ADN, habiendo sido utilizada para la descripción del perfil de metilación en 3 cromosomas humanos en 12 tejidos diferentes (Eckhardt, 2006). Además de ésta, el estudio de genes concretos también se puede realizar con la técnica de MSP (PCR específica de metilación).

El análisis del metiloma es una herramienta muy importante para explorar y mejorar la comprensión de cómo funciona el genoma en la salud y en la enfermedad. La interpretación que se le pueda dar a la información epigenética y su integración con la información genética que ya se posee (Beck, 2008).

#### 1.1.10. Epigenómica.

Siguiendo la tendencia de los análisis a nivel global, el término epigenómica fue introducido para definir el estudio de los cambios epigenéticos en todo el genoma.

Fundamentalmente, la epigenómica estudia los efectos de la estructura de la cromatina incluyendo tanto la metilación del ADN, como las modificaciones covalentes de las histonas (Beck, 1999).

Posteriormente al éxito de la secuenciación del genoma humano, se generó un gran interés en caracterizar el epigenoma, que permitirá saber a ciencia cierta de que forma el genoma ejecuta la información que contiene para definir los distintos fenotipos (*Int. Symposium on Genome-Wide Epigenetics*, 2005).

En Europa se han formado dos consorcios internacionales alrededor de esta idea: por un lado el Proyecto Epigenoma Humano ([www.epigenome.org](http://www.epigenome.org)) establecido en 1999, tiene como

objetivo principal identificar, catalogar e interpretar los patrones de metilación del ADN a lo largo de todo el genoma y los perfiles de todos los genes humanos en los principales tejidos (Bradbury, 2004). Por otro lado, el Epigenome Network of Excellence ([www.epigenome-noe.net](http://www.epigenome-noe.net)) establecido en 2004, tiene como objetivo el de proveer una vasta selección de recursos epigenéticos y ampliar la investigación epigenética a campos como la modificación de la cromatina, la dinámica de los nucleosomas, los ARNs no codificantes, *imprinting*, y generar mapas epigenómicos de células sanas y enfermas.

El desarrollo de estas plataformas proveerá, además de un campo novedoso para la investigación básica, aplicaciones inmediatas para el diagnóstico, nuevos enfoques en medicina para el tratamiento de enfermedades, una mejora en la comprensión de la influencia del ambiente y la nutrición en los seres vivos, así como también ampliará el conocimiento que se tiene sobre ciertas enfermedades neurológicas o procesos neurodegenerativos que se sabe tienen una gran influencia epigenética.

Pasaron ya casi 60 años desde el descubrimiento de la 5 metil citosina, y más de 25 desde que se sabe que la alteración en la metilación del ADN está relacionada con muchas enfermedades pero recién este año fue descrito el primer perfil de metilación (metiloma) de un organismo completo, el de *Arabidopsis thaliana* (Lister, 2008).

El epigenoma de una persona está muy influenciado por factores ambientales y nutricionales, lo que podría explicar el porque ciertas enfermedades como el cáncer aparecen mas frecuentemente con la edad.

Uno de los objetivos de estas redes es encontrar una firma epigenética asociada a determinadas enfermedades, basándose en el perfil de metilación de las CpG a nivel global. Esto ayudara también a elucidar procesos complejos como la impronta, la inactivación del cromosoma X y enfermedades multifactoriales como las inmunitarias o el cáncer. Una de las primeras herramientas que deberían desarrollarse sería una base de datos epigenómica que integre todos los datos derivados de los estudios en ADN, ARN y proteínas (similar al GenBank) (Murrel, 2005). Los resultados generados en este trabajo aportan una base sólida para comenzar este tipo de estudios.

## 1.2. Segunda Parte: Epigenética y Cáncer

### 1.2.1. Carcinogénesis

El cáncer es una enfermedad en la que se alteran los procesos de regulación del crecimiento y división de la célula. Para que una célula normal se transforme en tumoral, los genes que regulan el crecimiento y diferenciación celular deben alterarse. La mayoría de los tumores presentan una gran variedad de funciones génicas alteradas, incluyendo la activación de oncogenes y el silenciamiento de genes supresores de tumores, lo que se traduce en un crecimiento celular descontrolado (Jones, 2002).

La carcinogénesis es el proceso a través del cual una célula normal escapa a los mecanismos de control de crecimiento y se divide de forma descontrolada. Las teorías más aceptadas suponen que la carcinogénesis incluye dos o más pasos, entre ellas destacamos la “Teoría de Berenblum” (1947) que propone que el cáncer es el resultado de dos etapas: la iniciación, provocada por una mutación y proliferación rápida debido a un agente iniciador; y la promoción, en la que un agente promotor genera cambios en el crecimiento, transporte y metabolismo celular.

Actualmente se acepta la teoría de Sell y Pierce, que expone que la mutación, iniciación y la transformación maligna ocurre en la célula progenitora o *stem cell*, debido a un bloqueo o detención de su maduración. Las mutaciones en células somáticas por el contrario no resultarían en cáncer, ya que son células maduras, con vida media corta y que habitualmente terminan en apoptosis antes que nuevas mutaciones puedan desdiferenciarlas (Sell, 2006).

### 1.2.2. Epidemiología del cáncer

El cáncer es la segunda causa principal de muerte natural, detrás de las enfermedades cardíacas (Jemal, 2005). Sin embargo, las muertes por enfermedades cardiovasculares están disminuyendo, mientras que las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer será la primera causa de muerte en los países desarrollados. A pesar de esto, debemos reconocer que los esfuerzos realizados en las investigaciones han producido un aumento en la supervivencia de los pacientes que sufren esta enfermedad.

### 1.2.3. Metilación aberrante del ADN en cáncer.

La epigenética del cáncer humano se ha convertido en un área de creciente investigación debido a la comprensión de las vías involucradas y al alto desarrollo de las nuevas tecnologías.

El desarrollo de los tumores es el resultado de la suma de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas, llevando a la pérdida del control necesario para mantener la homeostasis, lo que conduce a un crecimiento celular desregulado y anárquico

en el que se pierden los mecanismos de inducción de la apoptosis entre otras cosas. Algunas de

#### **Etiología del cáncer**

- Homonal
- Química
- Biológica**
- Radiación
- Hereditario

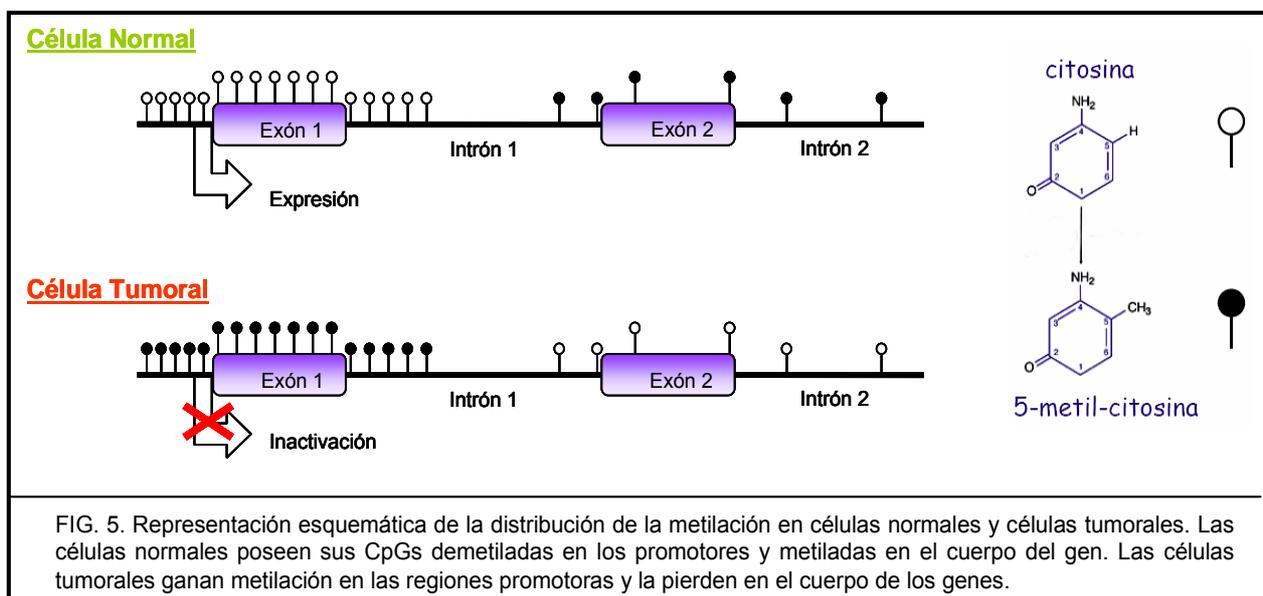
estas alteraciones pueden otorgarle a la célula tumoral ventajas selectivas para el crecimiento, ya sea adquiriendo resistencia a fármacos, o bien aumentando las señales positivas de crecimiento, mediante la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores (Bird, 2002).

La alteración epigenética asociada a cáncer mas estudiada es sin duda la metilación del ADN.

Existen 2 alteraciones principales que afectan a los patrones normales de metilación, y que se encuentran estrechamente relacionadas con la desregulación de la actividad metiltransferasa característica en los tumores (FIG. 5):

- Hipometilación global del genoma: principalmente en las regiones que se corresponden con el cuerpo de los genes y en secuencias repetitivas, que está relacionada con la inestabilidad cromosómica y reactivación de secuencias endoparasíticas (Alves, 1996, Bestor, 1996). Las anomalías cromosómicas que se asocian con hipometilación incluyen traslocaciones y deleciones entre otras.
- Hipermetilación en las islas CpG de regiones promotoras: se relaciona con el silenciamiento transcripcional del gen regulado por dicho promotor, en general supresores de tumores. Los genes inactivados por la hipermetilación de sus promotores igualan o incluso superan a aquellos inactivados por mutaciones puntuales en cáncer (Herman, 1994).

Además de estas 2 clásicas alteraciones, recientemente se demostró la inactivación de miRNA por metilación (Lujambio, 2007).



La metilación de las islas CpG de genes supresores tumorales en las distintas líneas celulares de un determinado tipo tumoral presentan un alto grado de similitud, existiendo un perfil de metilación específico para cada tipo de tumor (Paz, 2003). Esta característica también puede ser utilizada para determinar el origen del tumor, ya que también las neoplasias primarias siguen un patrón determinado de metilación de genes supresores de tumores (Esteller, 2001)

Las alteraciones epigenéticas, principalmente la metilación del ADN y la modificación de histonas, se reconocen actualmente como mecanismos adicionales que contribuyen al fenotipo maligno, siendo los patrones aberrantes de metilación del ADN una de las alteraciones moleculares encontradas más frecuentemente en las neoplasias humanas. Actualmente, existe un interés creciente en comprender los mecanismos moleculares que subyacen en estos cambios durante el desarrollo tumoral, puesto que cada vez existen más evidencias que muestran que estas alteraciones epigenéticas actúan junto con las alteraciones genéticas para conducir la tumorigénesis (Esteller, 2007, Li, 2005)

#### 1.2.4. Modificaciones de las histonas en cáncer.

Las modificaciones covalentes de las histonas también se alteran de manera particular en cáncer. La hipermetilación de promotores de genes supresores de tumor en las células cancerígenas se asocia con una combinación particular de marcas de histonas: deacetilación de H3 y H4, metilación de H3K9, trimetilación de H3K27 y pérdida de trimetilación de H3K4 (Ballestar, 2003, Jones, 2007). La monoacetilación de K16 y la trimetilación de K20 están reducidas, y se asocian con la hipometilación de las secuencias repetitivas en el ADN de las células tumorales (Fraga, 2005). Los patrones de acetilación se pueden alterar también por mutaciones en las enzimas encargadas de mantenerla, por ejemplo, HDAC2 se encontró mutada en carcinomas esporádicos con inestabilidad cromosómica y en pacientes con síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Roper, 2006).

En cuanto a la histona H4, se describió que pierde las formas monoacetiladas y trimetiladas (Fraga, 2005). Estos cambios aparecen de manera temprana y se acumulan durante el desarrollo del tumor.

#### 1.2.5. miRNA y cáncer.

Las alteraciones de los miRNA también están relacionadas con el desarrollo de neoplasias. Las islas CpG que regulan la expresión de miRNA también se metilan de forma aberrante, dando lugar a silenciamiento transcripcional que favorece el desarrollo de tumores.

En estudios recientes se demostró que los perfiles de expresión de estos miRNA eran diferentes en la célula normal comparado con la célula tumoral, e incluso diferían entre los distintos tipos de tumores (Chen, 2005, Calin, 2006, Lu, 2005). Una característica común en tumores es la activación de la ciclina CDK6 y se descubrió que uno de los mecanismos implicados podría ser el silenciamiento del miR-124a (Lujambio, 2007).

#### 1.2.6. Aplicaciones de la epigenética en el manejo del cáncer.

La metilación del ADN y las modificaciones de las histonas asociadas con el desarrollo y la progresión del cáncer tienen un uso clínico potencial.

Por ejemplo, para el diagnóstico precoz, puede ser útil la detección de hipermetilación en fluidos biológicos y suero (el gen GSTP1 en orina de pacientes con posible cáncer de próstata) (Esteller, 2008). Para el pronóstico, se pueden realizar perfiles de metilación tanto a nivel global como

específico de ciertos genes, así como también un mapa de las modificaciones de las histonas. A nivel predictivo en respuesta a ciertos tratamientos, por ejemplo el gen MGMT en pacientes con gliomas tratados con temozolomida. Otra aplicación es en el seguimiento de los pacientes, detectando hipermetilación en fluidos biológicos y suero como podría ser el caso de la metilación de p15 en la leucemia mieloide aguda (Esteller, 2008).

### 1.3. Tercera parte: VIRUS

#### **1.3.1. PAPILOMAVIRUS**

El virus del papiloma humano (HPV) es un miembro de la familia *Papillomaviridae*. El HPV puede inducir infecciones líticas, crónicas, latentes y de transformación, dependiendo de la célula huésped a la que infecte. De acuerdo al tejido susceptible, se los pueden dividir en HPV cutáneos o HPV mucosos. Los cutáneos infectan y replican en el epitelio escamoso de la piel produciendo verrugas. Los mucosos infectan y replican en membranas mucosas produciendo papilomas genitales, orales y conjuntivales e inducen proliferación epitelial. (Zheng, 2006, Villiers, 2004, Jung, 2004)

Morfológicamente hablando, el HPV es un virus pequeño, de 55nm de diámetro, no envuelto. Posee una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, cada uno de los cuales contienen al menos 2 proteínas de cápside: L1 y L2 (Jung, 2004, Baker, 1991) (FIG. 6).

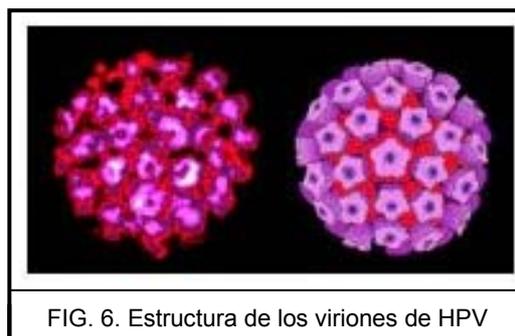


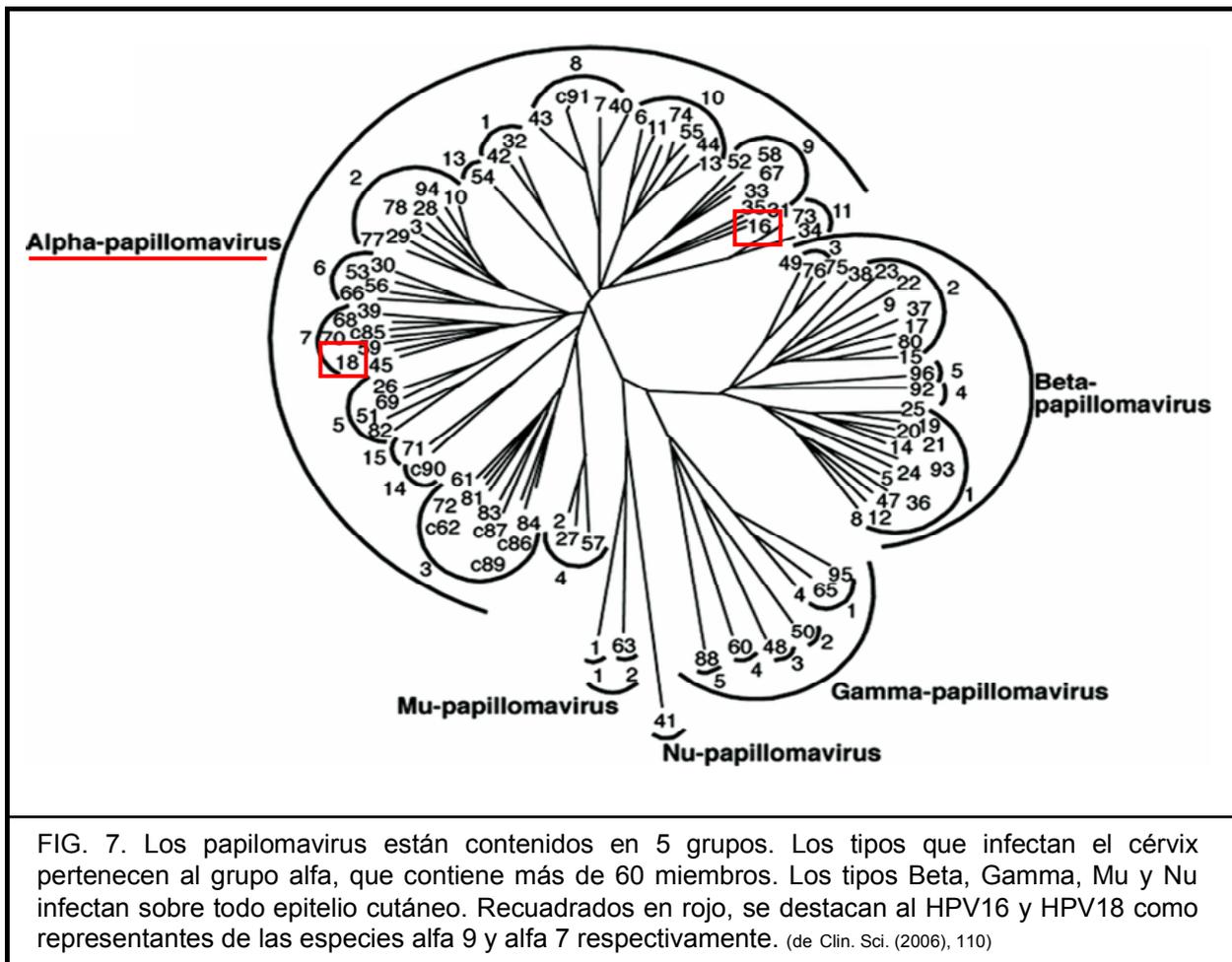
FIG. 6. Estructura de los viriones de HPV

El cáncer de cérvix o cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres en todo el mundo. Es una de las consecuencias de la infección causada por el HPV, que es la enfermedad de transmisión sexual de mayor prevalencia en el mundo. Cada año, a nivel mundial, 300 millones de mujeres se infectan con alguno de los cien tipos diferentes de HPV, 30 millones padecen lesiones leves, 10 millones sufren patologías más graves y 500.000 desarrollan cáncer de cuello uterino.

El virus de papiloma humano se reconoce actualmente como la mayor causa de cáncer de cuello de útero, estando presente en el 95% de las lesiones (zur Hausen, 1996, Zheng, 2006).

##### 1.3.1.1. Tipos

Para la clasificación taxonómica de los HPV, es necesario que la secuencia del gen L1 entre los tipos difiera un 10% o más. Hay más de 100 tipos identificados, de los cuales 40 infectan el tracto genital, y se clasifican según su potencial de inducir transformación (Chen, 2005). Entre las cepas de alto riesgo, se encuentran el HPV16 que es responsable del 58,9% de los casos de cáncer cervical, siendo mayoritariamente carcinoma de células escamosas, y el HPV18, que produce en general adenocarcinomas y tumores más agresivos. Se citan como de riesgo intermedio los tipos 31, 33 y 45; y como de bajo riesgo, los tipos 6 y 11, que solo generan verrugas pequeñas en el tracto genital. (Zheng, 2006, Motoyama, 2004, Giannoudis, 2001) (FIG. 7 y TABLA 1)



### 1.3.1.2. Genoma

El genoma viral consiste en una doble hélice circular de ADN, que en el caso del HPV16 posee 110 CpGs y en el HPV18, 168. Los genomas de todos los tipos de HPV contienen aproximadamente 8 ORF (*open reading frames*) los cuales son transcritos como ARN mensajeros policistrónicos desde la misma hebra de ADN, sin haber evidencia de transcripción alguna desde la otra hebra.

La molécula de ADN del HPV mide aproximadamente 8-kb de longitud, y su genoma está organizado en 3 regiones: los genes tempranos (E1 a E7), los genes tardíos (L1 y L2) y la secuencia reguladora URR (por sus siglas en inglés: *upper regulatory region*, o también conocida como LCR: *long control region*). Las regiones de genes tempranos y tardíos son ambas codificantes de proteínas, las que se expresan en infecciones de transformación y productivas respectivamente. La URR es no codificante, posee varios sitios de unión para represores y activadores de la transcripción, sugiriendo que puede jugar un papel en determinar el rango de hospedadores para los determinados tipos de HPV (Motoyama, 2004). Esta región mide de 400 a 1000 bp, y es la que posee la mayor variabilidad entre los distintos tipos de HPV. Contiene todos los elementos regulatorios *cis* necesarios para la transcripción, incluyendo al promotor temprano (p97 en el caso de HPV16 y p105 en el HPV18) y al origen de replicación (*ori*) (FIG. 8) (O'Connor, 1998, Jung, 2004).

Género	Tipo	Carcinoma escamoso (SCC)	Adenocarcinoma	Categoría
Alfa 1	HPV32 HPV42			BAJO RIESGO BAJO RIESGO
Alfa 2	HPV3 HPV10 HPV28 HPV29 HPV77 HPV78 HPV94			CUTANEO CUTANEO CUTANEO CUTANEO CUTANEO CUTANEO
Alfa 3	HPV61 HPV72 HPV81 HPV83 HPV84	0.04% 0.04%		BAJO RIESGO BAJO RIESGO BAJO RIESGO BAJO RIESGO
Alfa 4	HPV2 HPV27 HPV57			CUTANEO CUTANEO CUTANEO
Alfa 5	HPV26 HPV51 HPV82	0.22% 0.75% 0.26%	0.54%	ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO
Alfa 6	HPV53 HPV56 HPV66	0.04% 1.09% 0.19%		ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO
Alfa 7	HPV18 HPV45 HPV59 HPV39 HPV68	11.27% 5.21% 1.05% 0.82% 0.37%	37.3% 5.95% 2.16% 0.54%	ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO
Alfa 8	HPV7 HPV40 HPV43			CUTANEO CUTANEO CUTANEO
Alfa 9	HPV16 HPV31 HPV33 HPV35 HPV52 HPV58	54.38% 3.82% 2.06% 1.27% 2.25% 1.72%	41.62% 1.08% 0.54% 1.08% 0.54%	ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO ALTO RIESGO
Alfa 10	HPV6 HPV11 HPV13 HPV44 HPV55 HPV74	0.07% 0.07%  0.04%		BAJO RIESGO BAJO RIESGO BAJO RIESGO BAJO RIESGO BAJO RIESGO
Alfa 11	HPV34 HPV73	0.49%		ALTO RIESGO ALTO RIESGO
Alfa 13	HPV54			BAJO RIESGO
Alfa 15	HPV71			BAJO RIESGO

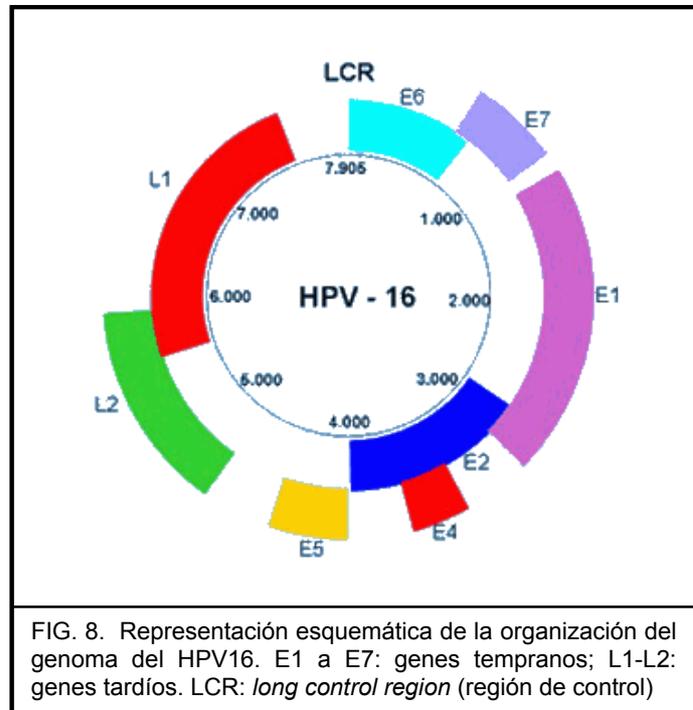
**TABLA 1.** Clasificación de los alfa papilomavirus, pueden subdividirse en 3 categorías (alto riesgo, bajo riesgo y cutáneos) dependiendo de la prevalencia en la población general y la frecuencia con la que causan cáncer cervical. Los de alto riesgo provienen de los grupos 5, 6, 7, 9 y 11. la frecuencia con la que los distintos tipos de HPV se encuentran en cáncer cervical (carcinoma de células escamosas o adenocarcinomas) se muestra en las columnas centrales. En los casos en los que no aparece ningún porcentaje, es que ese tipo de HPV no se asocia en general con cáncer cervical. (adaptado de Clin. Sci. (2006), 110)

Los genes de la región temprana se transcriben antes de la replicación productiva del ADN, en cambio los de la región tardía son transcritos después de la amplificación del ADN viral. La mayoría de los genes de HPV 16 son iniciados del promotor mayor p97, y los del HPV 18 desde el promotor p105.

Se identificaron dos TATA boxes upstream del ORF de E6, en bp 17 y 65, y otra upstream L1, en bp 4291. Una CAT box potencial precede a las TATA boxes cerca de la región de E6, en bp 7898. Las señales de poliadenilación pueden ser encontradas al final de las regiones de los genes tempranos y tardíos, en bp 4215 y 7321 (Zheng, 2006).

### 1.3.1.3. Ciclo vital del HPV

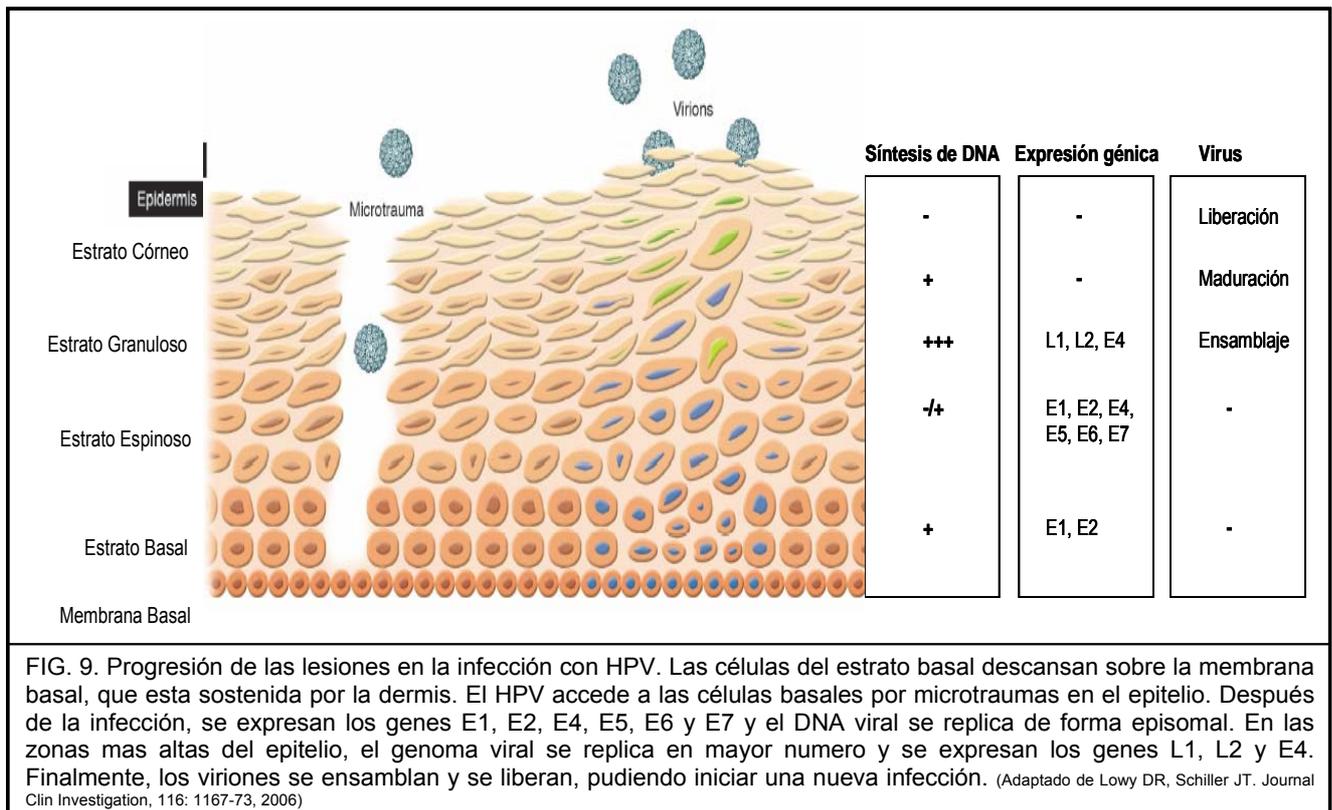
Estos virus son altamente específicos de especie. Todos tienen tropismo por las células epiteliales escamosas (aunque se desconocen los receptores, algunos HPV se adhieren a la célula vía heparin sulfato, aunque también pueden estar implicados los proteoglicanos), causando lesiones epiteliales. El ciclo de vida productivo del HPV está directamente relacionado a la diferenciación del epitelio celular. La infección por papiloma virus se produce por microtraumas en el epitelio, exponiendo la capa basal a la entrada del virus (Fehrmann, 2003).



Después de la entrada en los queratinocitos de la capa basal, el genoma del HPV se establece como episomas, con aproximadamente 50-100 copias por célula, los cuales se replican en sintonía con la replicación del ADN celular (la expresión de los genes tempranos E1 y E2 es detectada en esta fase, los cuales contribuyen a la replicación y al mantenimiento del estado episomal). Después de la división celular, las células hijas infectadas abandonan la capa basal, migran hacia las regiones suprabasales y se diferencian. En contraste con los queratinocitos que no están infectados, los cuales abandonan el ciclo celular tan pronto como se desprenden de la membrana basal, las células infectadas entran en fase S tras alcanzar la capa suprabasal. Esta entrada en fase S resulta en la amplificación de los genomas virales a cientos de copias por célula. Al mismo tiempo, con la amplificación del ADN viral se sintetizan las proteínas virales E1, E4 y las de la cápside, resultando en el ensamblaje de los viriones infectantes. De esta forma los viriones son liberados en las capas más altas del epitelio. La conversión maligna no produce infección productiva. (Fehrmann, 2003, Lowy, 2006) (FIG. 9)

La transcripción tardía se induce en las células más distales de la capa granulosa, que lleva a la acumulación de proteínas L1 y L2 y al ensamblaje de genomas en viriones maduros, que son liberados al exterior con las células muertas del estrato córneo.

La liberación de los viriones en la capa más distal del epitelio, lejos de la dermis, impide su acceso a la sangre y explica la falta de respuesta inmune contra estos virus, la persistencia de las infecciones y las lesiones que producen.



#### 1.3.1.4. Transcripción.

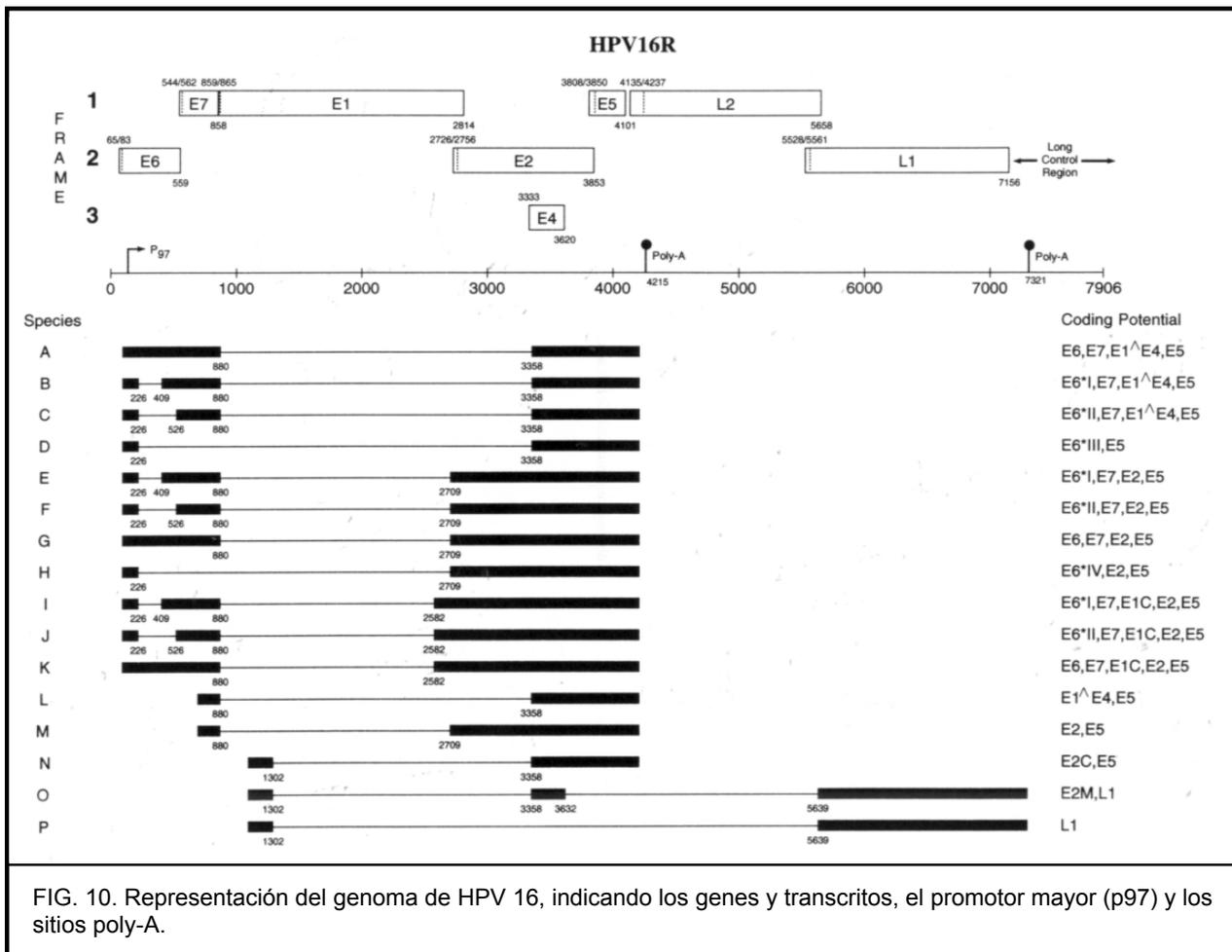
Se sabe que solo una hebra del genoma se transcribe, produciendo 2 clases de proteínas, las tempranas y las tardías. Todos los transcritos de la región temprana terminan en un sitio de polyA común en la unión entre los ORF tempranos y tardíos.

Los transcritos se originan de un único promotor y por *splicing* alternativo generan la expresión de las proteínas E2, E4 y E5. Los ORF tardíos podrían también utilizar los mismos promotores que los tempranos, pero no se sabe con certeza.

En los papilomavirus animales, los transcritos tempranos y tardíos se originan de varios promotores, en cambio en los papilomavirus humanos, los transcritos empiezan de uno o dos promotores.

Las proteínas tempranas son reguladoras e incluyen a las que regulan la transcripción de E2 y E7. La transcripción comienza con la interacción de los factores de transcripción basales con la TATA box del URR. Una vez que la transcripción comenzó, los transcritos son empalmados de diferentes maneras, produciendo varios mRNA diferentes que codifican para genes distintos. Este proceso permite la expresión de genes en diferentes marcos de lectura. En modelos animales y algunos cutáneos, E2 es un fuerte activador de la transcripción, estimulando genes tempranos y tardíos. La localización de los sitios *target* de E2 muy cerca de la TATA box, desplaza la maquinaria de transcripción basal, resultando en la represión de la transcripción temprana.

Los promotores tardíos del HPV parecen estar ubicados fuera de la URR, a diferencia de los otros papilomavirus, en los que se ubican dentro. Todavía no se sabe si E2 estimula la transcripción tardía (FIG. 10) (Zheng, 2006, Bernard, 2002).



### 1.3.1.5. Replicación del genoma viral.

El genoma se replica de forma episómica. Hay 2 mecanismos involucrados:

- Replicación plasmídica. Ocurre en células de las capas más bajas de la dermis. Inicialmente, el ADN viral es amplificado hasta alcanzar unas 50/400 copias por genoma diploide. Después de esto, al replicarse una vez por división celular, el número de copias por célula permanece constante. La proteína E1 está involucrada en esta fase de replicación.
- Replicación vegetativa. Ocurre en las células en diferenciación terminal de la epidermis. En estas células diferenciadas (o células arrestadas en cultivo) el control del número de copias parece haberse perdido, y el ADN es amplificado a muy altas copias por célula.

El virus se libera de las células epidérmicas cuando estas mudan, y es transmitido por contacto directo e indirecto.

### 1.3.1.6. Regulación de la replicación

Para mantener un número de copias en la capa basal del epitelio, y así permanecer en infección latente, el ADN viral debe replicarse junto con la célula. La proteína E1 interacciona con la primasa y la polimerasa celular para permitir la unión al sitio específico del origen del virus, esta tiene función ATPasa y helicasa, se une al ADN viral con baja especificidad de

secuencia. E2 se une a E1 (forman un complejo) y también a la secuencia URR adyacente al origen viral.

El origen de replicación contiene una región de unión de E1, flanqueada por dos sitios de unión para E2.

Después de la interacción física entre E1 y E2, el genoma del papiloma virus se replica a bajo nivel (20 copias por célula) en un modo de replicación “theta”. En células diferenciadas, el HPV se replica a altas tasas (más de 100 copias por célula). En esta etapa, los genes de transcripción tardía empiezan a producir las proteínas de la cápside, que tienen la capacidad de autoensamblarse en viriones. (Wentzensen, 2004)

#### 1.3.1.7. Integración del ADN

El ADN del HPV es en general extracromosomal o episomal en las lesiones benignas preneoplásicas, aumentando la frecuencia de integración a medida que progresa la lesión. Los tejidos cancerosos pueden tener ADN episomal o integrado al mismo tiempo, aunque la integración parece ser más frecuente en la infección con HPV18 que con HPV16 (Motoyama, 2004, Woodman, 2007).

Durante la integración, que requiere la linearización del genoma, usualmente el ADN viral se rompe en la región E1-E2, lo que lleva a la pérdida de estas regiones. La pérdida de E2, que codifica una proteína que inhibe la transcripción de E6 y E7 resulta en una expresión descontrolada y aumentada de estas oncoproteínas, que llevan a transformación maligna de las células (Motoyama, 2004) (*FIG. 11*).

Cuando el ADN viral es liberado en el núcleo, varios factores de transcripción celulares interaccionan con la región URR, comenzando la transcripción de los genes tempranos E6 y E7. Después de la traducción, las proteínas transformantes interaccionan con los reguladores celulares antioncogénicos p53 y Rb, interrumpiendo así el ciclo celular e inhibiendo el arresto. Concomitantemente, los genes de E1 y E2 se expresan para regular la replicación y la transcripción del ADN. En el HPV genital, E2 reprime la transcripción temprana por su interacción con blancos específicos en la URR, desplazando la maquinaria de transcripción basal. En los papilomavirus animales y cutáneos E3 activa varios promotores, incluyendo los tardíos (Wentzensen, 2004).

#### 1.3.1.8. Transformación.

Una vez que el virus se integra al genoma celular, comienza la etapa de transformación de la célula, y disminuye notablemente la replicación. En esta fase juegan un papel primordial las proteínas que expresa el virus, de manera que a continuación se comentarán brevemente.

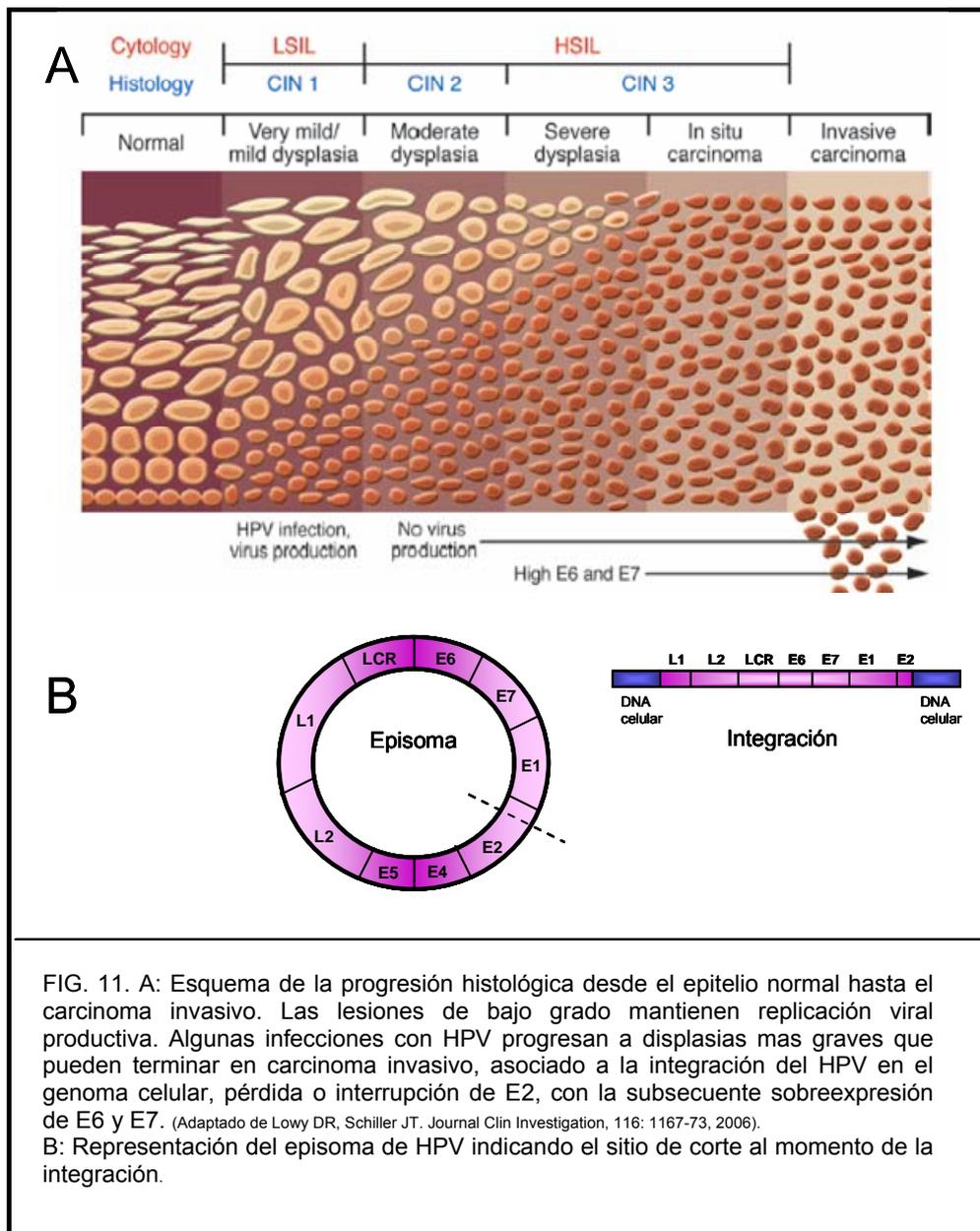


FIG. 11. A: Esquema de la progresión histológica desde el epitelio normal hasta el carcinoma invasivo. Las lesiones de bajo grado mantienen replicación viral productiva. Algunas infecciones con HPV progresan a displasias mas graves que pueden terminar en carcinoma invasivo, asociado a la integración del HPV en el genoma celular, pérdida o interrupción de E2, con la subsecuente sobreexpresión de E6 y E7. (Adaptado de Lowy DR, Schiller JT. *Journal Clin Investigation*, 116: 1167-73, 2006).  
 B: Representación del episoma de HPV indicando el sitio de corte al momento de la integración.

### 1.3.1.9. Proteína E6

E6 es uno de los primeros genes expresados durante la infección con HPV, y juega un papel importante en la inmortalización celular. La proteína E6 no tiene actividad intrínseca enzimática y ejerce sus funciones interactuando con proteínas celulares.

E6 es un péptido de 151 aa (16 a 19 kD), la mayoría de ellos básicos, y contiene 4 motivos C-x-x-C que forman 2 dominios de unión de zinc (proteína dedos de zinc).

Una función importante de E6 (el extremo carboxilo) es que se une a p53 lo que resulta en su degradación mediada por ubiquitina. E6 primero se une a una ligasa celular de ubiquitina, la E6-AP (de 100 kDa), y este complejo es capaz de unirse a p53. E6-AP recluta al complejo enzimático que ubiquitina las lisinas en p53, iniciando su proteólisis por el proteosoma (FIG. 11BIS).

Además de degradar a p53, E6 activa a la telomerasa. La inmortalización de queratinocitos requiere la activación de hTERT y de la vía de p16. El mecanismo por el cual E6 logra activar a la telomerasa se desconoce, aunque muchos estudios demostraron que E6 puede aumentar los niveles de hTERT endógenos en queratinocitos mediante activación transcripcional de su promotor. Este mecanismo parece ser independiente de p53, y puede incluir a myc (Fehrmann, 2003).

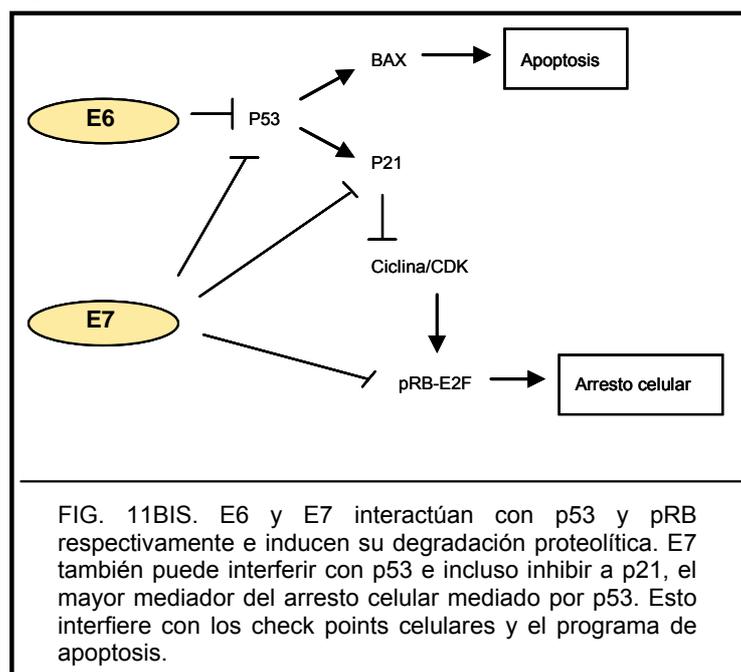
#### 1.3.1.10. Proteína E7

E7 es una pequeña fosfoproteína nuclear ácida de 100 aa de longitud (10 a 14 kD), que dimeriza a través de un motivo de dedo de zinc en el C-terminal. Su actividad primaria es asociarse con miembros de la familia de Rb, para facilitar la progresión a la fase S. En células normales, Rb está hipofosforilado en G1 temprano, y se hiperfosforila en la transición G1-S. En su estado hipofosforilado, Rb se une al factor E2F y reprime la transcripción de los promotores que contienen sitios de unión a E2F. Un gran número de genes requeridos para la síntesis de ADN, como ADN polimerasa alfa y timidina quinasa, son transcritos regulados mediante E2F. Uniéndose a Rb hipofosforilado, E7 impide que se una con E2F, y así promueve la progresión del ciclo celular, incluso en células epiteliales diferenciadas, permitiendo la replicación de los genes virales.

Adicionalmente, E7 induce la degradación de Rb mediada por ubiquitina. Además de con Rb, E7 interacciona con p107 y p130, miembros de la misma familia que también regulan negativamente la transcripción de E2F (*FIG. 11BIS*).

La expresión de E7 en ausencia de otras proteínas virales lleva a transformación de fibroblastos de ratón. Mientras que E7 sola puede inmortalizar queratinocitos humanos, la presencia de E6 realza la frecuencia en que esto pueda ocurrir.

E7 también suprime la actividad inhibitoria de p21 y p27 (Fehrmann, 2003).



#### 1.3.1.11. Proteína E5

Es la proteína con capacidad transformante más pequeña que se conoce.

Es una proteína altamente hidrofóbica, de 80 aa, que se localiza principalmente en las membranas endosomales, aparato de Golgi y en menor medida en la membrana plasmática (Munger, 2002). Su función en transformación se basa en incrementar la señalización de receptores de membrana, como EGF-R y PDGF-R, haciendo a las células más sensibles a concentraciones menores de los respectivos factores sin aumentar el número de receptores. Al unir moléculas a estos receptores facilita su auto fosforilación, dimerización y activación. Además, E5 impide la bajada de pH en las vacuolas celulares, lo que determina que el reciclaje de los receptores a la superficie este favorecido sobre su degradación en los lisosomas.

Se demostró que E5 incrementa el crecimiento celular de fibroblastos de ratón, y los puede transformar a un crecimiento independiente de adhesión. También incrementa la capacidad proliferativa de los queratinocitos humanos, este hecho realizado con la adición de EGF. La expresión de E5 resulta en un incremento ligando-dependiente de los niveles de fosforilación de EGFR, y aumento de la señal mitogénica de EGFR.

Esta proteína es una de las menos conservadas entre los papilomavirus (Fehrmann, 2003).

#### 1.3.1.12. Proteína E1

E1 es una fosfoproteína nuclear larga (68-76 kD) esencial para la replicación del HPV. Interacciona con E2 y se une con gran afinidad al origen de replicación (ori) localizado en la URR. Las funciones de E1 están asociadas con la replicación y consiste en unión al ATP, con actividad helicasa e interacción física con numerosos componentes de la maquinaria de replicación celular del ADN (*ADN pol*, *primasa*) (Hebner, 2006).

#### 1.3.1.13. Proteína E2

El gen de E2 codifica para una proteína altamente fosforilada de 48 kD. Regula la transcripción y la replicación del ADN viral a través de la interacción con las secuencias parcialmente palindrómicas, 5'- ACCN6G(GT)T-3' localizadas en la URR. En los HPV 16 y 18, hay 4 de esos sitios y la proteína E2 se une al promotor temprano y disminuye la expresión de E6/E7; por lo tanto, la pérdida de E2 es el primer paso en el proceso de transformación. (Hebner, 2006, Romanczuk, 1990)

#### 1.3.1.14. Proteína E4

Se expresa en las últimas etapas de la infección (como una proteína de fusión con 5 aminoácidos del extremo N-Terminal de E1) cuando los viriones completos se ensamblan, y no se sabe si posee propiedades transformantes, pero juega un papel importante en la maduración y replicación viral. E4 también induce el colapso de la red de citoqueratina citoplasmática en queratinocitos humanos, lo que puede facilitar la salida de los viriones de la célula infectada (Zheng, 2006). Esto podría ser la causa del característico halo perinuclear de los "coilocitos", las células que se observan en los cortes histológicos y citologías de las células infectadas (*FIG. 12*).

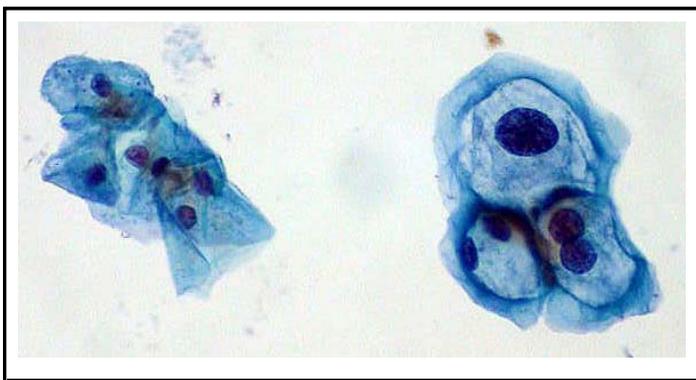


FIG. 12. Preparado delgado con grupo de células normales cervicales a la izquierda y células infectadas con HPV a la derecha (displasia leve), mostrando formas típicas de coilocitos: núcleos aumentados x2 o x3 e hiperchromasia.

#### 1.3.1.15. L1 y L2

El gen de L1 codifica la proteína mayor de la cápside (56-60 kD). Es la proteína más antigénica de los papilomavirus, está débilmente fosforilada y no se une al ADN. Puede ser glicosilada y entrecruzada mediante disulfuros, pero las implicaciones de estos cambios no se conocen. Está bastante conservada entre los papiloma virus.

**TABLA 2. Genes y proteínas del HPV y sus respectivas funciones.**

Gen	Función
E1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desenrollamiento del genoma del virus, helicasa</li> <li>• Factor de elongación para la replicación del ADN</li> </ul>
E2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Responsable del reconocimiento y unión al origen de replicación</li> <li>• Represión de la transcripción temprana</li> </ul>
E3	Desconocida
E4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión tardía: liberación de las partículas virales</li> <li>• Transformación de la célula huésped por desregular la vía mitogénica</li> <li>• Forma redes de filamentos citoplasmáticos importantes para la replicación viral</li> </ul>
E5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad transformadora</li> <li>• Altera la supresión del crecimiento por 2 mecanismos: EGF receptor y activación de la vía mitogénica vía factores de transcripción c-Jun y c-Fos (importante en la vía de degradación de ubiquitina de p53 formada por E6)</li> <li>• Inactivación de p21. Parece funcionar, al menos en parte, activando los receptores de EGF y PDGF y alterando las señales de traducción</li> </ul>
E6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformación celular por unión a p53</li> </ul>
E7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformación celular por unión a Rb/p107</li> </ul>
E8	Desconocida
L1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína mayor de la cápside</li> </ul>
L2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína menor de la cápside: empaquetamiento del ADN, ensamblaje de los viriones</li> </ul>

El gen de L2 codifica para la proteína menor de la cápside (49-60 kD), que está altamente fosforilada y se une al ADN. A diferencia de L1, L2 no se entrecruza ni se une a sí misma (Hebner, 2006).

#### 1.3.1.16. Región reguladora

Operacionalmente definida como la región que va desde la terminación del gen de L1 hasta la primera metionina del gen de E6, es la región menos conservada entre los papilomavirus. Contiene al promotor temprano y varios motivos reguladores de la transcripción, incluyendo aquellos de la familia de AP-1, YY1, NF-1/CTF, Octa, TEF-2 y Sp1, y el sitio de unión de E2. El origen de replicación (ori) también se encuentra aquí, normalmente centrado entre los dos sitios de unión del E2 (Hebner, 2006, Giannoudis, 2001, Romanczuk, 1990).

#### 1.3.1.17. Vacuna contra el virus del papiloma humano

La última generación de vacunas preventivas para el HPV está basada en partículas de la cápside del virus, es decir que no contiene ADN viral del núcleo y por tanto, su capacidad de infección queda totalmente anulada. Actualmente hay disponibles dos vacunas, una bivalente que protege contra los tipos mas comunes de alto riesgo: HVP16 y HPV18 (Cervarix®) y la otra tetravalente que además es activa frente a los tipos 6 y 11 (Gardasil®). Ambas vacunas previenen la infección inicial con el virus, y se espera que sus efectos protectores duren al menos 4 años.

Si bien es un avance importante, hay que tener en cuenta que esta inmunización solo protegerá contra los tipos incluidos en las vacunas, el tiempo que dure la protección todavía no se sabe con certeza y puede que no sea absoluta. Por otra parte, las mujeres mayores no están cubiertas por el plan de vacunación, por lo que continúan siendo un grupo de riesgo.

También hay un creciente interés en desarrollar vacunas terapéuticas, que provoquen respuestas inmunes contra las infecciones ya establecidas, pero hasta la fecha todavía no se ha conseguido.

#### 1.3.1.18. Patogénesis de los papilomavirus

Los papilomavirus infectan aves y mamíferos. Sólo producen lesiones en el epitelio escamoso estratificado. No hay evidencia de extensión por vía sanguínea, permaneciendo la infección localizada, y pudiendo permanecer como infecciones latentes sin evidencia de enfermedad.

La resolución más común de las infecciones es la formación de un crecimiento benigno de células, una verruga o un papiloma. Esto puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo. Las verrugas de la piel se dividen en planas (superficiales) y plantares (en los pies o en los dedos).

- Verrugas cutáneas: mayormente benignas, asociadas a HPV 1, 2, 3 y 4. en general se desarrollan antes de la pubertad. Se suele infectar un sitio de trauma, y difundirse por auto inoculación.
- Lesiones respiratorias: se pueden localizar en la cavidad oral, nariz y laringe, pudiéndose extender a traquea, bronquios y pulmones, aunque no es lo más común.

- Lesiones genitales (condyloma, neoplasia intraepitelial, malignidad): es una enfermedad de transmisión sexual, pero la mayoría de las infecciones permanecen en forma latente o subclínica. El 0,01-0,1% de las lesiones cervicales progresan a cáncer, siendo menor el porcentaje en lesiones ubicadas en otros sitios. Según la epidemiología, la transformación maligna requiere de cofactores.

#### 1.3.1.19. Cofactores

Como ya se ha mencionado anteriormente, muchos casos de infección con HPV se curan espontáneamente. Más aún, incluso en los casos donde la infección persiste, el cáncer no aparece hasta una década después. Esta demora apoya la teoría que la infección con HPV puede ser causa necesaria pero no suficiente para que la lesión progrese a carcinoma, y que la influencia de otros factores, o cofactores, son necesarios para establecer la malignidad inducida por HPV (Gatza M, 2005).

Entre estos cofactores encontramos: número de embarazos, tabaco, clamidiasis y otras enfermedades de transmisión sexual, estrógenos y anticonceptivos orales (demostraron aumentar la transcripción de E6 y E7) y también la coinfección con HIV (Motoyama, 2004, Cavalcanti, 2000, Castellsague, 2002).

Este comportamiento podría explicarse mediante el estudio de los factores epigenéticos, que integren los componentes ambientales con el desarrollo y progresión de las lesiones.

**TABLA 3. Ubicación de las lesiones según el tipo de papiloma virus involucrado.**

Cáncer	Tipos predominantes	Cofactores
Carcinoma de piel	HPV 5, 8	U.V., genéticos?
Transformación maligna de papilomas respiratorios	HPV 6, 11	Rayos X
<b>Tracto genital bajo</b>	<b>HPV 16, 18, 31, 33</b>	<b>Embarazo, tabaco, EPIGENETICA</b>

#### 1.3.1.20. Cambios epigenéticos en la neoplasia cervical

La metilación aberrante de los promotores de genes supresores de tumores es uno de los cambios epigenéticos más importantes que contribuyen a la carcinogénesis. Tanto los genes virales como los del hospedador pueden ser blancos para la maquinaria de metilación celular. El patrón de metilación de los genes del HPV varía de acuerdo al ciclo vital, la presencia de enfermedad y posiblemente el tipo viral (Kim, 2003, Badal, 2004, Kalantari, 2004, Turan, 2006).

La metilación de novo del HPV puede verse como un mecanismo de defensa para suprimir la transcripción de ADN extraño, una estrategia que utiliza el virus para mantener una infección a largo plazo, o ambas (Remus, 1999, Badal, 2003).

Los oncogenes virales inducen la metilación de genes celulares previa activación de las DNMTs celulares. Por ejemplo, el gen de la caderina 1 se metila después que la proteína LMP1 del EBV activa a la DNMT1. Este mecanismo se produce a través de la vía AP1-JNK (*activated protein 1-JUN N-terminal kinase*). Aunque no hay evidencia hasta ahora que HPV pueda inducir

la metilación en genes supresores de tumor, la proteína E7 de HPV16 se une a DNMT1 y puede estimular su actividad enzimática (Burgers, 2006). Más aún, E7 puede también activar la transcripción de DNMT1. DNMT1 es un blanco del factor de transcripción E2F1 y E7 puede inactivar a los miembros de la familia de Rb que son los que inhiben a E2F. Por lo tanto, E7 puede estimular la actividad de E2F y la transcripción de DNMT1.

También los genes celulares son silenciados por hipermetilación de sus promotores en el cáncer cervical. Comparando muestras tumorales con tejido normal, se encontraron reprimidos genes como p16, MGMT, GST y DAP-kinasa (Rosas, 2001, Sánchez-Céspedes, 2000).

El tratamiento con agentes demetilantes como el 5-aza ha demostrado que reactiva la transcripción de HPV silentes en líneas celulares de cáncer de cérvix (Van Tine, 2004). Esto plantea la posibilidad, aunque todavía no hay evidencias empíricas, que la detección de HPV en mujeres mayores puede ser por la reactivación epigenética de virus que se encontraban silenciados previamente.

### **1.3.2. Epstein-Barr Virus**

El virus Epstein-Barr (EBV) fue descubierto hace más de 40 años a partir de células derivadas de linfoma de Burkitt de pacientes africanos. Sin embargo, el 90% de la población mundial adulta está infectada con este virus. La infección primaria suele ocurrir en la infancia, permaneciendo la infección en forma asintomática en los linfocitos B durante toda la vida del individuo (Rickinson, 1996).

**TABLA 4. Clasificación de los herpesvirus humanos.**

<b>Tipo de herpesvirus humano</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Subfamilia</b>	<b>Prevalencia en adultos</b>	<b>Latencia</b>
HHV1	Herpes simple 1 (HSV1)	$\alpha$	70	Neuronas del trigémino
HHV2	Herpes simple 2 (HSV2)	$\alpha$	30	Neuronas del sacro
HHV3	Varicela-zóster (VZV)	$\alpha$	95	Ganglios de la raíz dorsal y trigémino
<b>HHV4</b>	<b>Epstein-Barr (EBV)</b>	$\gamma$	<b>70</b>	<b>Linfocitos B</b>
HHV5	Citomegalovirus	$\beta$	85	Monocitos-macrófagos
HHV6		$\beta$	95	Piel, linfocitos, macrófagos
HHV7		$\beta$	85	Saliva
HHV8	Herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV)	$\gamma$	15	Linfocitos, esperma?

Es un virus ubicuo, que infecta las células de la mucosa orofaríngea y establece infecciones latentes en linfocitos B. Se transmite por la saliva, ya que el virus infecta el epitelio bucal y las glándulas salivales, y de ahí pasa a los linfocitos B del tejido linfoide de la faringe desde donde se disemina a todo el organismo. Cuando el virus se reactiva, se elimina por saliva y es capaz de contagiar a otro individuo (Rickinson, 1996).

El EBV pertenece a la familia *Herpesviridae*, de la que se conocen 8 miembros que afectan humanos y muchos otros que producen enfermedades en otras especies (TABLA 4).

Los virus herpes se clasifican en tres grupos: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* de acuerdo a sus propiedades biológicas. En el caso de los Herpesvirus humanos, esta clasificación además se corresponde con el tipo de célula en la que desarrollan la latencia.

Los *herpesvirus alfa* son neurotrópicos, causan lesiones epiteliales y permanecen en latencia en ganglios y neuronas. Esta subfamilia incluye a los herpesvirus 1, 2 y 3 (más conocido como el virus varicela-zóster) que tienen como característica común la de destruir la célula a la que infectan.

Los *herpesvirus beta* incluyen los tipos 5, 6 y 7, que permanecen latentes en glándulas secretoras, células linforreticulares y riñón entre otros tejidos. La infección con este tipo viral produce un aumento en el tamaño de la célula, apareciendo cuerpos de inclusión en el núcleo y el citoplasma. Los individuos inmunocomprometidos son los más susceptibles de padecer enfermedad por este tipo de virus, pudiendo incluso llevar a la muerte. Además, este virus es capaz de transmitirse desde la madre al feto, y así causar daño congénito en bebés.

Los *herpesvirus gamma* muestran tropismo por los linfocitos, donde establecen su latencia. Los integrantes de este grupo son el Virus de Epstein-Barr (EBV, el tipo 4) y el tipo 8 (el asociado a sarcoma de Kaposi). El EBV tiene preferencia por los linfocitos B a los que inmortaliza eficientemente *in vitro*, y cuya infección aguda se asocia con desordenes linfoproliferativos (Kieff E, 2001).

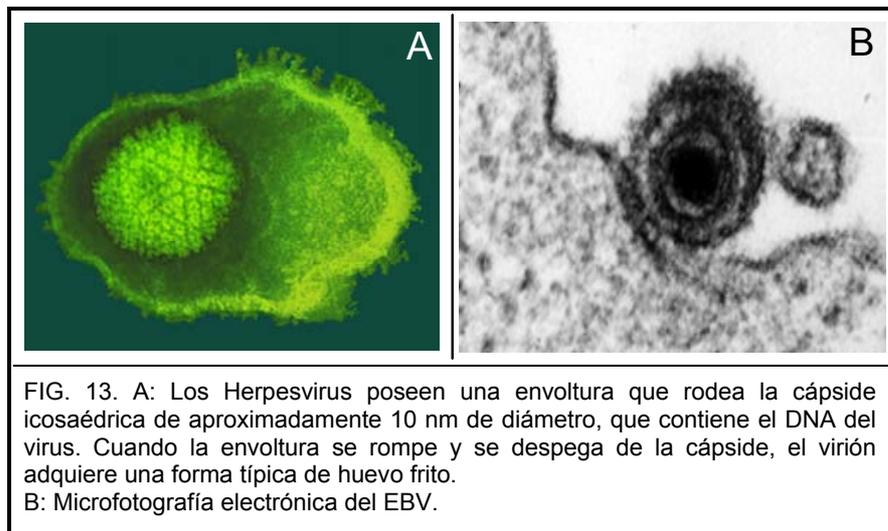
### **CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS HERPESVIRUS**

- Tamaño: 120-300 nm
- Simetría de la cápside: Icosaédrica
- Genoma: DNA lineal de doble cadena, 120-250 Kb
- Presencia de tegumento y envuelta lipídica
- Gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos, síntesis de DNA y procesamiento de proteínas
- Infecciones latentes
- Transcriben, replican y ensamblan en el núcleo celular
- La producción de progenie infecciosa se acompaña de la destrucción de la célula infectada.

### 1.3.2.1. Morfología del virión

Los viriones están compuestos por un *core*, una cápside, un tegumento y una envoltura. El *core* contiene la molécula de ADN de doble cadena de aproximadamente 172 Kb. El genoma del EBV está organizado como una región única larga que codifica para unos 90 genes y posee de 6 a 12 elementos de repetición internos y terminales. La recombinación de sus repeticiones terminales origina la forma episomal del virus que es la que se encuentra en el núcleo de las células infectadas de forma latente.

La *cápside* es de conformación icosaédrica y posee 162 capsómeros, el *tegumento* es una estructura poco definida que se encuentra entre la cápside y la envoltura, está compuesto por numerosas proteínas codificadas por el virus sin simetría apreciable. Algunas de estas proteínas necesarias para iniciar la infección, mientras que otras favorecen la interacción envoltura-cápside, con lo que aumenta la estabilidad de la partícula. Estrechamente asociada al tegumento se encuentra la *envoltura*, de naturaleza lipídica con algunas glicoproteínas de aspecto trilaminar al microscopio electrónico (Carrasco, 2006) (FIG. 13).



### 1.3.2.2. Arquitectura genética

La mayoría de los genes de los herpesvirus contienen una región promotora upstream de una TATA box, un inicio de transcripción downstream de la TATA box, un *open reading frame* (ORF) con un inicio de traducción y sitios de poliadenilación con secuencias flanqueantes standard. Una característica bastante común es el solapamiento de los genes.

Los herpesvirus son capaces de alterar el medio ambiente celular según sus necesidades. Estas alteraciones incluyen estimular o reprimir la síntesis de macromoléculas, inducir o inhibir la replicación del ADN celular, o bien immortalizar a la célula. El virus es capaz de bloquear la apoptosis, activar la vía del interferón, bloquear la presentación de péptidos antigénicos en la superficie de la célula e incluso sintetizar proteínas virales que actúen como inmunomoduladores. Esto trae como consecuencia que la célula infectada no se elimine pronto, permitiendo la permanencia del virus y la dispersión a otros hospedadores susceptibles.

### 1.3.2.3. Ciclo infectivo

La entrada del virus a la célula puede dividirse en dos fases: la adhesión y la penetración. En el reconocimiento y unión del EBV a los receptores de las células epiteliales y de los linfocitos intervienen tres glicoproteínas de la envoltura: la gH (gp85 o BXLF2) y gL (gp25 o BKRF2) para las células epiteliales, y la gp42 para los linfocitos. Esta interacciona con la CD21, que está implicada a su vez en la regulación del complemento a la que se une por medio de su glicoproteína gp350/220.

Esta unión puede desencadenar la actividad tirosin quinasa y tener efectos activadores en el linfocito B, ya que se vio que comienzan a secretar grandes cantidades de IgG apenas se produce la exposición al virus. CD21 también aumenta la activación de NF-KB y del promotor de EBNA, Wp.

Una vez que se ha unido el virus a su receptor, se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática, liberándose la nucleocápside al citoplasma. La cápside junto con parte del tegumento es transportada por el citoesqueleto hasta el complejo del poro nuclear, donde se abre e inyecta el genoma viral al interior del núcleo (*FIG. 14*).

### 1.3.2.4. Expresión génica

Una vez en el núcleo, donde tiene lugar la mayor parte del ciclo vital de los herpesvirus, el genoma viral se circulariza entre las 12 y 16 horas post-infección. Si se trata de una infección lítica, comienza la transcripción de un gran número de genes virales, llevada a cabo por la ARN polimerasa II celular, pero con la intervención de factores transcripcionales codificados por el virus. Los herpesvirus codifican un gran número de enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidita quinasa, dUTPasa, timidilato sintetasa), síntesis de ADN (ADNpolimerasa, helicasa, primasa) y para el procesamiento de proteínas (protein quinasa), las cuales modulan la actividad de la polimerasa celular y determinan el reconocimiento ordenado de los promotores virales por los complejos de transcripción.

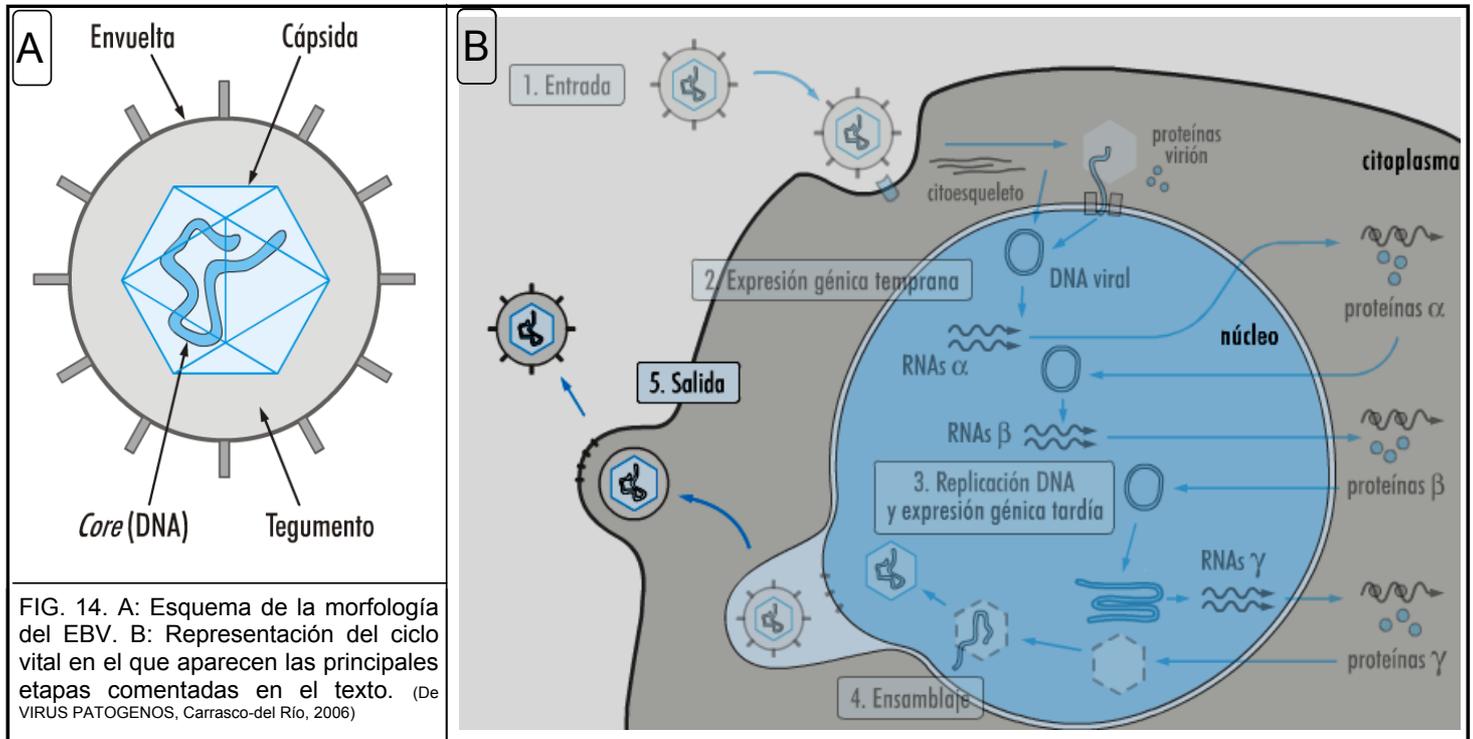
Durante la infección lítica se distinguen tres fases de expresión génica: la inmediatamente temprana (proteínas  $\alpha$ ), la temprana (proteínas  $\beta$ ) y la tardía (proteínas  $\gamma$ ). Las proteínas  $\alpha$  son las primeras en expresarse, son reguladores de la expresión génica cuya transcripción no depende de la síntesis de proteínas *de novo*, e inducen la transcripción de los genes beta. Las proteínas  $\beta$  están relacionadas con la replicación viral, incluyendo por ejemplo la ADN polimerasa, la helicasa y la timidita quinasa. Una vez replicado el ADN viral, se expresan los genes  $\gamma$  que codifican para las proteínas estructurales.

### 1.3.2.5. Maduración y salida

Una vez que las cápsides virales maduraron por contener el genoma viral empaquetado dentro, salen del núcleo rodeándose de la membrana nuclear interna donde previamente se han insertado proteínas codificadas por el virus. Para salir del núcleo pueden tomar dos alternativas: atravesar el lumen entre las membranas nucleares interna y externa fusionándose con la externa, abandonando la envoltura y saliendo al citosol como cápside desnuda para adquirir el tegumento;

o bien adquirir el tegumento en el núcleo sin perder la envoltura adquirida en la membrana nuclear interna.

De cualquiera de las dos maneras, los viriones se rodean sucesivamente por envueltas del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, hasta que finalmente son liberados de la célula infectada. (FIG. 14)



### 1.3.2.6. Inducción de la transformación en linfocitos B por el EBV

EBV induce la proliferación en linfocitos B, por los que muestra un marcado tropismo (Pope, 1968). En primer lugar se une a un receptor de superficie que hay en la superficie de los linfocitos B, denominado CD21. Esta unión induce la activación de la célula, la que entra en ciclo mitótico llevando a la aparición de líneas proliferantes, que se conocen como “líneas celulares linfoblastoides” (LCL). La interacción de la molécula CD21 con el EBV se asocia a la secreción de IgG. Las células comienzan entonces a dividirse haciéndose luego independientes de los mecanismos autócrinos de control de crecimiento y proliferación.

En estas células, el genoma viral se mantiene como episomas en forma latente y expresa 9 proteínas: los antígenos nucleares EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP, y las proteínas de membrana LMPs 1, 2A y 2B (Gatza, 2005, Klein, 2007, Williams, 2006, Young, 2004).

### 1.3.2.7. Patología de los herpesvirus humanos.

La infección primaria se produce en general durante la niñez (salvo con el HHV2 y HHV8 que tienen transmisión sexual), estableciéndose los virus en forma latente y persistiendo de por vida. El sistema inmune es incapaz de erradicar la infección, lo que lleva a que en pacientes inmunodeprimidos se puedan manifestar las lesiones y enfermedades típicas de cada herpesvirus.

A continuación se describen algunas características de la infección con los distintos tipos de herpesvirus.

HHV1: está muy extendido en la población, causa lesiones cutáneas y en las terminaciones nerviosas del ojo y la boca. En Estados Unidos es la causa principal de encefalitis viral esporádica fatal y gran responsable de cegueras.

HHV2: asociado a lesiones genitales y anales que resuelven espontáneamente.

HHV3: da lugar a dos síndromes clínicos: la varicela y el zóster. La varicela es una enfermedad eruptiva altamente contagiosa. El zóster se da por la reactivación del HHV3 y se caracteriza por un exantema vesicular con una distribución dermatomal a lo largo de un nervio sensorial que puede evolucionar a neuralgia post herpética. Este tipo de herpesvirus presenta cierto tropismo por las células T, lo que permite su diseminación cutánea.

HHV5 (Citomegalovirus): es el que posee el genoma más grande, de 230 Kb. La enfermedad por este virus se produce en individuos inmunocomprometidos, en los que puede aparecer retinitis, neumonitis y encefalitis que en ocasiones pueden llevar a la muerte. Además, como es capaz de atravesar la placenta, puede producir alteraciones congénitas que lleven a retraso mental, sordera o retinitis.

HHV6: este tipo se divide a su vez en dos grupos, el HHV6A y el HHV6B, ya que a pesar de estar muy relacionados, exhiben diferentes propiedades biológicas, moleculares, inmunológicas y epidemiológicas. La reactivación de HHV6 en pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar encefalitis y neumonitis. El HHV6B es el agente etiológico de la enfermedad infantil exantema súbito, mientras que el HHV6A no se ha asociado a ninguna enfermedad en particular. El HHV6 puede jugar un papel importante en la patogenia del SIDA, contribuyendo al colapso del sistema inmune por los efectos citopáticos sobre las células T entre otros factores (Braun, 1997).

HHV7: la infección con este tipo viral se relaciona con la roséola, exantemas y la pitiriasis rosea. Está muy relacionado genéticamente con el HHV6.

HHV8: además del sarcoma de Kaposi, este virus se relaciona con otros dos tipos de tumores: el linfoma de efusión primario en células B y la enfermedad multicéntrica de Castleman en ganglios linfáticos. Una característica particular del HHV8 es que incorpora en su genoma una gran variedad de genes celulares, una estrategia conocida como “pirateo molecular”. Entre ellos se encuentran homólogos de tres quimioquinas, una citoquina homóloga a la IL6, genes reguladores del crecimiento homólogos a la ciclina D, dos factores reguladores del interferón y ciertos receptores celulares entre otros.

#### 1.3.2.8. Patogénesis del EBV

La infección primaria por EBV en adultos induce un cuadro autolimitante de mononucleosis infecciosa en aproximadamente la mitad de los individuos, mientras que en el resto la infección solo se detecta a través de la seroconversión.

Las interacciones inmunológicas entre los linfocitos B y T generan un conjunto de linfocinas que son la causa de la sintomatología de la infección primaria.

Para desplegar su poder oncogénico el EBV debe desarrollar unos mecanismos que le permitan:

1. Mantener su genoma viral dentro de la célula. Esto lo consigue provocando una infección latente en linfocitos B, que son estimulados para proliferar y mantener la infección a los nuevos linfocitos;
2. Evitar la muerte de la célula huésped, mediante el control de la proliferación masiva del virus que pudiera provocar finalmente la lisis celular;
3. Evitar esa misma destrucción por el sistema inmune, expresando sólo algunos de sus antígenos limitando las interacciones entre las células infectadas con linfocitos procesadores; y
4. Activar los mecanismos de control del crecimiento celular. Ciertas proteínas del virus interaccionan con otras proteínas celulares o con otros genes celulares favoreciendo la inmortalización.

De esto se desprende la importancia del silenciamiento epigenético en la evolución de las patologías causadas por este virus.

Las enfermedades asociadas a EBV aparecen por lo general por un fallo del sistema inmune para controlar la proliferación de las células infectadas de modo latente. Este proceso es lo opuesto a lo que sucede con los otros herpesvirus, donde la enfermedad se presenta cuando el sistema inmune falla en controlar la infección lítica.

Este virus tiene un gran potencial oncogénico, pero ha alcanzado un equilibrio con el individuo al que infecta, por lo cual son raros los casos en los que produce cáncer. En los casos que se desarrollan linfomas y carcinomas, coincide con el estado inmunocomprometido del individuo infectado.

Las patologías más frecuentes que se asocian con EBV son:

- Mononucleosis infecciosa. Es una enfermedad que afecta al sistema linfático, de curso benigno. Se la conoce como la enfermedad del beso, ya que es más prevalente en adolescentes y adultos jóvenes. Si no hay complicaciones y el individuo no está inmunocomprometido, la enfermedad no reviste mayor importancia.
- Linfoma de Burkitt. Es una de las neoplasias más comunes entre los niños de África. Es un cáncer multifocal que se manifiesta varios años después de la infección por EBV.
- Carcinoma nasofaríngeo. Tiene mayor incidencia en la población china, son tumores muy agresivos que metastatizan en ganglios linfáticos.
- Otros tumores como ser el linfoma de Hodgkin, linfomas de células T periféricos y de células NK.
- Carcinomas parecidos a los linfoepiteliomas en distintos órganos como pulmón, timo, laringe, faringe y glándula salivar (Gatza, 2005, Klein, 2007, Williams, 2006, Young, 2004) (TABLA5).

TABLA 5. Tumores asociados a EBV.

TUMOR	ASOCIACION con EBV	ANTIGENO EXPRESADO	LATENCIA
Linfoma de Burkitt	100 % (endémico) 15-85 % (esporádico) 30-40 % (asociado a SIDA)	EBNA1	I
Carcinoma gástrico	100 % (indiferenciado) 5-15 % (adenocarcinoma)	EBNA1/LMP2	I/II
Carcinoma nasofaríngeo	100%	EBNA1/LMP2	I/II
Linfoma T	100%	EBNA1/LMP2	I/II
Hodgkin	40-60%	EBNA1/LMP1/LMP2	II
PTLD	90%	EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP, LMP1, 2	III

### 1.3.2.9. La latencia de EBV

Los herpesvirus son el ejemplo clásico de agentes que establecen infecciones latentes de por vida tras la infección primaria. Las infecciones latentes son definidas como aquellas en las que persisten copias completas del genoma viral sin que se produzca virus infeccioso. En general clínicamente son inaparentes, pero pueden reactivarse por inmunodepresión del hospedador y dar lugar a las lesiones típicas.

A pesar de ser un virus muy citolítico y poseer capacidad oncogénica, las infecciones por EBV son por lo general benignas. El virus persiste en los linfocitos B durante largos períodos de tiempo, en el cual el ADN viral se mantiene como episoma, transcribiendo un número limitado de genes que no incluyen proteínas estructurales de la cápside.

A diferencia de lo que ocurre con los *alfaherpesvirus*, que establecen latencia en células terminalmente diferenciadas (neuronas), el EBV lo hace en células que se dividen, por lo tanto, debe no solo evadir la respuesta inmune del hospedador, sino que además debe replicar su genoma para asegurar su permanencia en las células hijas.

Los genes que se expresan en la latencia son:

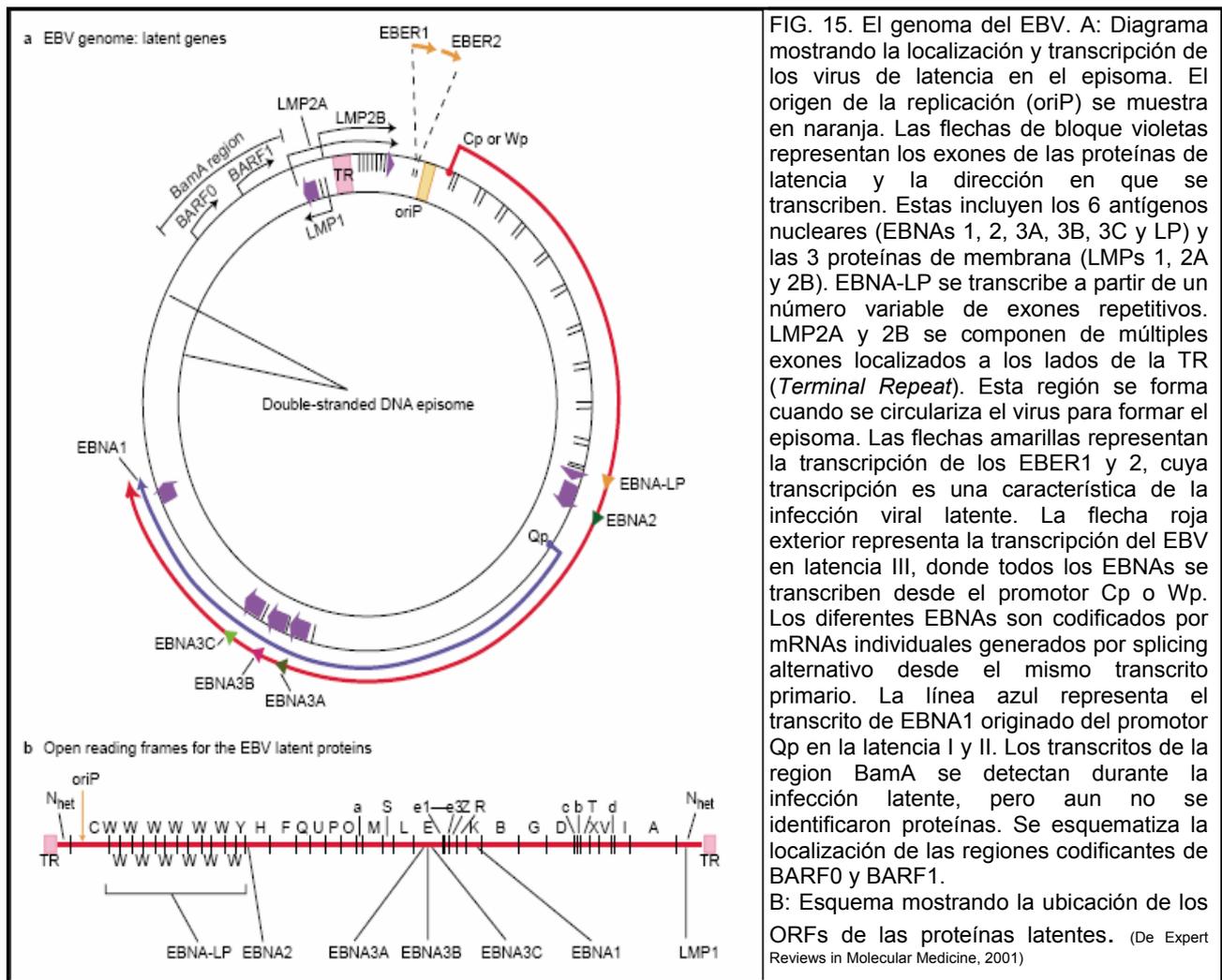
- El antígeno nuclear EBNA1, que es la polimerasa viral capaz de unirse al origen de replicación del genoma del EBV (OriP) y replicar el episoma para garantizar la permanencia en los linfocitos que se dividan. Además, induce la expresión de los genes RAG-1 y RAG-2 lo que podría favorecer las traslocaciones cromosómicas encontradas en el linfoma de Burkitt. No desencadena respuesta citotóxica.
- EBNA 2, 3A, 3B, 3C, y LP, que se relacionan con la transformación de los linfocitos. EBNA2 favorece la activación de las LMP y aumenta la expresión de los marcadores CD23 (que funciona como factor autócrino) y CD21 en la superficie del linfocito infectado. EBNA-LP favorece la transactivación del EBNA-2 sobre LMP-2 y puede formar complejos con p53 y Rb secuestrándolos.

- LMP1 y LMP2 (*latent membrane protein*), son proteínas de la membrana que se asocian a la vimentina celular y son potentes efectores de la inmortalización de los linfocitos. LMP1 es capaz de transformar células no linfoides, y estimula la vía del NF- $\kappa$ B lo que lleva al aumento de la mitosis. Es la primera proteína viral potencialmente oncogénica, siendo esencial para la transformación de células B (Kaye, 1993). Esta proteína es la responsable de la inducción de interferón (IFN), cuyos efectos previenen de una infección viral posterior, y evitan la entrada del EBV en ciclo lítico (Xu, 2006). LMP1 actúa como un receptor que altera procesos de crecimiento, supervivencia y adhesión celular. Entre sus acciones se cuentan: inhibición de la diferenciación celular, aumento de los niveles de bcl-2 y A-20 lo que inhibe la apoptosis; es homóloga de algunas moléculas de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y al unirse a éste último desencadena una cascada de reacciones que implican a otros oncogenes como c-jun, otras proteínquinasa y moléculas de adhesión. No obstante, esta proteína es reconocida por el sistema inmune, el cual restringe su expresión a las fases más tempranas de la infección primaria (TABLA 6).

**TABLA 6. Genes de latencia del EBV**

Gen	Acción
EBNA1	Activa replicación y transcripción. Se une al origen latente del virus OriP. Mantenimiento del genoma. Esencial para la permanencia del virus en forma episomal. Podría inducir traslocaciones cromosómicas.
EBNA2	Activa la transcripción, esencial para la activación de LMP1
EBNA3A	Aumenta la proliferación celular. Antagonista de EBNA2. Muy antigénico
EBNA3B	Antagonista de EBNA2. Muy antigénico
EBNA3C	Activa la transcripción. Regula a CD21 y LMP1. Antagonista de EBNA2. Muy antigénico
LMP1	Activa la transcripción, induce proliferación celular. Une las proteínas TRAFs, activa NF-KB. Inhibe apoptosis, induce sobreexpresión de bcl2, IL10, oncogén.

Por último hay que citar dos ARNm que no se traducen en proteínas: son EBER-1 y EBER-2, los ARN más abundantes en las células con infección latente. Aunque la mayoría de los genes del EBV son transcritos por la ARN polimerasa II, los genes EBER lo hacen a través de la ARN polimerasa III. Estos genes comparten algunas características en común, entre las cuales se encuentra que están bastante fragmentados, con sus elementos codificantes muy dispersos a lo largo del genoma, a diferencia de lo que ocurre con los genes líticos, los cuales se encuentran menos fragmentados y son más compactos. Si bien los elementos de codificación están muy dispersos, los elementos de control de su expresión (promotores) están agrupados.



El primer promotor que inicia la transcripción es el Wp que, mediante *splicing* alternativo, da origen a EBNA-LP y EBNA2. Esta última tiene un papel importante en aumentar la expresión de genes virales (EBNAs, LMP1 y LMP2) y celulares (CD23, CD21, c-myc) (FIG. 15)

### 1.3.2.10. Persistencia del EBV latente en células infectadas

La circularización del EBV en el núcleo de la célula infectada se produce entre las 12 a 24 horas posteriores a la infección. Las células no entran en fase S hasta que no se expresan todos los EBNAs y los LMPs. Los linfocitos que se replican y contienen EBV latentes, normalmente expresan muchas copias del mismo, por ejemplo en LCLs unos 10 por célula, siendo mucho mayor en linfomas de Burkitt (la línea celular Raji contiene unas 50 copias). Los episomas de EBV se replican al principio de la fase S, mediante la ADN polimerasa celular. A veces, el genoma viral se puede integrar y coexistir ambas formas, la integrada y la episomal, aunque esto no es lo habitual. La forma episomal es necesaria para la replicación en ciclo lítico.

### 1.3.2.11. Fases de latencia en EBV

El EBV puede establecer 3 programas de latencia (latI, latII y latIII), y cada uno se caracteriza por la expresión diferencial de proteínas. En los estados de latencia, el EBV persiste como episoma circular que se replica junto con la célula que lo alberga (Yates y Guan, 1991).

*Latencia tipo I.* Es la que se encuentra en biopsias frescas de linfoma de Burkitt, se caracteriza por la expresión de EBERs y EBNA1. Es la mínima expresión genética posible que interviene en el mantenimiento de la infección, no existiendo ningún blanco para el reconocimiento del sistema inmune.

*Latencia tipo II.* Es la que aparece asociada con mayor frecuencia al carcinoma nasofaríngeo. En este caso, además de expresarse los EBERs y el EBNA1, también se expresan las LMPs.

*Latencia tipo III.* Es la latencia típica de las células infectadas no transformadas, como así también las líneas linfoblastoides inmortalizadas con EBV (LCL) y los tumores de Burkitt mantenidos en cultivo. Este es el caso en que se expresan los antígenos nucleares EBNA 1 a 6, transcritos a partir de uno o dos promotores alternativos (Wp y Cp), las 3 proteínas de membrana (LMP1, 2A y 2b), además de los EBERs (Klein, 2007).

#### 1.3.2.12. Replicación del ADN viral de EBV en fase latente

El sitio donde se origina la síntesis del ADN del episoma localizado en los linfocitos B infectados se denomina OriP. Su actividad depende totalmente de la expresión de EBNA1 como así también de algunas proteínas celulares. OriP esta compuesto por dos elementos, el sitio FR (una familia de repeticiones) y el DS (simetría *dyad*), el cual esta localizado a 1 Kb de distancia. La replicación del ADN comienza en el elemento DS, el cual de une a EBNA1, y el elemento FR actúa como un intensificador de la replicación.

En fase lítica, este sitio sirve para la unión de la proteína Zta (BZLF1) que abre la doble hélice del ADN y dirige la maquinaria de replicación incluyendo la polimerasa, la helicasa y otras proteínas a este sitio.

#### 1.3.2.13. Epigenética y EBV

Es extraño, pero la infección de EBV está asociada con distintos cánceres en diferentes regiones del mundo. En Norte América y Europa, la infección del EBV está asociada con la enfermedad de Hodgkin, mientras que en China está asociada con el cáncer nasofaríngeo y en África con el linfoma de Burkitt. Casi todos los casos de linfoma de Burkitt en África presentan evidencia de infección con EBV, comparado con solo 15 a 20% de los casos en los Estados Unidos. Esto nos lleva a pensar que los factores ambientales pueden cumplir un papel importante en estas manifestaciones clínicas.

La epidemiología molecular del EBV permitió concluir que estos cuadros no se explican por diferencias genéticas entre las distintas cepas de virus, sino que debe haber otros factores que determinen el rumbo de la enfermedad. Por ejemplo, en la patogenia del carcinoma nasofaríngeo hay factores genéticos asociados con la población china, además de factores ambientales como por ejemplo los hábitos alimenticios, tabaco, etc. En el linfoma de Burkitt se describió una traslocación en la región distal del cromosoma 8 (donde se encuentra el gen *c-myc*) a los

cromosomas 14, 22 o 2 (que contienen varios *loci* de inmunoglobulinas), lo que provoca un aumento de los niveles de expresión del oncogén *c-myc*. Por lo tanto, la patogenia del linfoma de Burkitt podría deberse a una infección a temprana edad que produciría la inmortalización de linfocitos B, y con el tiempo la traslocación cromosómica previamente descrita que provocaría la activación de *c-myc*.

En el establecimiento de la infección latente, el EBV aumenta sus niveles de metilación, aunque los dominios regulatorios involucrados en el mantenimiento de la latencia (OriP) permanecen demetilados. La metilación extensiva de todos los genes líticos y sus elementos regulatorios probablemente ayuda a mantener la latencia por inhibir la expresión de los genes de ciclo lítico. El tratamiento de células infectadas con el virus latente con agentes que reducen la metilación del ADN activa el ciclo lítico.

La hipermetilación de las CpG silencia la transcripción de los promotores de EBV y juega un papel fundamental en la regulación de su latencia. Hay cuatro promotores que se encargan de la expresión de la proteína EBNA1. Entre ellos, Cp y Wp se encuentran frecuentemente metilados en los tumores, en tanto que la expresión de EBNA1 desde el promotor Qp (no metilado) se mantiene constitutivamente. De esta forma, el EBV se mantiene en latencia I y II y es capaz de evadir el sistema inmune y sobrevivir en los tumores.

Las implicaciones potenciales a nivel trasnacional y clínico de esta línea de investigación incluyen el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el cáncer, manipular farmacológicamente el estado de metilación de promotores virales en pacientes oncológicos, y de esta forma aumentar la antigenicidad y convertirlos en blanco para que sean destruidos por el sistema inmune.

#### 1.3.2.14. Uso del 5-aza en EBV

La demetilación de las CpGs del EBV en tumores puede llevar al reconocimiento y posterior destrucción de las células infectadas por los linfocitos T citolíticos (CTL), que es antígeno específico, por la reactivación de los promotores Cp y Wp que llevan a la expresión de EBNA3A, 3B y 3C. Por otro lado, si se activa el ciclo lítico, la expresión de BZLF1, BRLF1, BMLF1, BMRF1 y BALF2 entre otras, llevaría a la lisis celular además de la destrucción por los CTL. Además de esto, el tratamiento con 5-aza podría llevar a la reactivación de genes celulares hipermetilados que intervengan por ejemplo en procesos de apoptosis.

Hay algunos resultados en pacientes con carcinoma nasofaríngeo en los cuales la demetilación de los promotores de EBV reactiva la expresión de proteínas en células tumorales (Tao, 2006)

El 5-aza (*Decitabine*, *DAC*) se encuentra en ensayos clínicos para un amplio rango de tumores, entre los que se encuentran el síndrome mielodisplásico, el cáncer de colon, pulmón, renal y de cabeza y cuello.



Objetivos

---



## **2. Objetivos**

El trabajo presentado en esta tesis se desarrolló con el objetivo primordial de esclarecer la compleja de la relación entre la carcinogénesis viral y la epigenética.

Obviamente queda un largo camino por recorrer aún, pero tenemos confianza que los resultados generados en este trabajo arrojen un poco de luz sobre la biología de tan compleja enfermedad.

Podríamos dividir los objetivos de esta tesis en dos partes: los principales, referidos al análisis descriptivo del epigenoma de los virus ADN de doble cadena (en adelante el metiloma viral) que incluyen los datos generados a partir de la secuenciación; y los secundarios, derivados de los anteriores, enfocados a explicar un poco más allá de lo meramente descriptivo, la relación de los perfiles de metilación virales con la biología de la enfermedad, evaluando las interacciones virus-célula y la expresión de proteínas virales entre otras cuestiones.

Todo esto para intentar comprender los mecanismos que inducen la reactivación del genoma viral silenciado por metilación sólo en algunos pocos de todos los individuos infectados.

### **OBJETIVOS PRIMARIOS**

- Caracterización del metiloma completo de los papilomavirus humanos tipo 16 y 18, en muestras representativas de las distintas etapas de progresión de la enfermedad tumoral a la que se asocian.
- Caracterización del perfil de metilación de los promotores de todos los genes presentes en el virus Epstein-Barr.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Correlación del estado de metilación de los genomas virales con el estadio de la lesión al cual están asociados, lo que permitiría desarrollar un modelo predictivo.
- Analizar los cambios genéticos virales que acompañan la progresión tumoral, tales como adiciones, deleciones, mutaciones, etc.
- Confirmación de la integración viral en el genoma celular y su interrelación con la maquinaria de metilación de la célula hospedadora.
- Relacionar el grado de metilación del genoma con la expresión de las proteínas virales.
- Analizar el efecto de un agente demetilante en los cambios de metilación viral, y su correlación con el cambio de expresión de proteínas virales.
- Validar el uso de la técnica de MSP como reflejo fiel de los resultados obtenidos por secuenciación.
- Evaluar el efecto de la inducción del ciclo lítico en EBV en relación al grado de metilación de su genoma.



Material y Métodos

---



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua Mili-Q y fueron mantenidas a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

En orden alfabético estas fueron las soluciones utilizadas:

10% APS	Persulfato de amonio (Bio-Rad) 10% (p/v) en agua, conservado a -20° C
ADN <i>loading buffer</i>	Glicerol 30% (v/v) (Sigma) en agua, azul de bromofenol 0,05% (p/v) (Bio-Rad)
ADN <i>lisis-cell buffer</i>	Sucrosa 0,65 M (Sigma), Tris 20 mM pH 7.8, MgCl <sub>2</sub> (Merk) 10 mM, Triton® X-100 2% (v/v)
ADN <i>proteinasasa K buffer</i>	Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 0,1 M pH 8.3, NaCl 0,1 M, SDS 1% (v/v)
Agua DEPC	1 mL de 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) en 1000 L de agua destilada, autoclavar
dNTP 2 mM	Mezcla de cantidades equimolares de 100 mM de dATP, 100 mM de dTTP, 100 mM de dGTP, 100 mM de dCTP (Promega), diluyendo la solución resultante hasta una concentración final de 2 mM. La mezcla se alicuotó y conservo a -20° C
Etanol 70%	Etanol absoluto (Merk) 70% (v/v)
Etanol 75%	Etanol absoluto 75% (v/v) en agua DEPC
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, conservado a -20 °C
Isopropanol 80%	2-propanol (Merk) 80% (v/v)
Laemmlli	Tris-HCl 0,25 M pH 6.8, SDS 8% (p/v), glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol (Bio-Rad) 0,02% (p/v) y 2-B-mercaptoetanol 2 M
PBS	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma) 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma) 2 mM
RSB buffer	10mmol/L Tris pH 7.5, 10mmol/L NaCl, 3mmol/L MgCl <sub>2</sub> , 1 pastilla de Complete® Protease Inhibitor Cocktail EDTA Free por cada 50 ml de buffer agregada en el momento de su utilización
SDS 10%	Dodecilsulfato de sodio (Merk) 10% (p/v)
SDS-PAGE <i>resolving gel</i>	Solución comercial de acrilamida/bisacrilamida 30% 37.5/1 (Bio-Rad), Tris-HCl 0,38M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), APS (NH <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> ) 0,1% (p/v) y TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) 0,001%. Se ajusta la cantidad de

	acrilamida-bisacrilamida hasta llegar a una concentración final entre 7.5 y 15% dependiendo del peso de la proteína de interés
SDS-PAGE <i>running buffer</i>	SDS 0,1% (p/v), glicina 1,5% (p/v) y Tris-HCl 0,125 M pH 6,8
SDS-PAGE <i>stacking gel</i>	Acrilamida/bisacrilamida 37.5/1 al 5%, Tris-HCl 0,125 M pH 6.8, SDS 0,1% (p/v), APS 0,1% (p/v), TEMED 0,01%
SDS-PAGE <i>transfer buffer</i>	SDS 0,1% (p/v), glicina 1,5% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y metanol al 15% (v/v)
Solución de fijación	Metanol: ácido acético 3:1 (v/v)
Bisulfito de sodio	Metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , Sigma), disuelto en agua y ajustando el pH final a 5 con NaOH. Esta solución se prepara inmediatamente antes de utilizarla
TBE	Tris 0,044 M, ácido bórico 0,044 M, EDTA 1 mM
X-gal	beta-D-galactopyranoside, conservado a -20 °C

### 3.2. Muestras tumorales

El banco de tumores del CNIO proveyó el material en óptimas condiciones. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándares y bajo la supervisión y consentimiento del comité ético del centro.

**TABLA 7. Líneas celulares tumorales utilizadas para cada tipo de virus**

VIRUS QUE CONTIENE	TIPO TUMORAL	LÍNEA CELULAR
HPV16	Carcinoma de cérvix	Siha
		CaSki
		CLL-866
HPV18	Carcinoma de cérvix	C4I
		HeLa
		CCL-808
EBV	Linfoma de Burkitt	Raji
		Akata
		Namalwa
		Jiyoye
		Mutu-BL-III-CI-99
		Mutu-BL-I-CI-216
		Rael
	Linfoma de Burkitt (AKATA) con 8 horas de tratamiento IGG	Akata8
	Linfoma de Burkitt (AKATA) con 48 horas de tratamiento IGG	Akata48
	Linfoma no Hodgkin	Farage
	Línea linfoblastoide humana	AHH1
		CB-M1-Ral-Sto
		BL2126
	Línea linfoblastoide humana con síndrome ICF	GM08714
Virus wild type	EBV	
Línea linfoblastoide de marmoset	B95.8	
Carcinoma nasofaríngeo	C666-1	

### 3.3. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron obtenidas del *American Type Culture Collection* (Rockland, MD), del *Germany Collection of Microorganism and Cell Cultures* (DMSZ, Braunschweig, Alemania) y del *Coriell Institute for Medical Research* (Camden, NJ).

Las líneas celulares se cultivaron en Medio Mínimo Esencial Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y anfotericina B al 0,5%, mantenidas en un incubador humidificado a 37°C de temperatura y un 5% de CO<sub>2</sub>.

**TABLA 8. Tumores primarios utilizados para cada tipo de virus**

VIRUS QUE CONTIENE	TIPO TUMORAL	NOMBRE ASIGNADO
HPV16	noCIN	Carrier-1, 2, 3, 4, 5
	CIN I	Premalignant 1, 4, 7
	CIN II	Premalignant 2
	CIN III	Premalignant 3, 5, 6, 8
	Carcinoma cervical	SCC-32, 38, 1B, 2, 2B, 33
	Queratinocitos pre-inmortales	Pre-inmortal
	Queratinocitos inmortalizados	Inmortal
HPV18	noCIN	Carrier-1, 2, 3, 4
	Carcinoma cervical	SCC-1, 2, 3, 9, 10
	Queratinocitos pre-inmortales	Pre-inmortal
	Queratinocitos inmortalizados	Inmortal
EBV	Linfoma de Burkitt	T2
		T16
	Linfoma no Hodgkin	T3
		T8
		T15
	Linfoma de Hodgkin	T5
		T10
	Linfoepitelioma	T1
		T12
	Linfadenitis reactiva	T4
		T9
	Mononucleosis infecciosa	T6
Desorden proliferativo post-transplante	T14	

Para desprender las células de las placas, se aspiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se incubaron 5 minutos con tripsina (Sigma) a 37° C. Después se agregó medio de cultivo nuevo y se pipetearon las células para desagregarlas.

El pasaje de las líneas celulares se realizó cada 72 horas, diluyéndolas entre 5 y 10 veces aproximadamente.

### 3.4. Tratamiento con 5-aza-2-deoxicitidina

Todas las placas usadas para los experimentos se sembraron en paralelo y con la misma densidad de células.

24 horas después de sembrar las células, se agregó 5-Aza (Sigma) a una concentración final de 1  $\mu$ M y se incubó durante 72 horas, con una renovación del medio y de la droga cada 24 horas.

El stock de droga se conservó a -20° C. Como control se utilizó el vehículo que en este caso fue agua MiliQ.

### 3.5. Extracción del ADN de células en cultivo

Una vez levantadas las células de las placas de cultivos, el pellet se resuspendió en 2 ml de PBS y otros 2 ml del buffer de lisis (*ADN lysis buffer*), se mezcló por inversión y se incubó en hielo 10 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 1800 g en frío, descartando el sobrenadante y conservando el pellet que contiene los núcleos celulares. Se agregó 0,5 ml del buffer proteinasa K (*ADN proteinasa K buffer*) con 50  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml, Roche) y 20  $\mu$ l de ARNasa a cada muestra, incubando posteriormente a 37° C durante toda la noche.

A continuación, se transfirieron las muestras a tubos PLG (Phase Lock Gel®, Eppendorf) y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en tubos limpios, se agregó 0,5 ml de fenol-cloroformo y se incubó en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó nuevamente 5 minutos a 13.000 rpm, recuperando nuevamente la fase acuosa y repitiendo el procedimiento con el fenol-cloroformo y los tubos PLG. El ADN se precipitó agregando 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M y 1,5 ml de etanol absoluto. Los tubos de invirtieron varias veces y se incubaron 3 horas a -80° C. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos en frío, tras lo que se realizaron 2 lavados con etanol 70%, se dejó secar el pellet y se resuspendieron posteriormente en 20  $\mu$ l de agua MiliQ.

### 3.6. Análisis del estado de metilación de las islas CpG

El perfil de metilación de los genomas virales se estudiaron mediante dos técnicas ampliamente difundidas: la secuenciación de bisulfito y la MSP. Para ambas es imprescindible realizar un paso previo de modificación del ADN que se pretende analizar con bisulfito sódico.

#### 3.6.1. Modificación del ADN con bisulfito sódico

El fundamento de esta modificación es que cuando el ADN se incuba a pH ácido con bisulfito, las citosinas se desaminan a uracilo en caso de que no estén metiladas. Pero si el anillo de citosina está metilado en su posición 5', permanece como tal tras el tratamiento (Wang, 1980). Esta modificación selectiva es la que permite el análisis del estado de metilación del ADN mediante distintas técnicas. En este estudio se utilizaron 2 técnicas ampliamente difundidas, basadas en la amplificación por PCR. Una de ellas es la que se conoce como PCR específica de metilación (MSP) y la otra es la secuenciación genómica de bisulfito. La MSP brinda información sobre el estado de metilación de las citosinas incluidas en los primers, mientras que

la secuenciación con bisulfito detalla la metilación de las citosinas que se encuentran en la secuencia amplificada entre los primers (*FIG 16*).

El tratamiento con bisulfito sódico se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Herman et al., (1996). Se comienza colocando 1 µg de ADN de la muestra a modificar en 50 µl de agua Mili-Q. A esto se le añaden 5,7 µl de NaOH 3 M, y se incuba a 37° C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN y prepararlo así para el posterior tratamiento con bisulfito sódico. Finalizado esto, se agregan 33 µl de hidroquinona 20 mM (Sigma) y 530 µl de bisulfito sódico 4,3 M pH 5 (Sigma) que se preparan frescos en el momento previo a su utilización, ya que se degradan rápidamente en solución acuosa. Se homogeniza bien la mezcla y se deja incubando 16-17 horas a 50° C cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la luz.

La purificación del ADN se llevó a cabo utilizando el Wizard ADN Kit Clean-up® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez eluido el ADN, se desulfona con 5,7 µl NaOH 3 M, y se precipita con 1 µl de glucógeno 10 mg/ml, 17 µl de acetato de amonio 10 M y 450 µl de etanol frío 100%. Se incuba 3 horas a -80° C. Después se centrifugan las muestras 20 minutos en frío a 13.000 rpm, se lava el pellet con 1 ml de etanol 70% frío, se vuelve a centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm en frío y se deja secar el pellet para luego resuspenderlo en 25 µl de agua Mili-Q.

### 3.6.2. Secuenciación del ADN modificado con bisulfito

Los oligonucleótidos utilizados en este caso, no deben contener en sus secuencias ningún sitio potencial de metilación. Fueron también diseñados con el Methyl Primer Express® (Applied Biosystems) de manera que cubrieron todo el genoma viral del HPV16, HPV18 y todas las regiones promotoras de los genes del EBV. La secuenciación se realizó en el secuenciador de ADN ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems) y se analizó utilizando el software *Sequencing Analysis 5.2* (Applied Biosystems).

En las tablas del ANEXO II se listan todos los primers utilizados en secuenciación, MSP y RT-PCR.

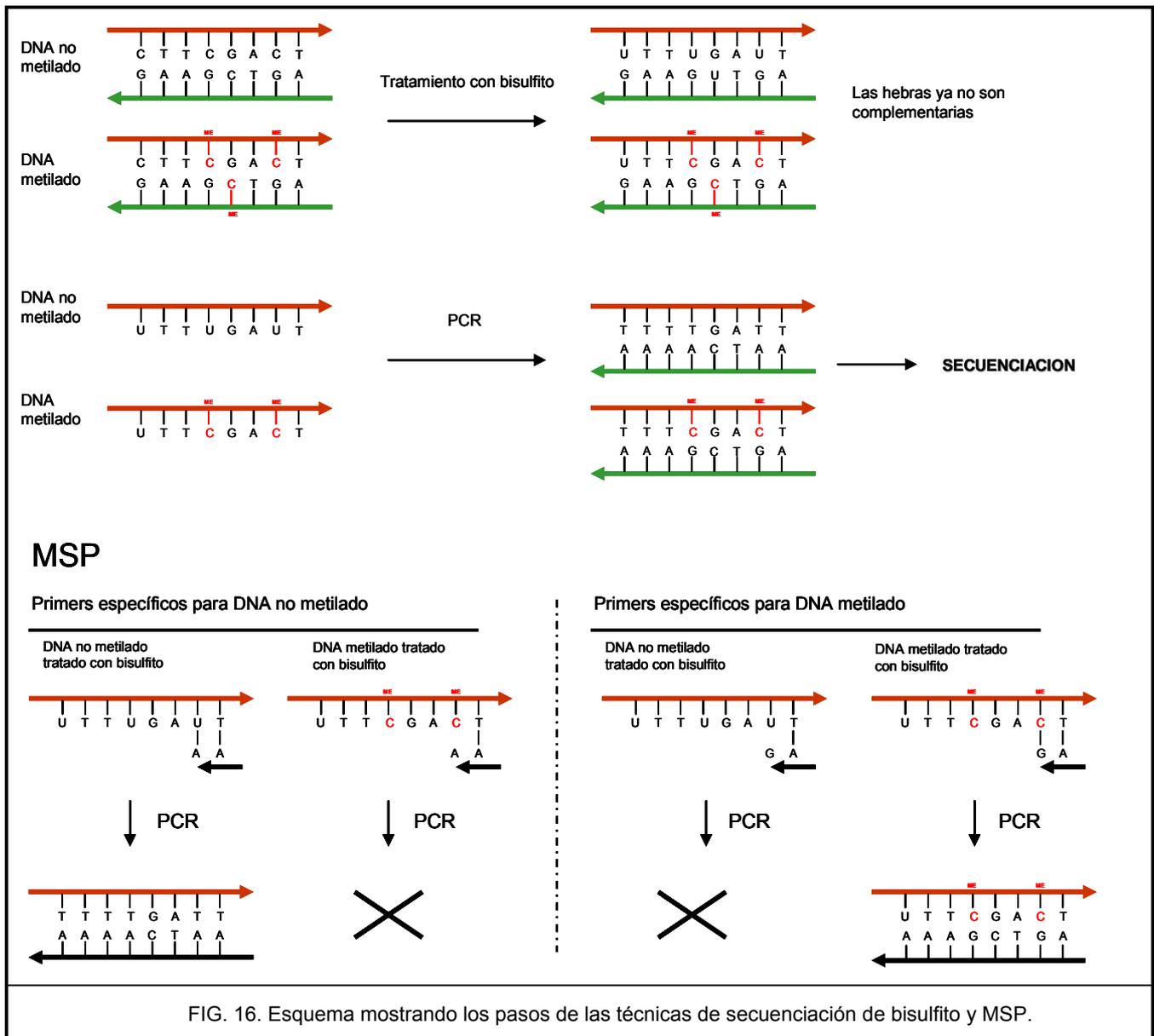


FIG. 16. Esquema mostrando los pasos de las técnicas de secuenciación de bisulfito y MSP.

### 3.6.2.1. PCR

Para el estudio de la metilación por secuenciación, se utilizan 50 ng de ADN modificado con bisulfito sódico como molde para amplificar por PCR los segmentos de interés. Se prepara la siguiente mezcla para cada muestra:

- 5 µL of 10X de Taq-polymerase-specific buffer (Ecostart)
- 1.5 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5 µL de 2 mM dNTPs
- 0.125 µl de cada primer (100 µM)
- 0.2 µL de Fast start Taq ADN Polymerase (Ecostart)
- Agua estéril hasta volumen final de 15µl

Este master mix se divide en tubos de 0,2 ml agregando luego 1µl de ADN de la muestra que corresponda. Se utiliza como control de posibles contaminaciones un tubo al que no se le agrega ADN.

Se realiza la amplificación del fragmento de interés por PCR, con las siguientes condiciones:

- a) 1 ciclo para desnaturalizar: 5 minutos a 95° C
- b) 40 ciclos de amplificación: 30 segundos a 95° C; *annealing*: 30 segundos a la temperatura específica del primer; elongación: 45 segundos a 72° C
- c) 1 ciclo de extensión final a 72° C durante 7 min.

Las secuencias amplificadas se corren en un gel de agarosa 2% (2 gramos de agarosa por cada 100 ml de TBE caliente) al que se le agrega 1% de bromuro de etidio para poder visualizar las bandas bajo luz ultravioleta. Las muestras se mezclan con 3 µL de buffer de carga de ADN y se corren los geles a 180 V durante 30 minutos.

### 3.6.2.2. Purificación del gel

Se recorta la banda de interés que se corresponde con el peso molecular buscado. Este ADN amplificado se extrae del gel con el kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6.2.3. Clonación

#### 3.6.2.3.1. Ligación:

Los fragmentos del ADN se clonaron en un plásmido específico que posteriormente se introdujo en bacterias *E. coli*. Para esto se utilizó el kit pGEM®-TEasy Vector (Promega).

Se colocan 5 µl del buffer 2X, 1 µl de ligasa T4 y 1 µl del vector por cada muestra. Se prepara el master mix y se alicuotan 7 µl en un eppendorf de 1,5 ml. A esto se le agregan 3 µl del producto extraído de la PCR, y se deja incubar a 4° durante toda la noche.

#### 3.6.2.3.2. Transformación:

Para esto se utilizaron bacterias competentes *E. coli* DH5α (Novablue®) que se conservan a -80 °C y se descongelan en hielo en el momento de usarlas.

Se agregan 50 µl de bacterias a los tubos que contienen las ligaciones, se resuspende suavemente y se coloca en hielo durante 20 minutos.

Luego se realiza el shock térmico colocando la mezcla a 42° C durante un minuto. Inmediatamente después, se colocan los tubos en hielo durante 2 minutos.

Se agregan 900 µl de medio SOC (Bacto triptone, Bacto extracto de levadura, NaCl y glucosa) y se incuba una hora a 37°C en agitación (300 rpm).

Se centrifuga 1 minuto a 4000 rpm para concentrar las bacterias, se descartan aproximadamente 800 µl del sobrenadante y se siembra el resto en placas de agar LB-IPTG-Xgal ya precalentadas.

Se incuba a 37°C toda la noche.

Posteriormente se seleccionan aleatoriamente al menos 8 clones por muestra mediante el sistema X-Gal del vector que permite diferenciar los clones positivos que contienen el plásmido con el inserto por su color blanco, de los clones azules que solo contienen el plásmido sin inserto.

#### 3.6.2.3.3. Minipreps (Montage plasmid miniprep, Millipore®)

Este kit se utiliza para purificar el plásmido de ADN.

Lo primero que hay que hacer es pasar las colonias blancas de la placa de agar a medio líquido. Para esto se utilizan placas deep-well de 96 pocillos con 1250 µl de medio LB LOW SALT con ampicilina. Se traspasan las colonias y la placa se cubre con papel adherente agujereado, incubándose a 37° C toda la noche en agitación (250 RPM).

Al día siguiente, se centrifuga la placa 10 minutos a 1080 RCF, se descarta el sobrenadante de manera adecuada, resuspendiendo el pellet en 200 µl de agua Mili-Q, y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Se vuelve a descartar el sobrenadante y esta vez se usan 100 µl de la solución 1 del kit para resuspender.

Luego se lisan las células con la solución 2, se neutraliza la reacción con la solución 3 y se centrifuga otros 10 minutos a 1080 RCF.

Usando las placas que vienen en el kit, se hace pasar el producto por unas membranas hasta obtener el plásmido purificado.

Este producto es lo que se usa para secuenciar.

#### **3.6.2.4. Análisis de las secuencias**

Las secuencias obtenidas, se analizaron con “Sequencing Analysis 5.2” (Applied Biosystems®). Los alineamientos conseguidos fueron estudiados con el programa Bioedit. Todos los resultados de las secuenciaciones de los virus de este trabajo fueron incluidos en la aplicación “METHYLYZER” (ver ANEXO I).

#### 3.6.3. PCR específica de metilación (MSP)

Para cada uno de los genes analizados, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos utilizando el Methyl Primer Express® (Applied Biosystems). Una pareja amplifica la secuencia de interés en caso de que estuviera metilada y la otra pareja amplifica la secuencia en caso que las citosinas sean ahora uracilos (que se convierten en timinas tras el primer ciclo de PCR), que representan las que no estaban metiladas tras el tratamiento con bisulfito. Esto se traduce en que para cada muestra, se realizan dos reacciones de PCR por separado, utilizando 1 µl del ADN tratado (FIG. 16).

Las PCR se realizaron en un volumen final de 15 µl. Las muestras se corren en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo iluminación ultravioleta. La

presencia de una banda del peso molecular apropiado indica la presencia de los alelos no metilados y/o metilados en la muestra original.

Como control positivo de metilación, se utilizaron líneas celulares infectadas con los virus de interés (Raji, HeLa y CaSki) tratadas *in vitro* con la enzima Sss I Methyltransferase.

### 3.7. Análisis de la expresión proteica

#### 3.7.1. Obtención de proteínas virales

Para estudiar los niveles de expresión de las proteínas virales en las distintas líneas celulares utilizadas en el presente estudio, las células fueron lisadas con buffer RSB, en presencia de NP40 al 1% y resuspendidas posteriormente en Laemmli.

El extracto proteico fue alicuotado y conservado a -80° C.

#### 3.7.2. Ensayo de Western Blot

Para la separación de las proteínas se utilizo el protocolo descrito por Laemmli (1970).

##### 3.7.2.1. Electroforesis

La electroforesis de proteínas se realizó en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, '*polyacrilamide gel electrophoresis*').

En primer lugar se prepara 7,5 ml del gel separador (SDS-PAGE resolving gel) al 10%, colocándolo en cassettes plásticos Minigel Xcell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen) de 10 ml de volumen.

El gel se deja polimerizar a temperatura ambiente durante 30 minutos agregando 1 ml de isopropanol 100% en la parte superior para eliminar el contacto con el oxígeno atmosférico.

Una vez polimerizado, se retira el isopropanol y se lava la parte superior del gel con agua destilada. Se seca con papel el exceso de humedad y se procede a preparar el gel concentrador (SDS-PAGE *stacking gel*). Se colocan los peines de 1 mm de espesor y se deja polimerizar a temperatura ambiente unos 30 minutos.

Las muestras se colocaron en igual volumen y concentración en tampón de carga (Laemmli) en tubos de 1,5 ml. Posteriormente se desnaturalizan a 100° C durante 5 minutos y se mantienen en hielo hasta el momento de cargarlas en el gel.

Como marcador de peso molecular se utilizo Kaleidoscope prestained (Bio-Rad®).

La electroforesis se realizó a 25 mA y 150 V durante una hora en el tampón correspondiente (SDS-PAGE *running buffer*)

##### 3.7.2.2. Transferencia

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) de 45 µm (Immobilon-P, Millipore®) previamente activada en metanol durante 1 minuto.

La transferencia en el caso de las proteínas E6 y E7 de HPV16, se realizó en una cubeta Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) durante 1 hora a 300 mA en el tampón correspondiente (SDS-PAGE *transfer buffer*). En el caso de la proteína E2 del HPV 16 y la EBNA2 de EBV, se realizó transferencia semiseca, 1 hora a 16 V y 350 mA.

### 3.7.2.3. Inmunodetección con anticuerpos específicos.

El bloqueo de los sitios inespecíficos en las membranas una vez terminada la transferencia se realizó en leche (Difco®) al 5% en PBS-Tween® (Sigma) al 0,1% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Posteriormente, las membranas se hibridaron con los anticuerpos primarios correspondientes en la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1% con leche al 2% (p/v), a 4° C durante toda la noche en agitación.

**TABLA 9. Anticuerpos primarios utilizados**

VIRUS	PROTEINA	REFERENCIA	DILUCION	SECUNDARIO 1:3000
HPV16	E6	N-17, SC-1584	1:200	Donkey-anti-goat-IgG
	E7	ED17, SC-6981	1:200	Donkey-anti-goat-IgG
	E2	TVG261, Ab17185	1:250	Rabbit-anti-mouse-IgG
EBV	EBNA2	DakoCytomaion M7004	1:100	Rabbit-anti-mouse-IgG

Al finalizar la hibridación, se realizaron los lavados con PBS-Tween 0,1%, en un total de 3, durante media hora a temperatura ambiente.

A continuación las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa correspondiente (HRD, *Horse radish peroxidase*) durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,1% durante media hora a temperatura ambiente.

Como sistema de detección de las proteínas marcadas se utilizó el *ECL plus® Western Blotting Detection Reagent* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las membranas se expusieron a películas fotosensibles de autorradiografía Ortho CP-G plus films (AGFA).

### 3.8. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina cuantitativo y medición por PCR cuantitativa a tiempo real (qChIP)

Para investigar la presencia de la proteína E2 en su sitio de unión en la región URR del HPV16, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), siguiendo el protocolo descrito por Frounier (2002) y utilizando el anticuerpo para E2 (TVG261, ab17185).

Brevemente, se realiza el entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas que interactúan con él mediante enlaces covalentes añadiendo formaldehído (Sigma) al 1,5% en las placas de cultivos confluentes. Se deja actuar 15 minutos a temperatura ambiente y se detiene la reacción agregando glicina (Fluka) 0,125 M. Los lisados celulares se sonicán durante 20 minutos en ciclos de 30 segundos a máxima potencia utilizando un Biorruptor (Diagenode, Liege, Belgium) para

obtener fragmentos de cromatina de aproximadamente 0,5 kb (*input*). La inmunoprecipitación de la cromatina unida a la proteína de interés se llevó a cabo añadiendo 20  $\mu$ l de anticuerpo primario específico en 2 ml de muestra.

Una muestra control fue procesada de igual modo, pero no se le añadió ningún anticuerpo (denominada muestra *no antibody*). El ADN unido a la proteína analizada se recupera mediante un proceso que incluye la captura del anticuerpo con proteína A-Agarosa (Upstate) y lavados sucesivos de 5 minutos con tampones de fuerza iónica creciente, para finalmente obtener el ADN inmunoprecipitado con el anticuerpo de interés. Tras cada lavado las muestras se centrifugan a 2600 g y se descarta el sobrenadante. Para recuperar el ADN unido a la proteína de interés, se eluye en SDS 1% y  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, se incuba durante 15 minutos, se centrifuga y se recupera el material precipitado (*FIG 17*).

A continuación se añade NaCl a 0,4 M y se incuban las muestras a 65° C durante 4 horas. Con esto se logra separar el ADN de las proteínas entrecruzadas. Tras la incubación, se añaden 2  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml (Invitrogen) y los tampones proporcionados por la casa comercial y se incuba 1 hora a 55° C. El ADN se purifica con fenol:cloroformo 1:1 y lavados con etanol 100% y 70%.

Se realizaron al menos 3 ensayos de ChIP independientes para cada línea celular. La amplificación por PCR se realizó en 20  $\mu$ l con primers específicos que incluían la región URR del HPV16.

La sensibilidad de la amplificación de la PCR se evaluó con diluciones seriadas del ADN del *input* después de la sonicación.

Tras la PCR de las diluciones seriadas, las fracciones unidas al anticuerpo de las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 2%. Se utilizó el *Input* como control positivo, y el *no antibody* como control negativo.

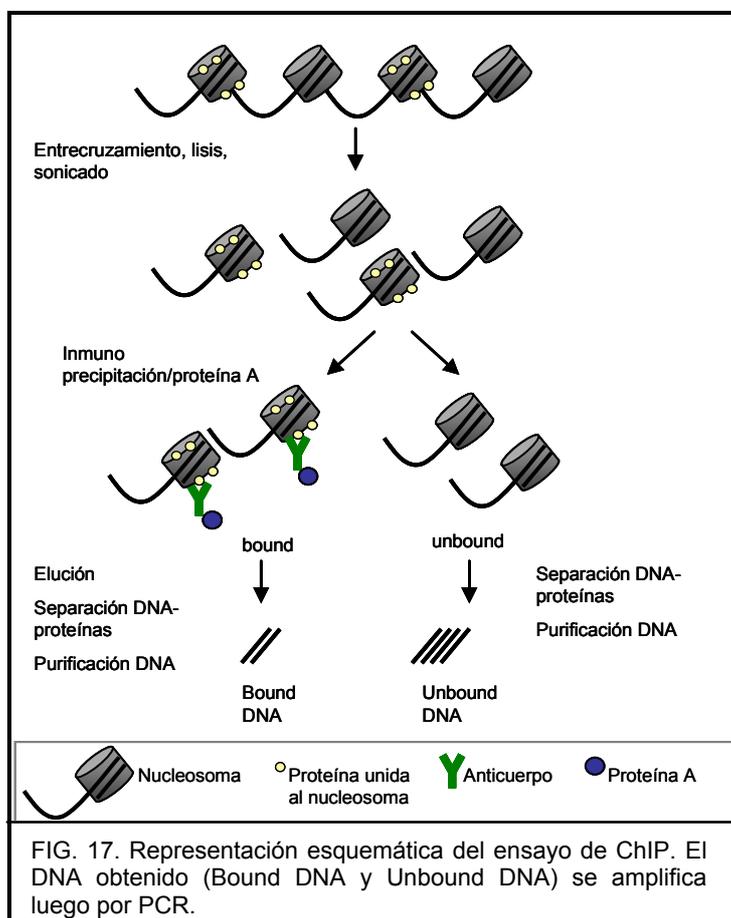
Para la PCR a tiempo real, se utilizó SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las curvas estándar se calcularon de las diluciones seriadas del ADN del *input* (100-0,1 ng). Tras la realización del ChIP, se evaluó el enriquecimiento relativo de las secuencias diana de E2 después de normalizarlas respecto a su ADN *Input*.

### 3.9. Extracción del ARN viral de líneas celulares

El ARN se extrajo mediante tratamiento con TRIzol® (Invitrogen, San Diego, CA). Las placas conteniendo las células se lavaron con PBS dos veces y luego se agregó el TRIzol (1ml cada 10  $\text{cm}^2$ ). Las células se recogieron raspando la placa y pasándolas a tubos de 1,5 ml donde se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añadió cloroformo (0,2 ml por cada 1 ml de TRIzol) y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos en frío a 13000RPM y se recogió el sobrenadante en tubos limpios. El ARN se precipitó con un volumen de isopropanol 100%, mezclando por inversión a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 13000RPM durante 20 minutos en frío, se lavó el pellet con

etanol 75% y se dejó secar. Para disolver el ARN, se agregaron 50  $\mu$ l de agua DEPC y se calentaron los tubos a 65° C durante 5 minutos.

La concentración de ARN final se midió en nanodrop, obteniendo en promedio de 1 a 3  $\mu$ g/ $\mu$ l. Las muestras de ARN se mantienen en hielo durante todos los procedimientos y se congelan inmediatamente después de terminarlos para su correcta conservación.



### 3.10. Ensayo de PCR de transcripción reversa (RT-PCR) semicuantitativa

Se retrotranscribieron un total de 2  $\mu$ g tratados con ADNasa I (Ambion), utilizando la transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies) con oligo-dT como cebador. Se emplearon 100 ng de cADN para la amplificación por PCR en 25-30 ciclos para determinar las condiciones apropiadas en las que se obtenían diferencias semicuantitativas en los niveles de expresión. Los primers se designaron entre diferentes exones para evitar la amplificación de ADN genómico. Las PCRs se llevan a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l con dos sets de primers, utilizando GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) como control interno.

### 3.11. Análisis de expresión de los genes virales por RT-PCR cuantitativa

Para la transcripción reversa se utilizaron 2  $\mu$ g de ARN tratados con TURBO ADN-free (Ambion, Austin, TX). Se empleó la transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies) con oligo-dT como cebador. Las reacciones de RT-PCR en un volumen final de 14  $\mu$ l contenían: los

primers *sense* y *antisense* del gen específico (350 nM), 7 µl de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) y 2 µl del cADN (10 µg/µl). Los primers fueron diseñados entre diferentes exones, de manera tal que se evitara la amplificación de ADN genómico.

La reacción se llevó a cabo en un ABI 7900 HT. Como control interno de la precisión de la carga y para asegurar la calidad del cADN se utilizó GAPDH.

### 3.12. Detección de los niveles de miR-BHRF1-1 por RT-PCR cuantitativa

La variación en la expresión del miRNA BHRF1-1 del EBV se evaluó mediante la técnica de RT-PCR, en la que se incluyó el ARN extraído de la línea celular AKATA antes y después del tratamiento con 5-aza.

El tratamiento con 5-Aza y la extracción del ARN se realizaron en las mismas condiciones antes descritas.

Una vez obtenido el ARN total, los miRNAs de la muestra deben someterse a un paso previo de poliadenilación.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 65 °C 5 minutos, un minuto en hielo, se agrega el mix de enzima, se incuba 50 minutos a 50 °C y por último a 85 °C 5 minutos. Al finalizar esto, se realizó la PCR cuantitativa.

Se preparó la mezcla de un volumen final de 12 µl conteniendo: 200nM del primer específico (idéntico a la secuencia del miRNA maduro), 200nM del primer universal para PCR cuantitativa, 0,24 µl de ROX Reference (esto se incluyó para normalizar la señal de fluorescencia), 6 µl de Platinum® SYBR Green SuperMix-UDG para PCR cuantitativa y 1,2 µl de una dilución 1:5 del cADN.

Para normalizar los niveles de expresión del EBV-miR-BHRF1-1 se utilizó la expresión de hsa-miR-16.

### 3.13. Ensayo de interferencia con siRNA

Los siRNAs son moléculas de ARN doble hebra de 20-21 nucleótidos perfectamente complementarias, que se originan a partir de un ARN largo de doble hebra.

Los siRNA específicos para las DNMT1 y DNMT3b fueron diseñados y sintetizados por Quiagen. El siRNA para E7 de HPV16 fue provisto por Genelink. Como control se utilizó el Scramble siRNA de Quiagen (que es un ARN que no inhibe la expresión de ningún gen).

Se realizó la transfección en las células adherentes en un 70% de confluencia utilizando Oligofectamina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células en suspensión fueron transfectadas electroporando 10 millones de células en 0,8 ml de PBS con 10 µg de siRNA a 250 V y 975 µF.

Inmediatamente antes de la transfección se eliminó el medio de cultivo y se añadió Optimem (Gibco) sin antibióticos ni suero fetal bovino. En 500 µl de Optimem se añadieron 5 µl de Oligofectamina y los si ARN a una concentración final de 0,2 µM. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente se añadió a las células que se incubaron durante 24 horas a 37° C en un incubador con atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se retiró el

Optimem y se añadió el D-MEM con SFB 10%. Las células se recogieron tras 48 horas y se realizó la extracción de ARN y utilizando primers específicos, se estudió la expresión de los genes por RT-PCR.

### 3.14. Ensayo de FISH

Este estudio nos permitió comprobar y cuantificar la presencia viral en las líneas celulares utilizadas.

Las células en cultivo se trataron con colchicina (0,5 µg/ml) incubando durante 4 horas a 37° C, y luego se recogieron de manera habitual. Para preparar las metafases, las células se resuspendieron en 2 ml de KCl 75mM y se incubaron a 37° C durante 15 minutos. Se centrifugaron 5 minutos a 2000 RPM, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de solución de fijación. Para preparar las extensiones, se deja caer una gota de esta mezcla sobre un portaobjetos limpio, y se deja secar al aire.

Los BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) cuyos clones contenían la región genómica completa de los virus fueron utilizados para crear las sondas para el FISH. El BAC para el HPV16 fue gentilmente donado por el Dr. Pulivarthi H. Rao (Texas Children's Cancer Centre, Baylor College of Medicine, 6621 Fannin Street, MC 3-3320, Houston TX, USA). El Dr. Teru Kanda (Center for VirusVector Development, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0815, Japan) gentilmente donó el BAC para el EBV.

Todos los BACs fueron marcados directamente con el protocolo de "Nick Traslation", siguiendo las especificaciones del fabricante, utilizando CGH Nick Traslation Reagent Kit con Spectrum Red dUTP (Abbot Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA). Las sondas se bloquearon con Cot-1 Human ADN (Roche Diagnostic Corporation, Indianápolis, IN, USA) para suprimir las secuencias repetitivas.

#### 3.14.1. Preparación de la muestra

Para lograr el envejecimiento de las suspensiones citogenéticas, se calentaron en una placa térmica a 90° C durante 10 minutos. A continuación, se deshidrataron sumergiendo los portaobjetos por una serie de alcoholes de graduación creciente (70%, 80% y 100%) durante 3 minutos en cada uno.

#### 3.14.2. Preparación de la sonda

Se diluyó 1 µl de la sonda en 7 µl de buffer de hibridación LSI/WCP (Vysis Abbot Molecular Inc.) y 2 µl de agua MiliQ. Esta mezcla se calentó 5 minutos a 96° C para el *preannealing*.

#### 3.14.3. Hibridación, desnaturalización e incubación.

Se añadió la mezcla de hibridación sobre los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos. Se calentó a 75° C durante 1 minuto para desnaturalizar, y a continuación se dejó hibridar en cámara húmeda a 37° C toda la noche, envolviéndolos en Parafilm® y colocándolos boca abajo.

#### 3.14.4. Lavados post-hibridación.

Para eliminar las uniones inespecíficas que se producen en la hibridación, se realizaron una serie de lavados con soluciones específicas. La primera de estas soluciones consiste en 0.4x

SSC (Saline-Sodium-Citrate) con 0,3% de NP40 que se utilizó durante 2 minutos a 75° C, después se lavaron con 2x SSC con 0,1% de NP40 durante 5 minutos a temperatura ambiente agitando y finalmente se lavaron en buffer PWB1 (Post Wash Buffer 1, Kreatech Biotechnology) durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Como tinción de contraste se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vysis Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) y se incluyeron en medio de montaje "VECTASHIELD" (Vector Laboratoires, Inc., Burlingame, CA, USA). El DAPI se intercala en el ADN y permite su visualización en color azul cuando se excita con una longitud de onda determinada.

Para la captura de las imágenes se utilizó una cámara CCD (Photometrics SenSys) acoplada a un microscopio Olympus BX. El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa CytoVision v. 3.1 (Applied Imaging, Newcastle, UK).

Resultados

---



## 4. Resultados

### 4.1. Primera parte: El metiloma de HPV16

#### 4.1.1. Secuenciación genómica de bisulfito: El metiloma del HPV16 sufre un progresivo aumento en la metilación de su ADN.

En primer lugar se realizó la secuenciación del metiloma completo del HPV16, incluyendo las 110 CpGs, en 21 muestras positivas para HPV16 que se correspondían con los distintos estadios de la enfermedad, incluyendo desde portadores asintomáticos (Carriers, n=5), lesiones precancerosas (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*, CIN, n=8), y carcinomas primarios (SCC, n=5). Para ampliar la visión general del metiloma del HPV16, también se incluyeron 3 líneas celulares establecidas de cáncer cervical (Caski, Siha y CLL-866).

##### 4.1.1.1. Perfil de metilación en muestras cervicales humanas.

El genoma viral fue dividido en 16 porciones, amplificando cada una por PCR y obteniendo al menos 8 clones por cada CpG para observar de este modo, cualquier potencial heterogeneidad en las muestras individuales (FIG. 18).

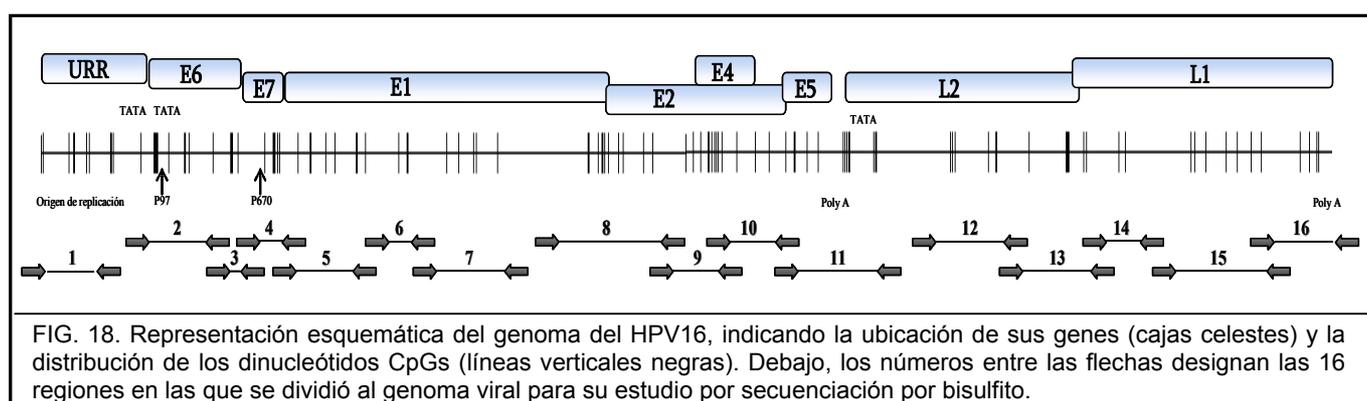


FIG. 18. Representación esquemática del genoma del HPV16, indicando la ubicación de sus genes (cajas celestes) y la distribución de los dinucleótidos CpGs (líneas verticales negras). Debajo, los números entre las flechas designan las 16 regiones en las que se dividió al genoma viral para su estudio por secuenciación por bisulfito.

En las figuras 19, 20 y 22 se ejemplifican algunos de los resultados obtenidos por secuenciación representativos de cada tipo de lesión. Las muestras correspondientes a portadores asintomáticos y displasia leve (noCIN, CIN I), se encuentran prácticamente desmetiladas a lo largo de todo el genoma. Desde el punto de vista genético, en ambos tipos de lesión no se observaron mutaciones, ni adición o delección de CpGs.

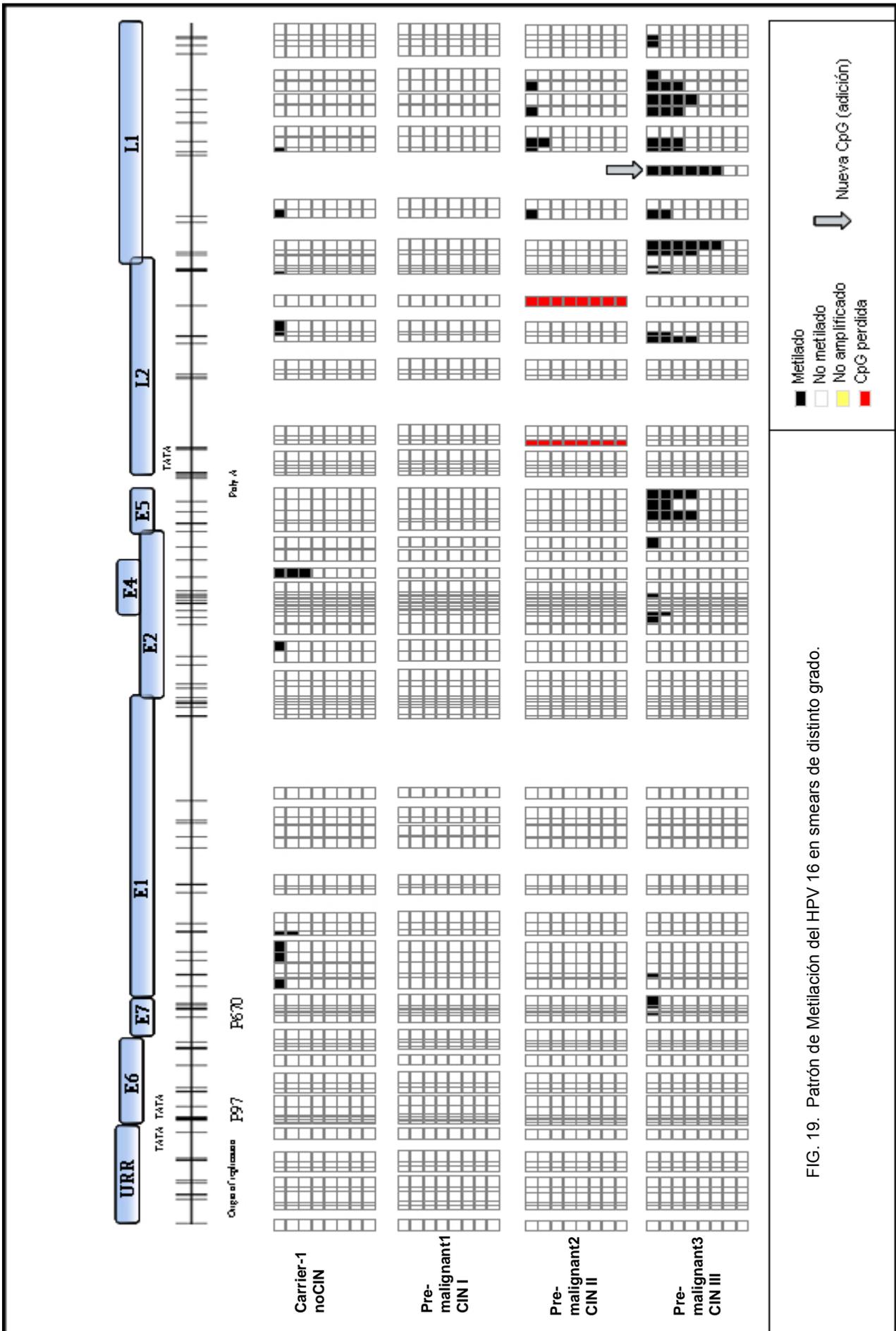
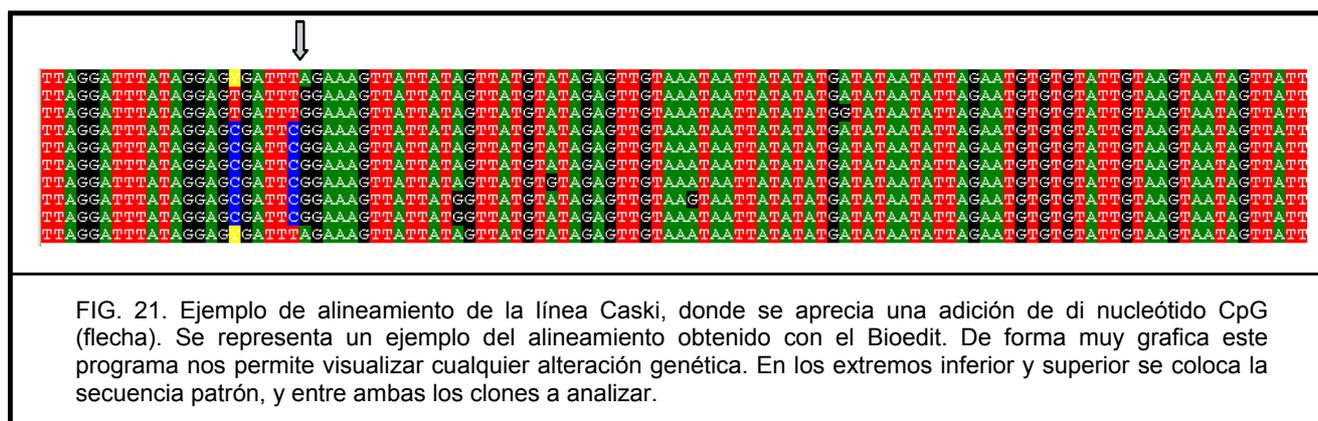


FIG. 19. Patrón de Metilación del HPV 16 en smears de distinto grado.

A medida que avanzamos en la gravedad de las lesiones, se encuentra que la metilación aumenta en forma muy gradual, como se ve en las muestras de displasia moderada y grave (CIN II y CIN III), observando en la primera de éstas la delección de 2 CpGs, y en la última la adición de una CpG, lo que se puede relacionar con un genoma más inestable, más característico de lesiones malignas.

Los carcinomas presentados en la figura 20 presentan ya un nivel de metilación más importante. En el caso particular de la muestra SCC32, encontramos que una pequeña región correspondiente al gen E2 estaba ausente, que como está descrito en la literatura, es una región que puede perderse en el momento de la integración (Vinokurova, 2008). Las muestras identificadas como SCC2 y SCC38 tienen ambas pérdida de una región más importante que corresponde a los genes E2 y primera mitad de L2. En el caso de la muestra SCC33, se logró secuenciar todo el genoma viral, demostrando que la pérdida de fragmentos virales en el proceso de linearización no ocurre en todos los casos.

Siguiendo la secuencia de eventos, las líneas celulares de cáncer cervical son las que presentan mayor porcentaje de metilación, sobre todo la línea CaSki, en la que incluso se vio la adición de una CpG (FIG. 21).



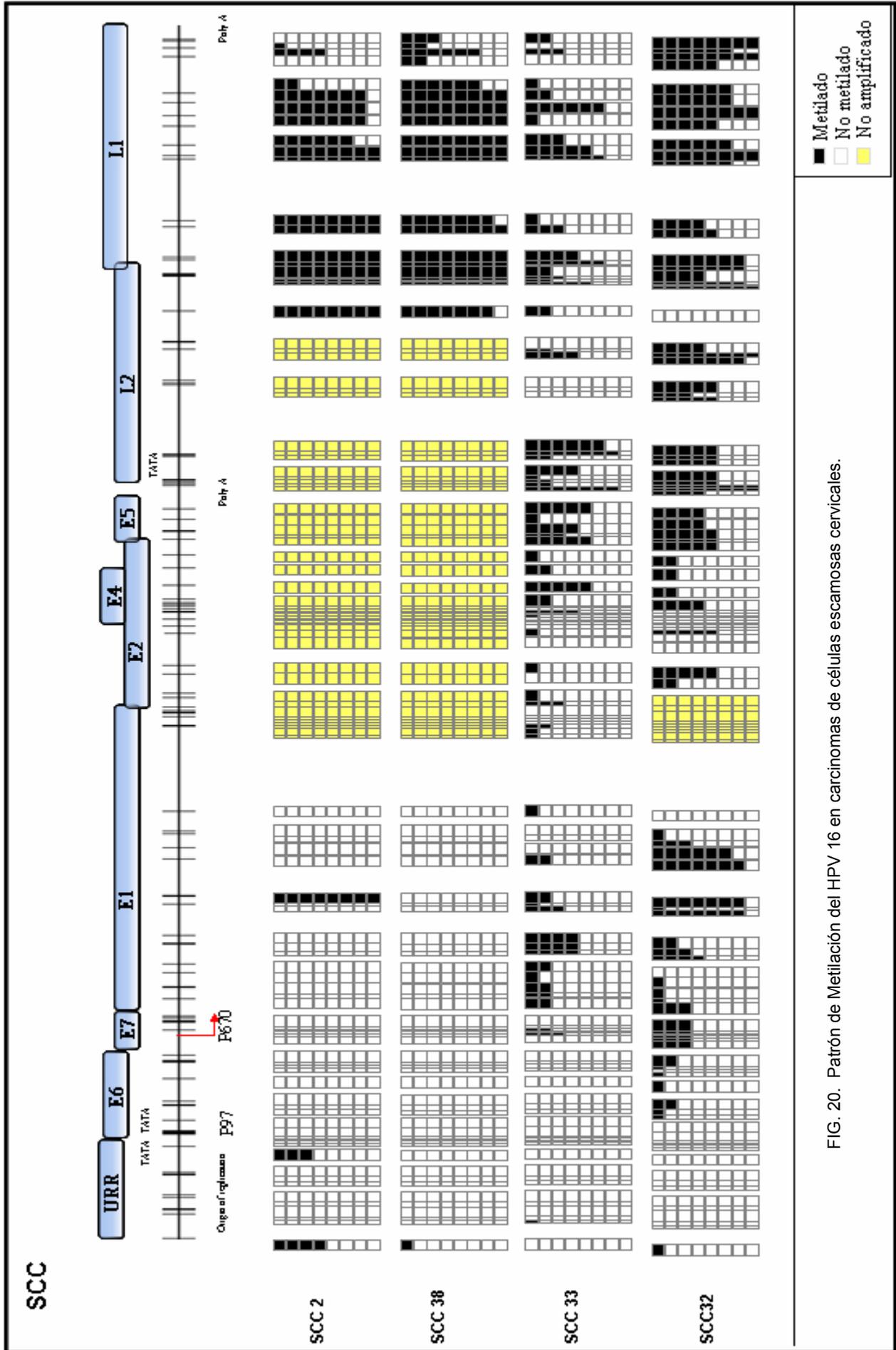
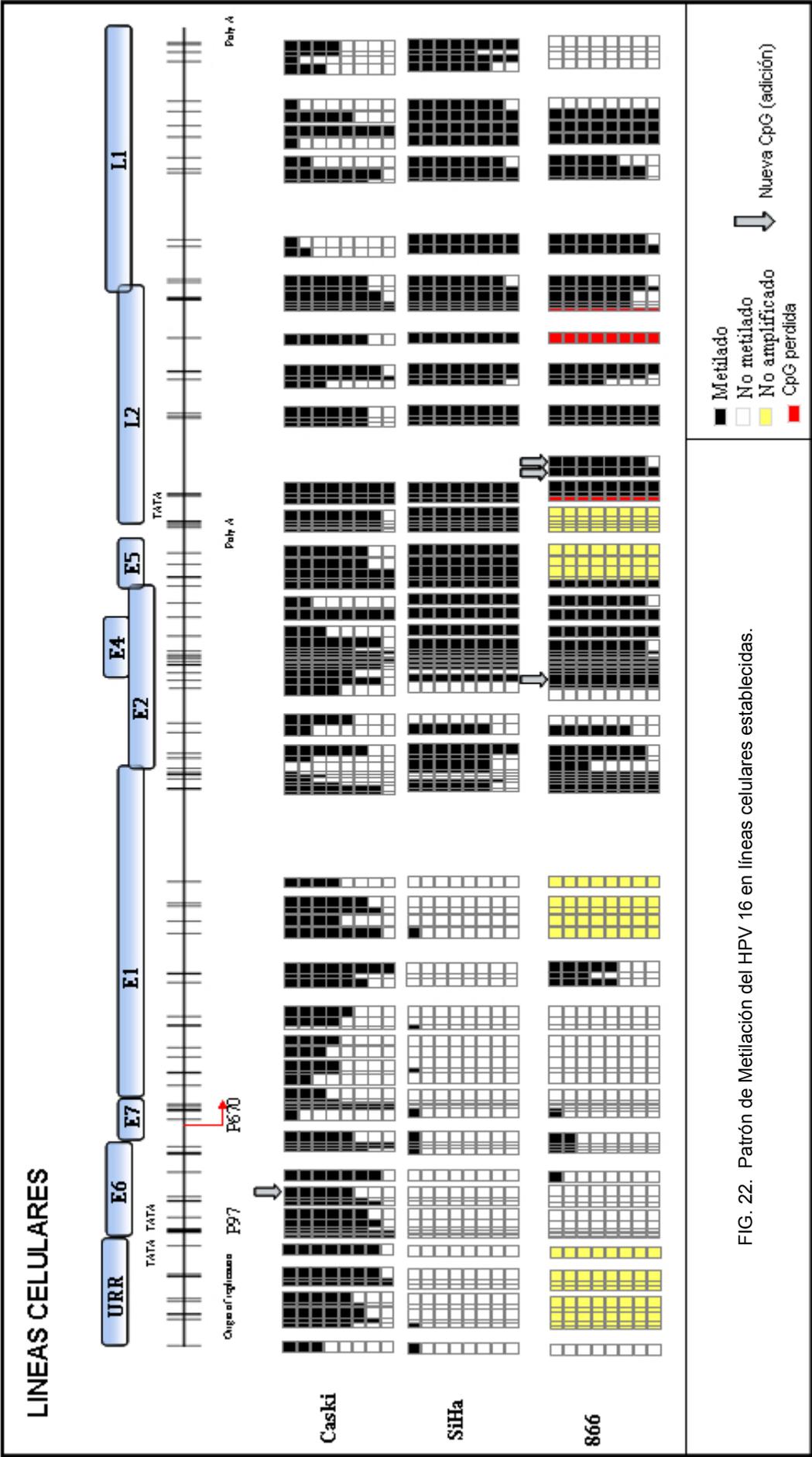


FIG. 20. Patrón de Metilación del HPV 16 en carcinomas de células escamosas cervicales.

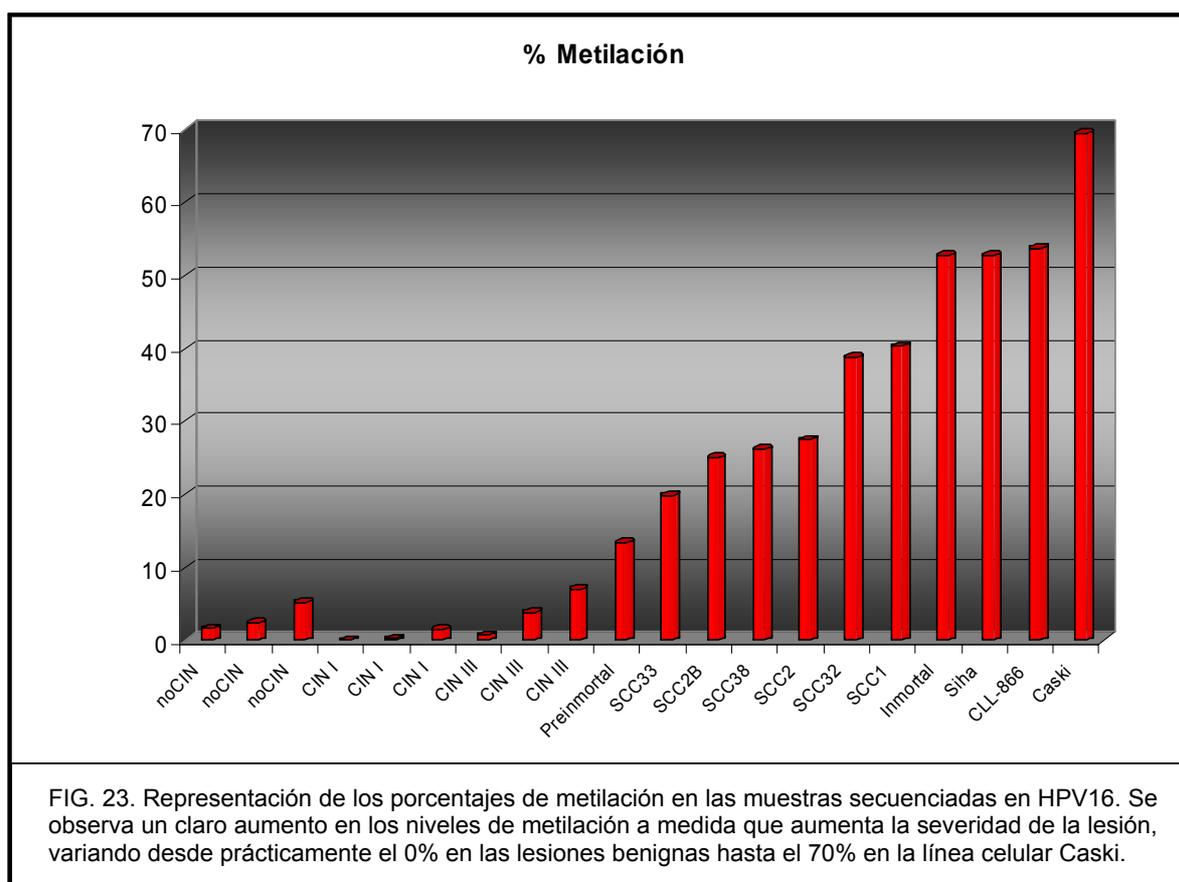


En la línea Siha, se observa una diferencia llamativa en la distribución de la metilación, encontrándose prácticamente desmetilada en la primera mitad, y altamente metilada al final, en las regiones correspondientes a los genes E2, E4, E5, L2 y L1.

En el caso de la línea CCL-866, se encontró el mayor número de alteraciones de tipo genéticas, incluyendo adición y pérdida de CpGs, como así también delección de algunas regiones intercaladas del genoma viral. Tal como se observó en Siha, en esta línea celular parecería que la metilación tiene una distribución bastante heterogénea, siendo mayor en la región correspondiente a los genes E2, E4, E5, L2 y L1 (FIG. 22).

Para ver de forma más gráfica estos resultados, en la figura 23 se representan los porcentajes de metilación obtenidos en estas muestras. En esta figura se puede apreciar muy claramente como la metilación aumenta a medida que avanza la gravedad de la lesión, variando de entre un 0% en las lesiones leves, hasta el 69,1% en la línea celular Caski.

De estos resultados, se puede concluir que existe una clara relación entre el nivel de metilación estudiado por secuenciación que presenta el virus HPV16 y la gravedad de las lesiones en las que se encuentra.

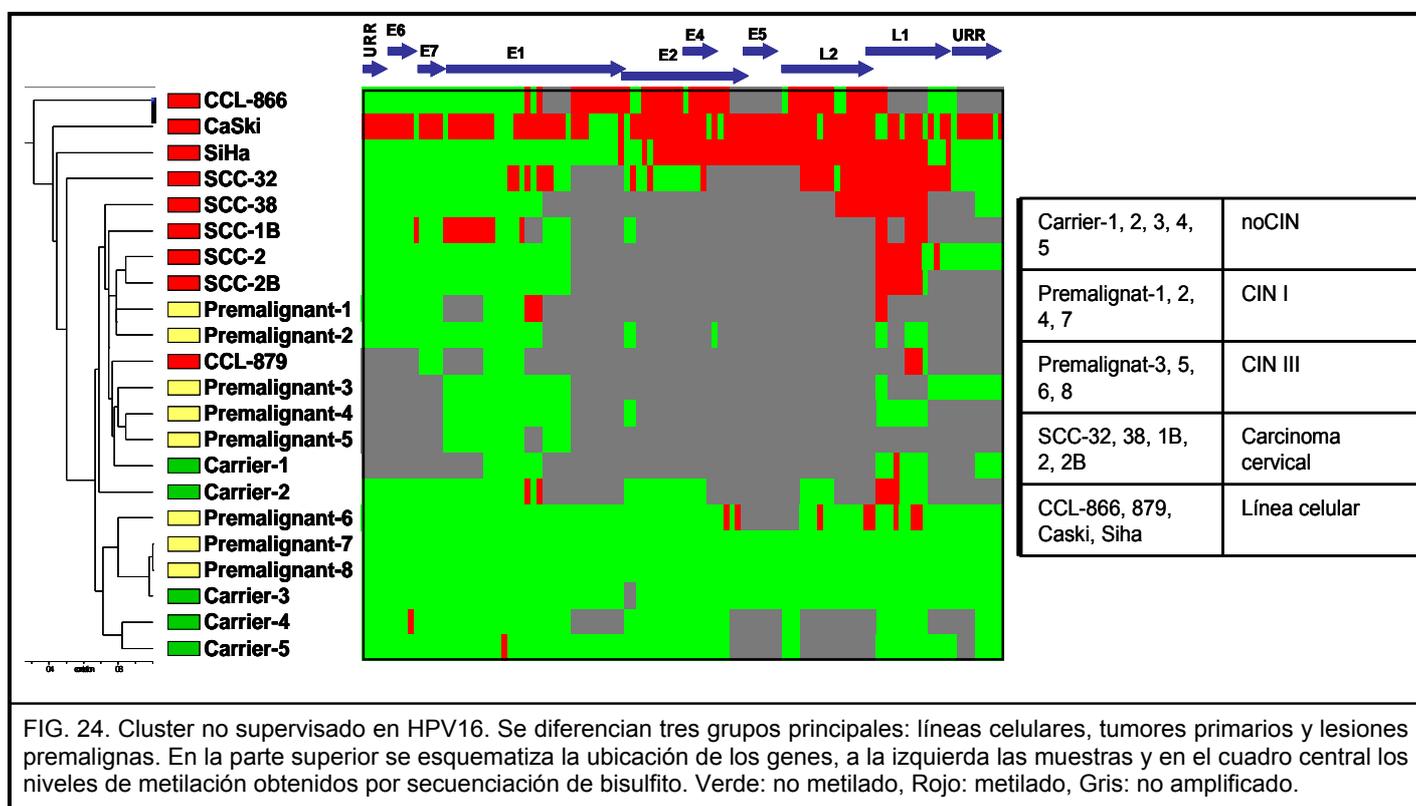


#### 4.1.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación

Esta representación gráfica permite asignar los datos a subcategorías del nivel de detalle buscado. Con este tipo de representación se puede apreciar claramente la relación entre los datos y los distintos grupos creados y hacerse una idea de los criterios por los cuales se crearon dichos grupos. De esta forma, las muestras que se ubican de forma adyacente son las más similares, y las que se encuentran más alejadas son las que difieren más.

Una vez caracterizado el perfil de metilación en todas las muestras seleccionadas, se planteó la posibilidad de que dicho perfil permitiera efectuar una agrupación de las mismas según el estado de metilación de sus CpG mediante técnicas de clustering no supervisado (FIG. 24).

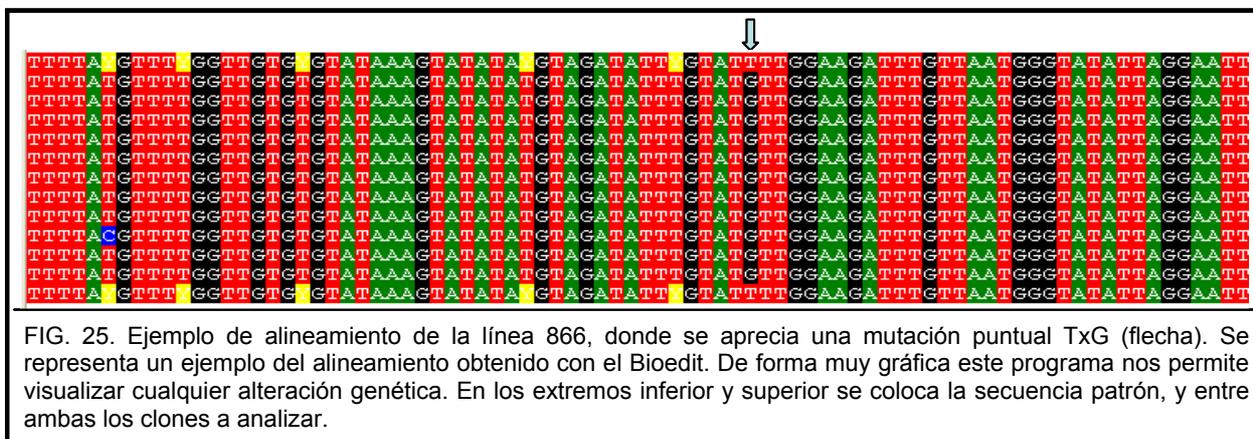
El principal hallazgo de este análisis es que el patrón de metilación de las distintas muestras en sí mismo permite clasificarlas en distintos grupos biológicos de acuerdo a la severidad de la lesión a la que pertenecen en: portadores, lesiones premalignas, tumores primarios y líneas celulares tumorales establecidas.



#### 4.1.3. Cambios genéticos o nucleotídicos en el genoma del HPV16

La secuenciación genómica por bisulfito, además de ser de suma utilidad para el análisis del estado de metilación de los dinucleótidos CpG, permite también identificar cualquier cambio putativo como pudieran ser mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en la secuencia de ADN original. Esto permite evaluar la contribución de estos posibles cambios en el propio virus en lo que se refiere a la transformación maligna. Además de las adiciones o deleciones de CpGs que aparecen ilustradas en algunos de los metilomas representados en las figuras anteriores, se observaron mutaciones del tipo sustitución de nucleótidos de forma heterogénea (FIG. 25).

A pesar de que en muchas muestras se encontraron alteraciones de este tipo, no fue posible establecer un patrón que asociara algún cambio genético con la progresión de la tumorigénesis cervical o bien relacionar alguna mutación en particular con su correspondiente lesión.

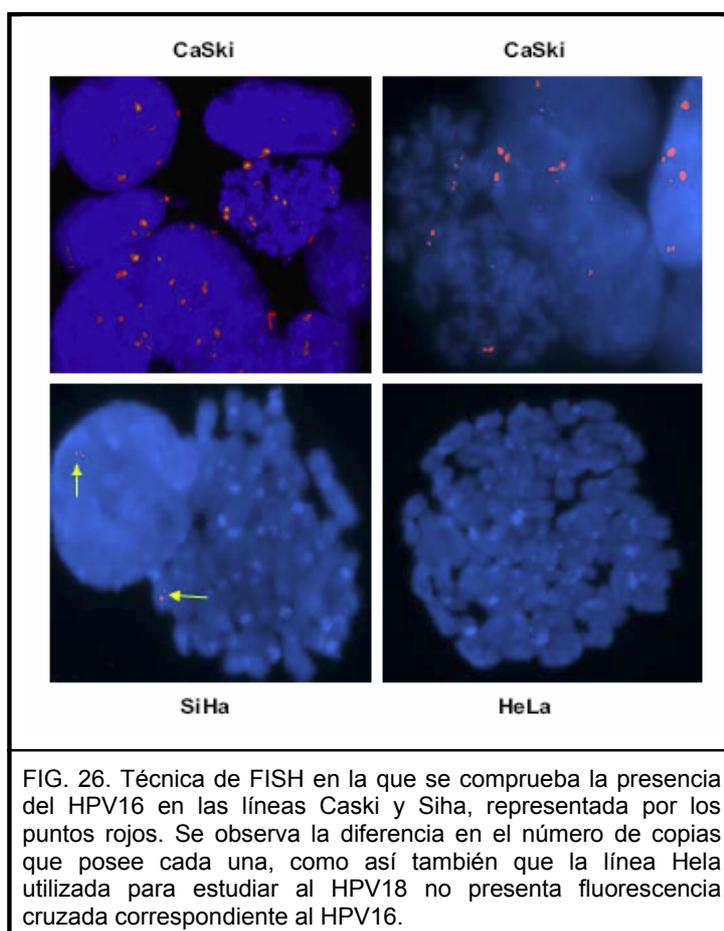


#### 4.1.4. Integración del genoma viral: El HPV16 se encuentra integrado en el genoma celular

Es sabido que el genoma del HPV16 no codifica para ningún gen de la maquinaria de metilación, como por ejemplo DNMTs. Esto significa que el virus se metila utilizando las enzimas de la célula que lo alberga.

La integración del HPV16 en el genoma celular ocurre en la mayoría de los tumores cervicales y en una proporción significativa de las lesiones precancerosas (Vinokurova, 2008). Con lo cual, es de esperar que la maquinaria de metilación celular reconozca estas secuencias ajenas a la célula y las metile.

Utilizando la técnica de FISH, se confirmó que el HPV16 se encuentra integrado en las líneas celulares de cáncer cervical CaSki y SiHa que fueron empleadas en este estudio, comprobando así también, que el virus aparece en distinto número de copias, siendo mucho más abundante en Caski (FIG. 26). Una de las posibles explicaciones de la



diferencia en los niveles de metilación visto en estas líneas, puede ser justamente la diferencia en la cantidad de virus integrado en el genoma celular.

Como control en la técnica de FISH se utilizó la línea de HPV18 Hela, en la que no se observa ninguna señal de hibridación cruzada para la sonda de HPV16.

#### 4.1.5. Estudio de la dinámica de la metilación

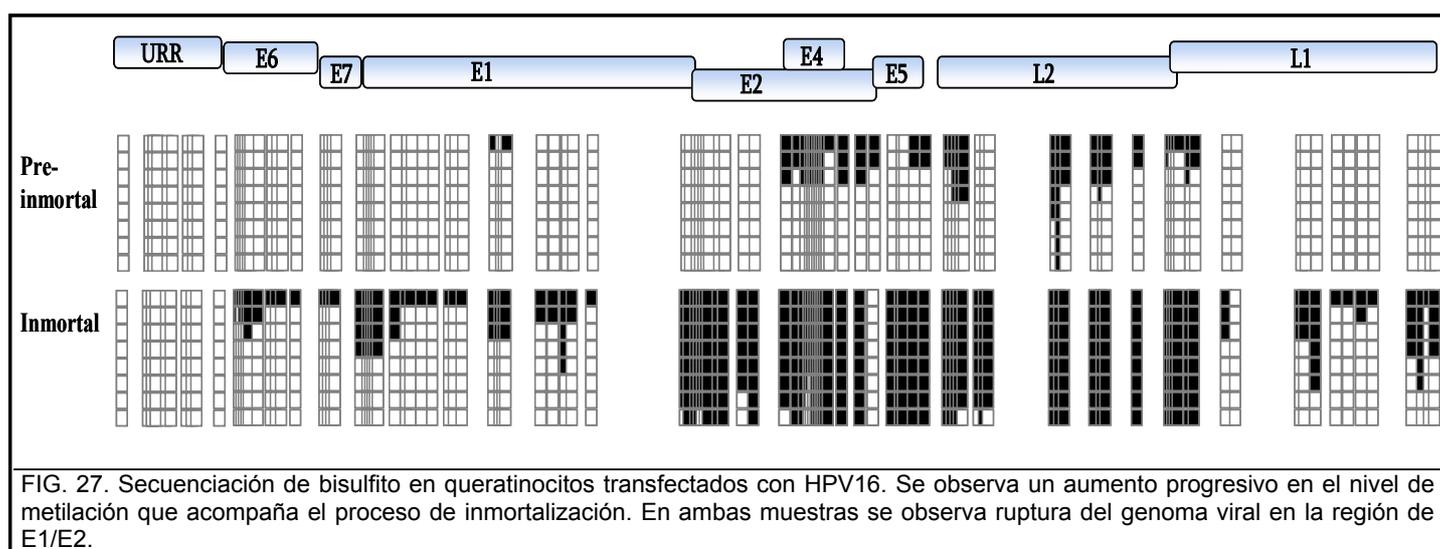
Como mencionáramos previamente, el metiloma viral experimenta cambios a lo largo del proceso tumorigénico. Para estudiar más a fondo este proceso, se transfectaron queratinocitos humanos derivados de prepucio con el genoma completo del HPV16 y se realizaron pasajes sucesivos hasta crear una línea inmortal.

A lo largo de los sucesivos pasajes, se evaluó la variación en el estado de metilación por secuenciación de bisulfito. Se tomaron dos puntos representativos del proceso, en el pase 13 (preinmortal) y el pase 95 (inmortal) (FIG. 27).

Se vio que a medida que aumentaban los pases también lo hacía el nivel de metilación viral, observándose prácticamente demetilado en el estado de preinmortalidad y densamente metilado cuando alcanzaba el estado de inmortalidad, sugiriendo una asociación entre la diferenciación y el estado epigenético del genoma del HPV16.

En cuanto a la distribución de la metilación, en ambas muestras se observa que la región comprendida entre los genes E2 y L2 presenta una mayor proporción de clones metilados en comparación con el resto del genoma viral, siendo obviamente más marcado en la muestra inmortal.

Numéricamente, la metilación varió del 11% en la etapa de preinmortalidad hasta el 57% en la etapa inmortal (FIG. 28).



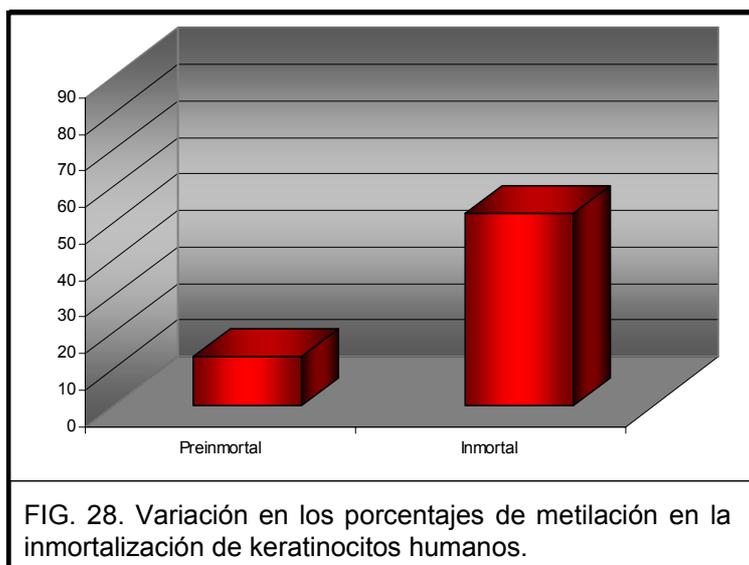


FIG. 28. Variación en los porcentajes de metilación en la inmortalización de keratinocitos humanos.

#### 4.1.6. Efecto del 5-aza-2'-deoxicitidina en la línea celular Caski

El 5-aza-2'-deoxicitidina es un análogo de la pirimidina que actúa inhibiendo la enzima ADN metiltransferasa y reduciendo la metilación de citosinas (Jones y Taylor, 1980), siendo también capaz de cambiar el patrón de diferenciación en células embrionarias de ratón cultivadas *in vitro* (Taylor y Jones, 1979).

Para profundizar el estudio de la relación entre el papilomavirus y la maquinaria de metilación celular, se trató la línea celular Caski con este compuesto. La respuesta obtenida fue una bajada en el nivel de metilación del genoma del HPV16. Lo interesante de este resultado es que a través de un compuesto que actúa sobre la maquinaria de metilación celular, se obtiene una bajada en la metilación viral, demostrando una vez más la íntima relación que existe entre ambas.

En la figura 29 se puede apreciar a modo de ejemplo la secuenciación por bisulfito realizada en dos secciones virales correspondientes a los genes E1 y L1, que se encontraban metiladas en la línea sin tratar, observándose la desmetilación de las mismas después del tratamiento. Cuantitativamente hablando, los niveles de metilación en estas regiones caen desde el 36,45% al 5,2% debido al tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina.

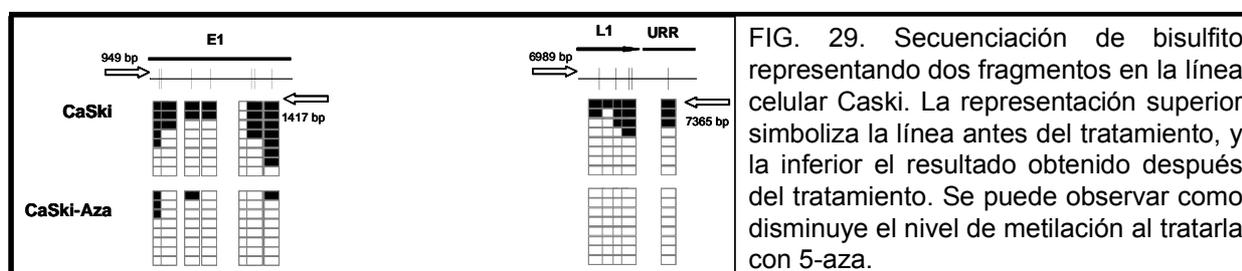
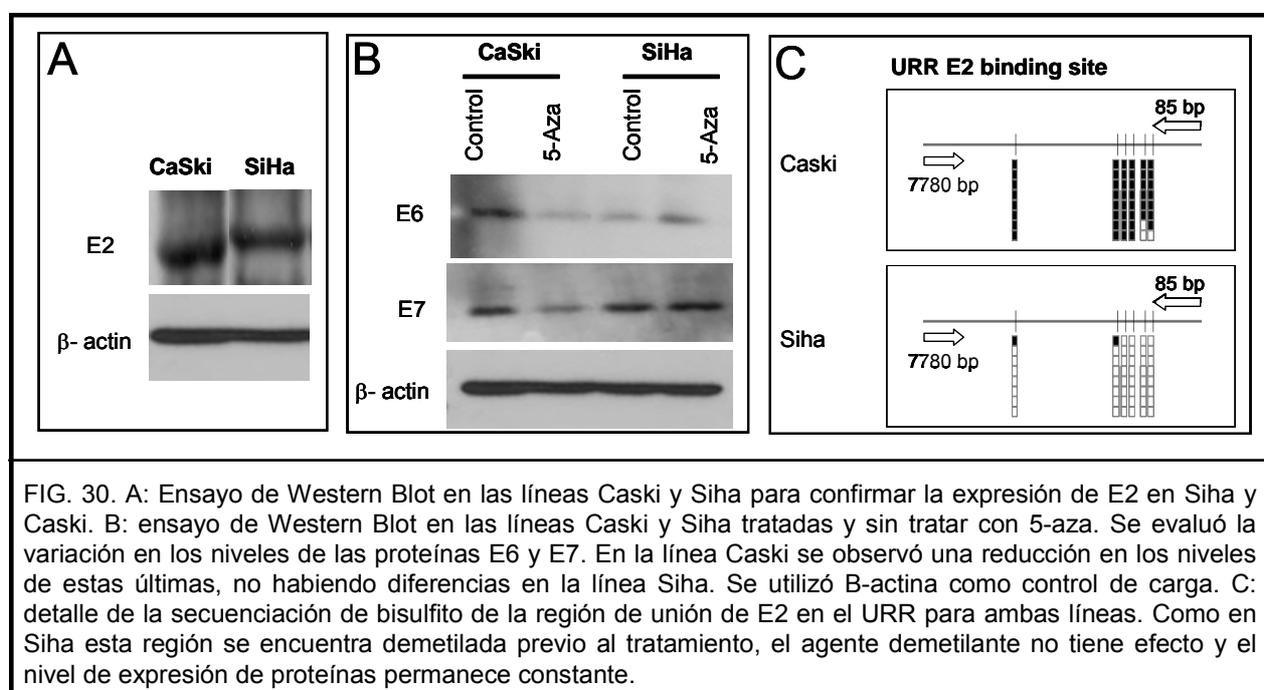


FIG. 29. Secuenciación de bisulfito representando dos fragmentos en la línea celular Caski. La representación superior simboliza la línea antes del tratamiento, y la inferior el resultado obtenido después del tratamiento. Se puede observar como disminuye el nivel de metilación al tratarla con 5-aza.

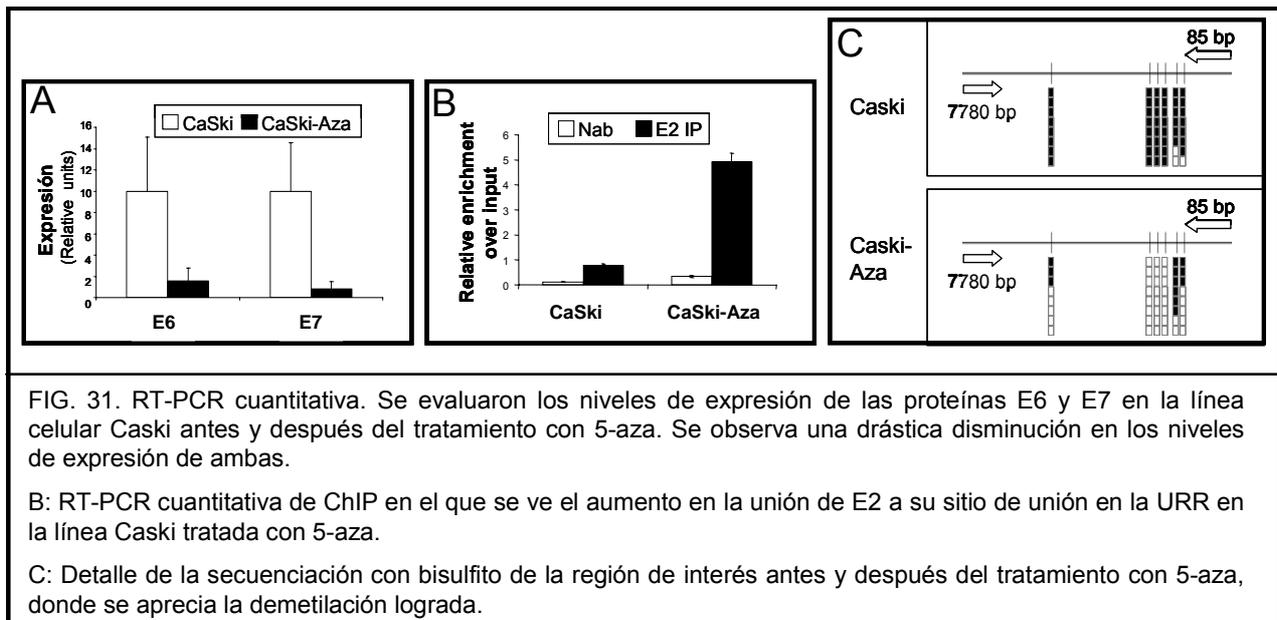
#### 4.1.7. Interacción entre la proteína E2, su sitio de unión en URR y la expresión de las proteínas E6 y E7

Las líneas celulares Caski y SiHa presentaban el genoma del HPV16 completo, por lo que se las utilizó para analizar la expresión de las proteínas virales. Para intentar comprender mejor los posibles efectos de la metilación respecto a la interacción de la proteína reguladora E2 con sus targets E6 y E7, se realizaron una serie de experimentos. Para comenzar, se confirmó que E2 se expresaba en ambas líneas celulares por ensayos de Western Blot (*FIG. 30A*).

Mediante esta misma técnica se observó también que el hecho de encontrarse metilado el sitio de unión de E2 en la región URR, se correspondía con una sobre expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7, y que su expresión disminuía tras el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina. Esto se pudo confirmar mediante la técnica de Western blot en la línea celular Caski. En cambio, en la línea SiHa, en la cual la región URR se encuentra demetilada, el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina, no produce cambios en el nivel de expresión de ninguna de las proteínas estudiadas (E6 y E7) (*FIG. 30B*).



Para profundizar aún más el estudio de estas interacciones, se efectuaron ensayos de ChIP, en el que se demostró que la proteína viral E2 es incapaz de unirse a su sitio en la región URR si este se encuentra metilado (*FIG. 31B*), llevando esto a la sobre expresión de las proteínas E6 y E7 (*FIG.31A*). Finalmente, induciendo la hipometilación en la región URR mediante el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina (*FIG. 31C*), se induce el reclutamiento de E2 a su sitio de unión en la región URR y de esta manera se observa una marcada reducción en los niveles de expresión de E6 y E7.



#### 4.1.8. Análisis del estado de metilación de la región L2 por MSP

Para confirmar los resultados obtenidos por la secuenciación de bisulfito, se realizaron estudios de PCR específica de metilación (MSP) en una gran cantidad de muestras primarias ( $n=87$ ) que incluían desde portadores asintomáticos, CIN I, CIN II y CIN III y carcinomas cervicales y 3 líneas celulares de carcinoma cervical (FIG. 33). Para evaluar el estado de metilación, se eligió una zona correspondiente al gen de L2, que se puede ver con detalle en la figura 32.

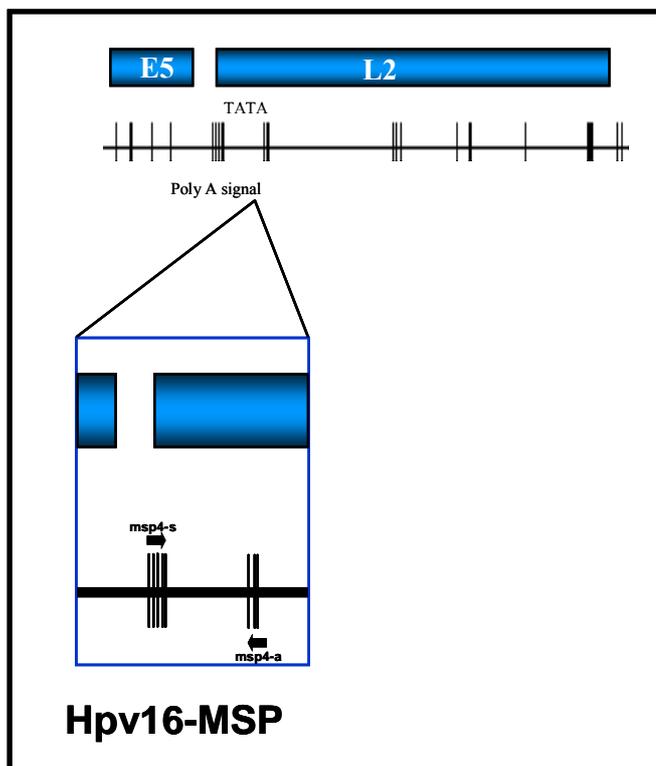
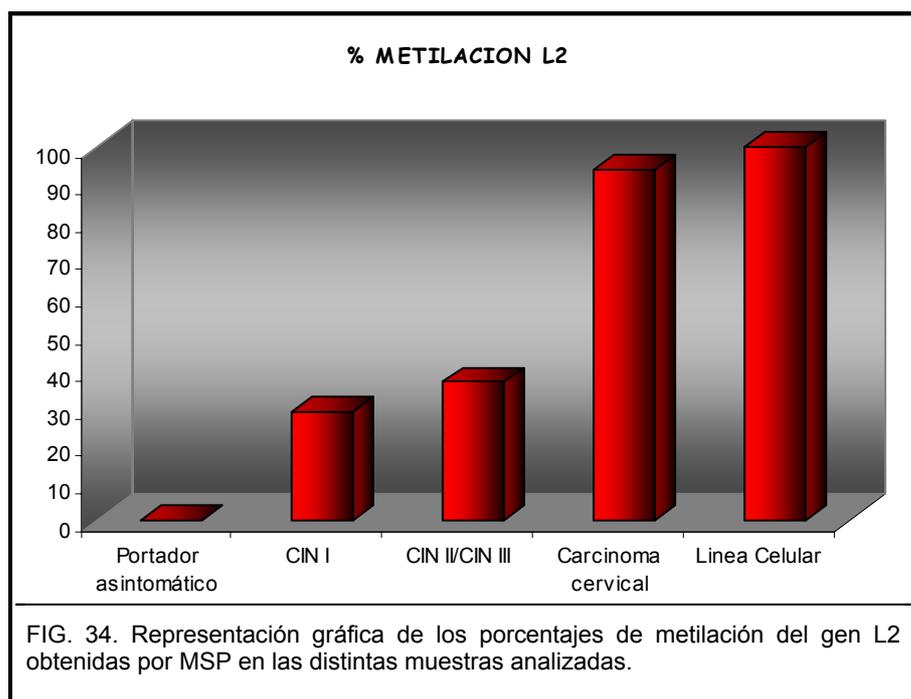
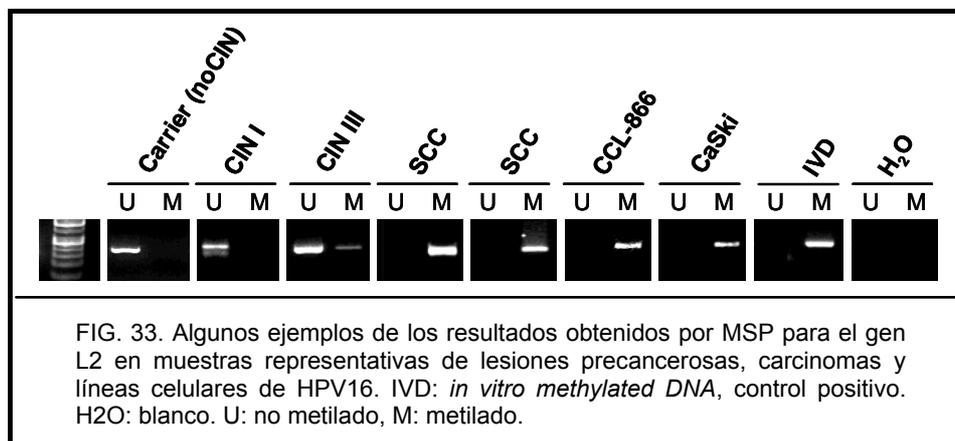


FIG. 32. Representación esquemática del genoma del HPV16, indicando la ubicación de sus genes (cajas celestes) y la distribución de los dinucleótidos CpGs (líneas verticales negras). En detalle, se observa la región estudiada por MSP, donde se indica la localización de los primers (flechas negras).

Se ratificó la presencia de hipermetilación progresiva en el locus de L2, variando desde un 0% en los portadores asintomáticos, un 29% en las CIN I, un 37% en las CIN II y CIN III hasta un 94% en los carcinomas, llegando al 100% en las líneas celulares. En la figura 34 se representan los resultados de los porcentajes de metilación obtenidos en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos con esta técnica reflejan fielmente el estado de metilación de esta región visto por secuenciación.



LESION	N=	% METILACION L2
Portador asintomático	10	0
CIN I	17	29
CIN II/CIN III	43	37
Carcinoma cervical	17	94
Líneas celulares	3	100

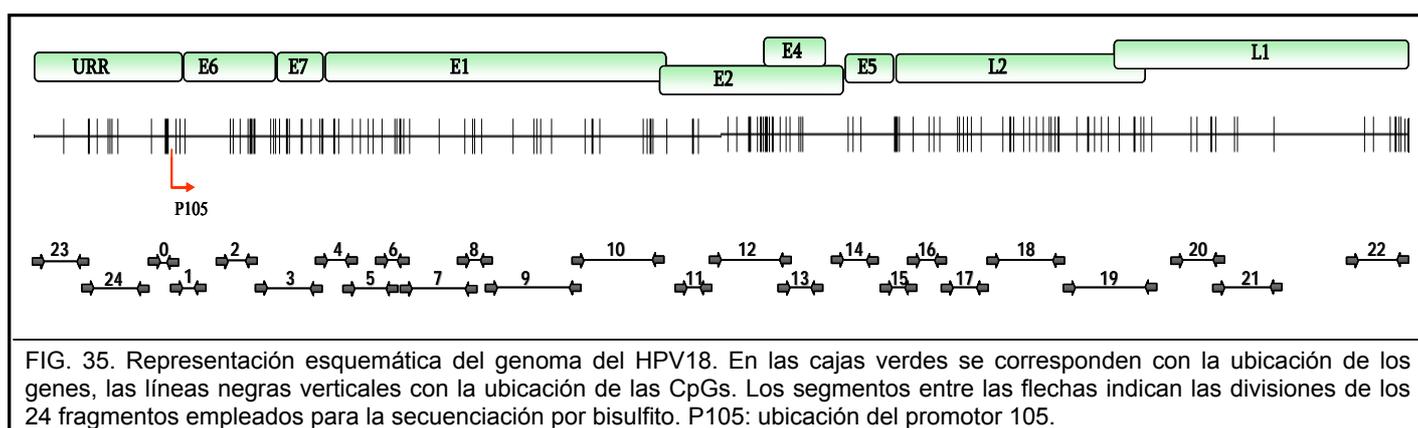
## 4.2. Segunda parte: El metiloma de HPV18

El HPV18 ocupa el segundo lugar en prevalencia detrás del HPV16, y también es responsable de gran parte de los carcinomas cervicales. A pesar de pertenecer a tipos distintos (*alfa 9* el HPV16 y *alfa 7* el HPV18), comparten una estructura genómica muy similar, y codifican para las mismas proteínas.

### 4.2.1. Secuenciación genómica de bisulfito

Al igual que se hizo con el HPV16, se describió el metiloma completo del HPV18 incluyendo las 168 CpGs en los 7857 nucleótidos. Para este virus se disponía de un número un poco más limitado de muestras, pero a pesar de ello, se cubrió todo el rango de lesiones para poder evaluar la progresión de la enfermedad.

El genoma viral se dividió en 24 porciones para su estudio, y del mismo modo que con HPV16, se obtuvieron al menos 8 clones para cada CpG (FIG. 35).



De manera equivalente a lo observado anteriormente en HPV16, los resultados obtenidos para este tipo viral muestran un patrón de de metilación muy similar. La secuenciación genómica de los virus obtenidos de lesiones asintomáticas mostraron un nivel de metilación bajo, con un incremento gradual a medida que se avanza en el grado de lesión tumoral.

En la figura 36 se ejemplifican algunos de los resultados obtenidos.

En la muestra correspondiente a la lesión benigna (Carrier 1), si bien la metilación es muy baja, se observaron bastantes mutaciones, aproximadamente unas 13 CpGs perdidas y una CpG adicionada.

Desde el punto de vista cualitativo, se observa un claro aumento en la metilación, a medida que la lesión progresa a la malignidad.

Al igual que ocurría en las muestras de carcinomas escamosos en HPV16, en HPV18 también se encuentran altamente metilados. Ambas muestras secuenciadas resultaron muy homogéneas en cuanto a los altos niveles de metilación, además de presentar un gran número de adiciones y deleciones de CpGs pero de manera aleatoria.

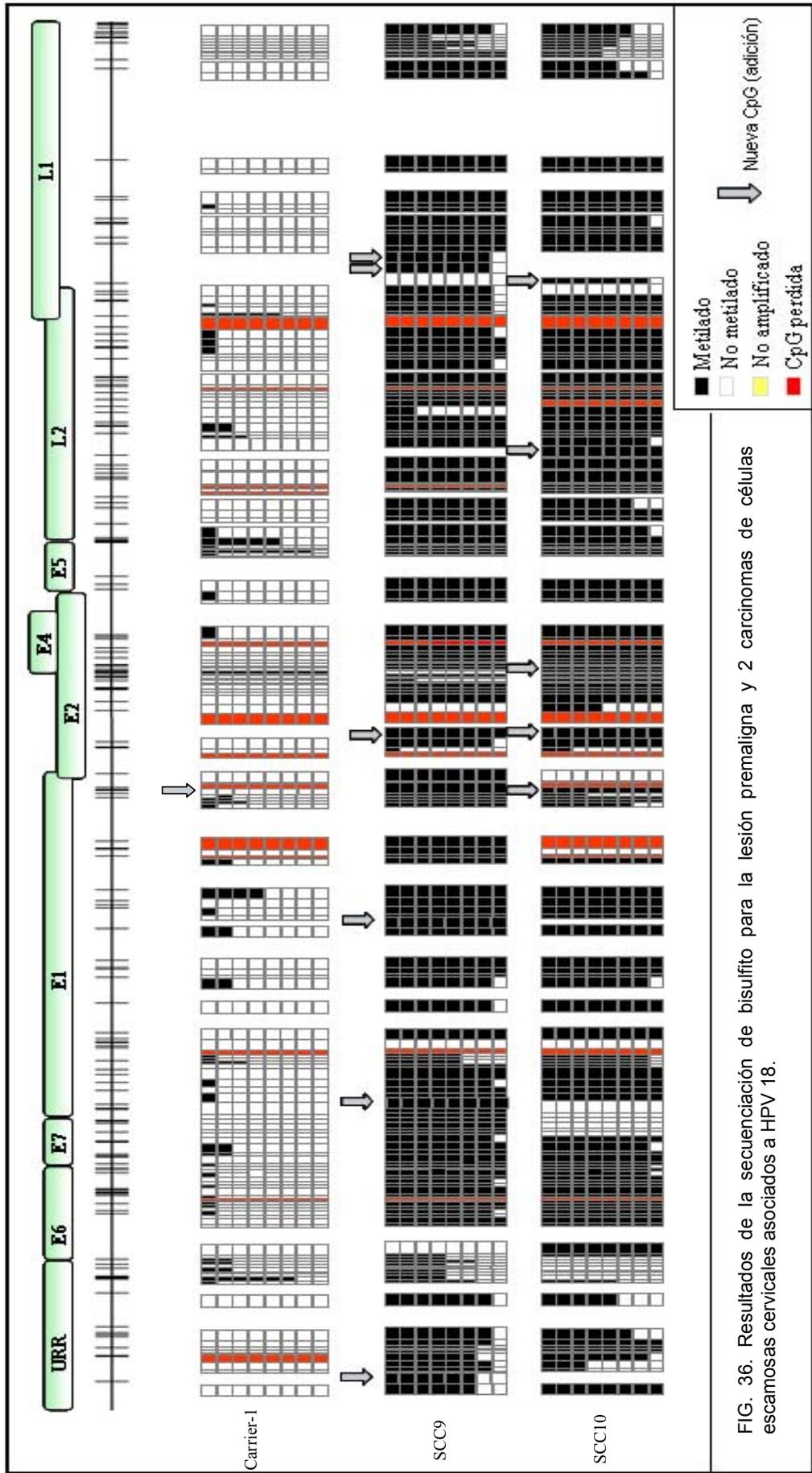


FIG. 36. Resultados de la secuenciación de bisulfito para la lesión premaligna y 2 carcinomas de células escamosas cervicales asociados a HPV 18.

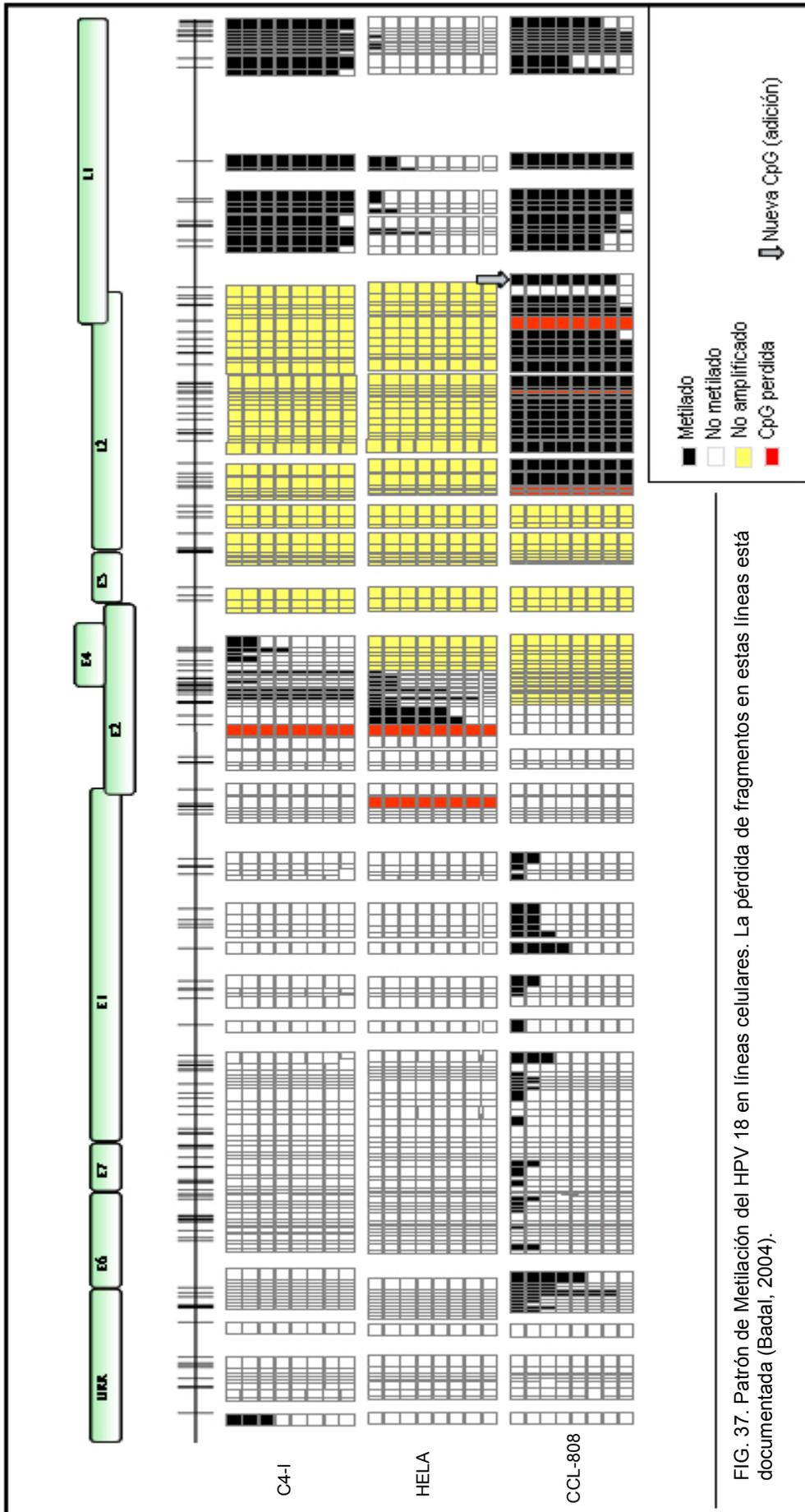


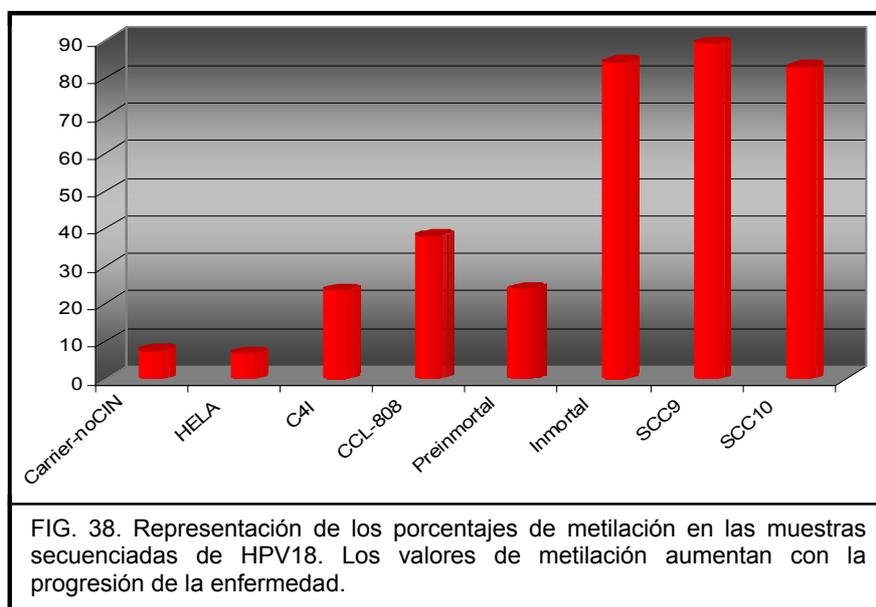
FIG. 37. Patrón de Metilación del HPV 18 en líneas celulares. La pérdida de fragmentos en estas líneas está documentada (Badai, 2004).

Observando en particular las líneas celulares, Hela y C4I presentan un bajo porcentaje de metilación, y sólo se advierte diferencia en la región perteneciente al gen L1, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía (Turan, 2007). También encontramos pérdida de algunas CpG aisladas en ambas líneas. En el caso de la línea CCL-808, la metilación es abundante en la región que comprende los genes L2 y L1, incluyendo la ganancia de una CpG (FIG. 37). Las mutaciones encontradas referentes a la pérdida y/o adición de CpGs no seguían ningún patrón definido ni podían asociarse con ninguna lesión en particular.

Una diferencia curiosa entre los dos tipos de virus es que todas las muestras primarias estudiadas de HPV18 se encontraban íntegras, solamente un fragmento correspondiente a los genes E5 y L2 no se logró amplificar en ninguna de las líneas celulares, infiriendo entonces que estas secciones se habían perdido en el proceso de integración del virus (Schwarz, 1985, Badal, 2004, Vinokurova, 2008). Además, en la CCL-808 tampoco se logró amplificar el segmento correspondiente a los genes E2 y E4.

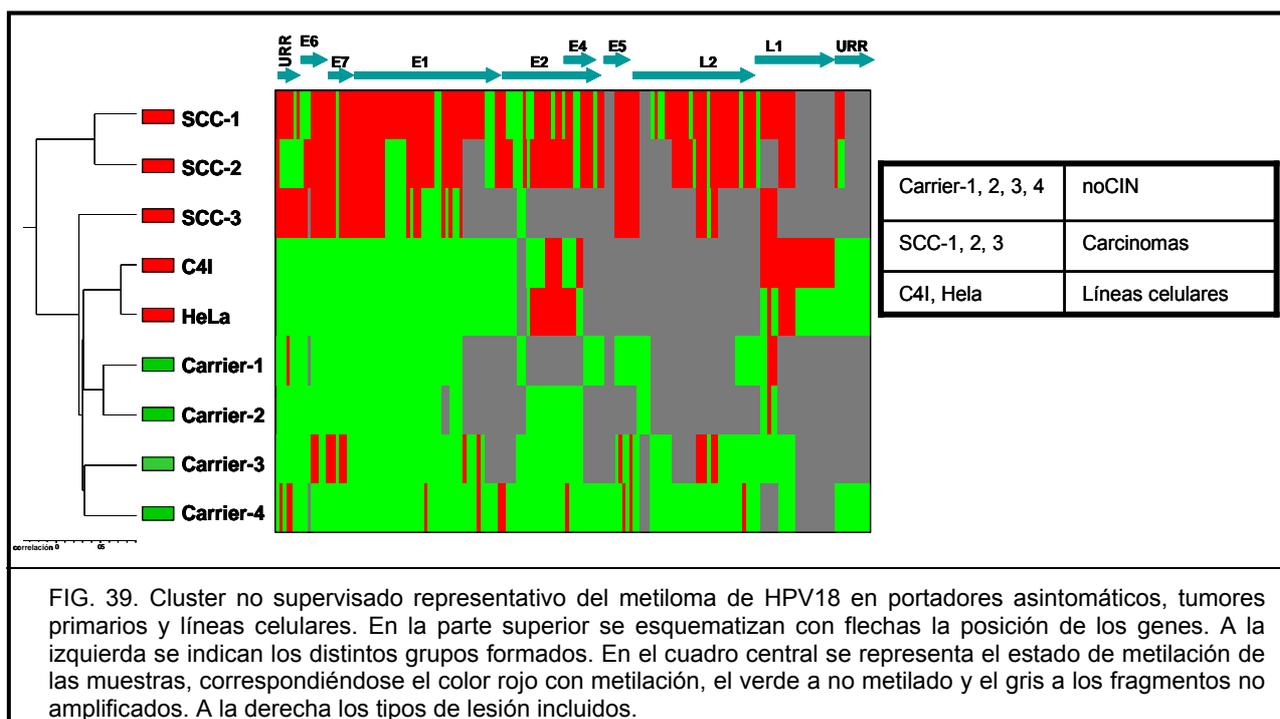
La otra diferencia llamativa entre ambos tipos de virus es que las líneas celulares establecidas de HPV18 se encuentran mucho menos metiladas que los carcinomas escamosos, ocurriendo lo contrario en HPV16.

Desde el punto de vista cuantitativo, los valores de metilación variaron entre aproximadamente el 7% de la línea celular Hela, hasta el 90,7% en la muestra del carcinoma de células escamosas (FIG. 38).



#### 4.2.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación

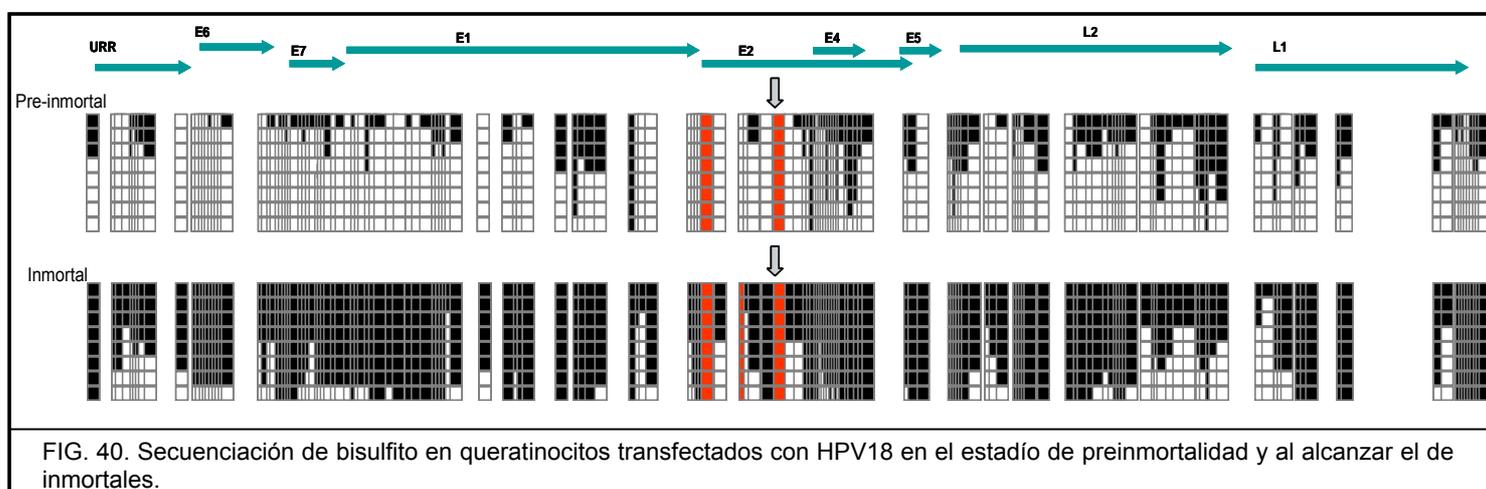
Al igual que ocurría en HPV16, también el análisis de clustering no supervisado para HPV18 permitió distinguir las diferentes lesiones y agruparlas según su grado de malignidad, desde lesiones benignas hasta carcinomas cervicales y líneas celulares, basándose en los metilomas virales (FIG. 39).



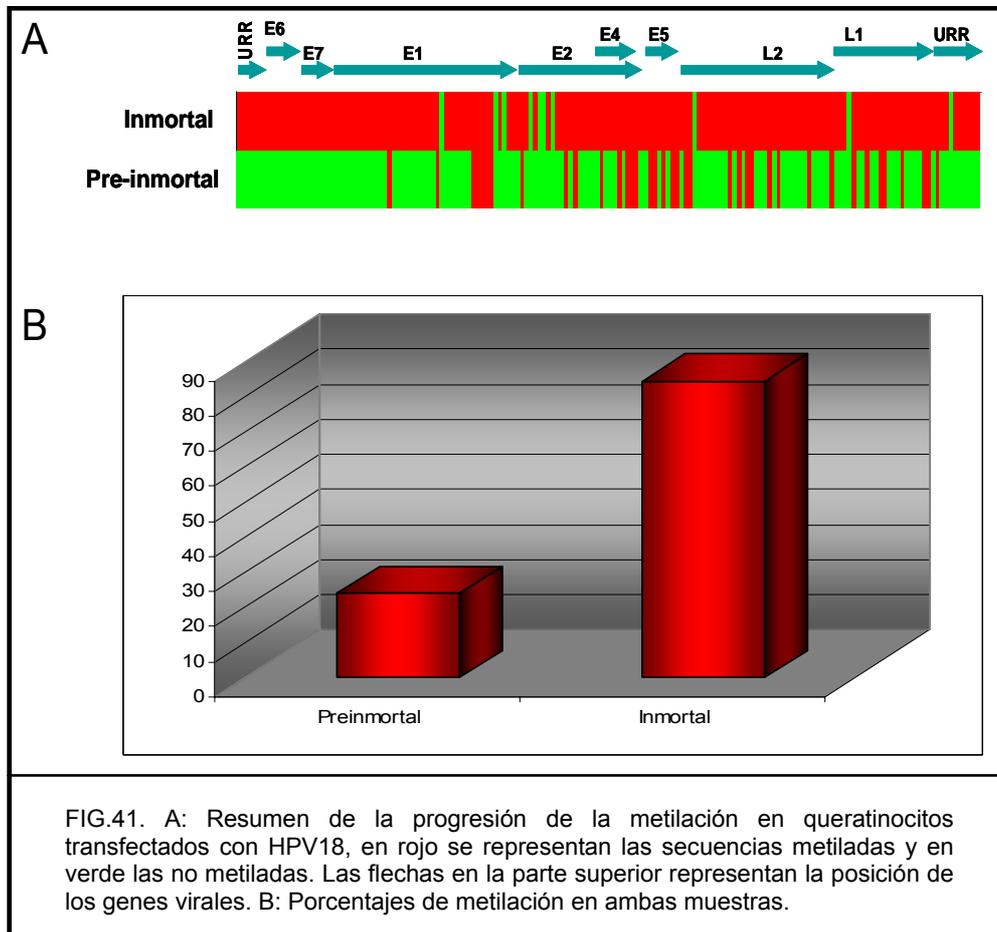
#### 4.2.3. Estudio de la dinámica de la metilación

No solo se analizó el estado de metilación estática en la progresión tumoral sino que, al igual que se hizo con HPV16, se estudió la dinámica en la evolución de la metilación para HPV18 en el proceso de immortalización de queratinocitos humanos transfectados con el virus.

Se obtuvieron los metilomas virales completos del HPV18 en dos puntos representativos: el estadio preinmortal, en el cual se encontraba poco metilado, y en el estadio inmortal, en el cual se encontraba denso y homogéneamente metilado. El nivel de mutaciones observado se mantuvo bastante constante durante todo el proceso de immortalización, encontrándose pérdida de 2 CpGs y ganancia de una en el estadio pre-inmortal, a lo que se sumó la pérdida de otra CpG en el estadio inmortal (FIG. 40). Los resultados observados son similares a los obtenidos para HPV16: la metilación aumenta al alcanzar la inmortalidad.



Otra particularidad es que los niveles de metilación en el estadio preinmortal eran más importantes en HPV18 comparando con HPV16, alcanzando prácticamente el 90% en el estadio inmortal en comparación con el 52% de HPV16 (FIG. 41).

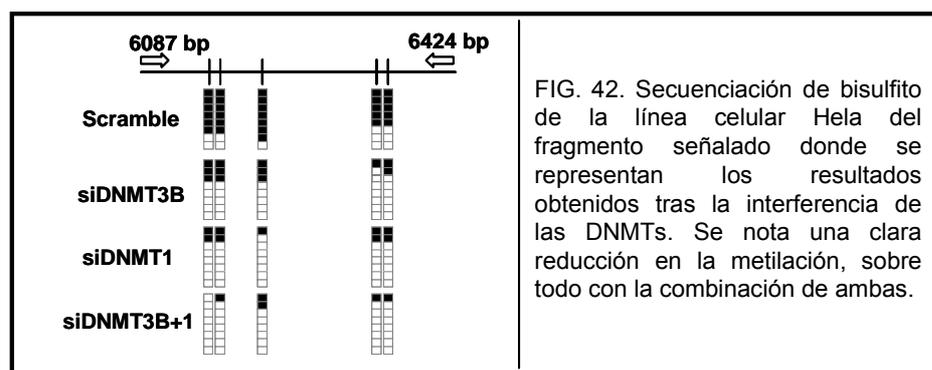


#### 4.2.4. Inducción de hipometilación en HPV18

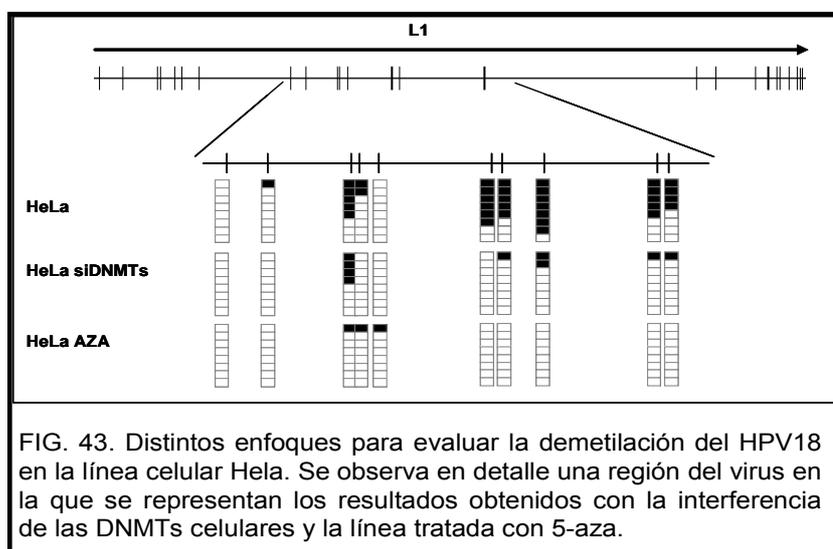
Como ya se mencionó, el HPV18 carece de una maquinaria de metilación propia, así que se supone que utiliza las enzimas de la célula a la que infecta para metilar su genoma.

Para demostrar esto, se realizaron ensayos de interferencia con siRNA (*Short Interferente RNA*) en la línea celular HeLa para las DNMTs 1 y 3b.

Se observó que al deplecionar a la célula de las enzimas encargadas de la metilación, se inducía la hipometilación viral. En la figura 42 se puede apreciar la secuenciación de bisulfito realizada en una sección del HPV18 en la que se representa el grado de metilación en la muestra control, la perteneciente a la interferencia con la DNMT3b, con la DNMT1, y con una combinación de ambas, en la que se obtiene una mayor pérdida de metilación.



La hipometilación en este virus también se probó mediante el tratamiento con el agente demetilante 5-aza en la línea celular HeLa, lográndose un mayor efecto al visto con las interferencias. En la figura 43 se representa un resumen de los resultados logrados mediante ambas aproximaciones en la región del gen L1 evaluado por secuenciación de bisulfito.



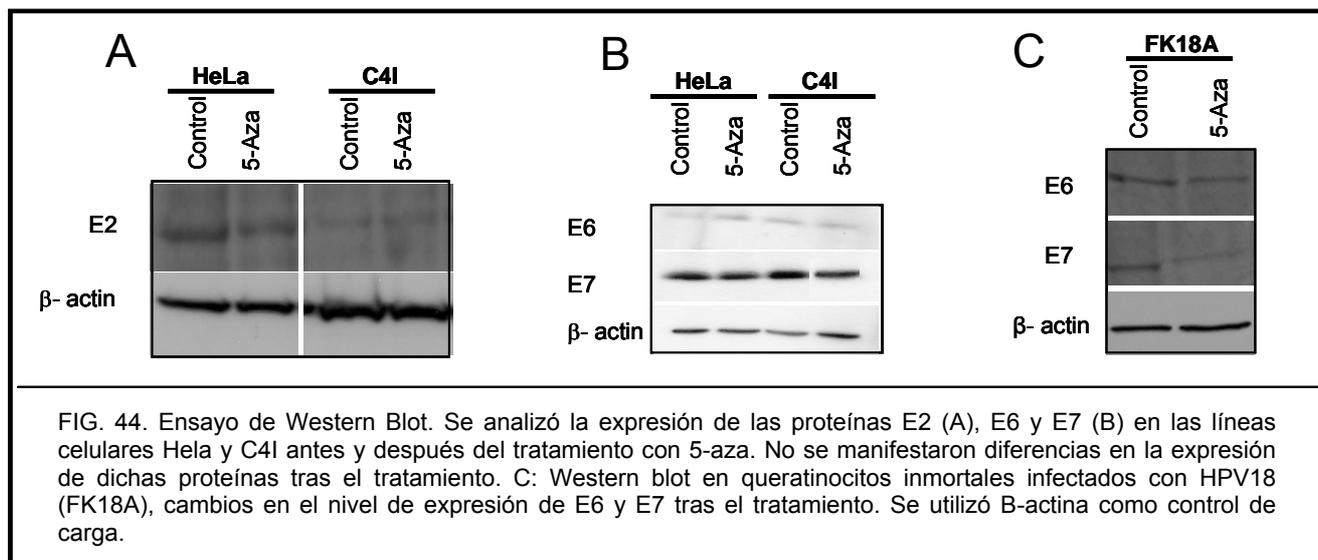
#### 4.2.5. Niveles de expresión de E6 y E7 en HPV18 después del tratamiento con 5-aza-2'-deoxicidina

Si bien el HPV16 y el HPV18 comparten muchos aspectos en relación a sus metilomas, una interesante diferencia entre ellos es la respuesta al tratamiento con 5-aza-2'-deoxicidina en cuanto a los niveles de expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7.

Cuando se trató la línea celular Caski que contiene el HPV16, se observó que disminuía la expresión de dichas proteínas, al desmetilarse su principal regulador, la proteína E2. Sin embargo, al tratar las líneas que contienen HPV18, HeLa y C4I, la expresión de estas proteínas no se modifica (FIG. 44B). Los mismos resultados se observaron al estudiar por Western Blot las variaciones en E2 antes y después del tratamiento con 5-aza (FIG. 44A).

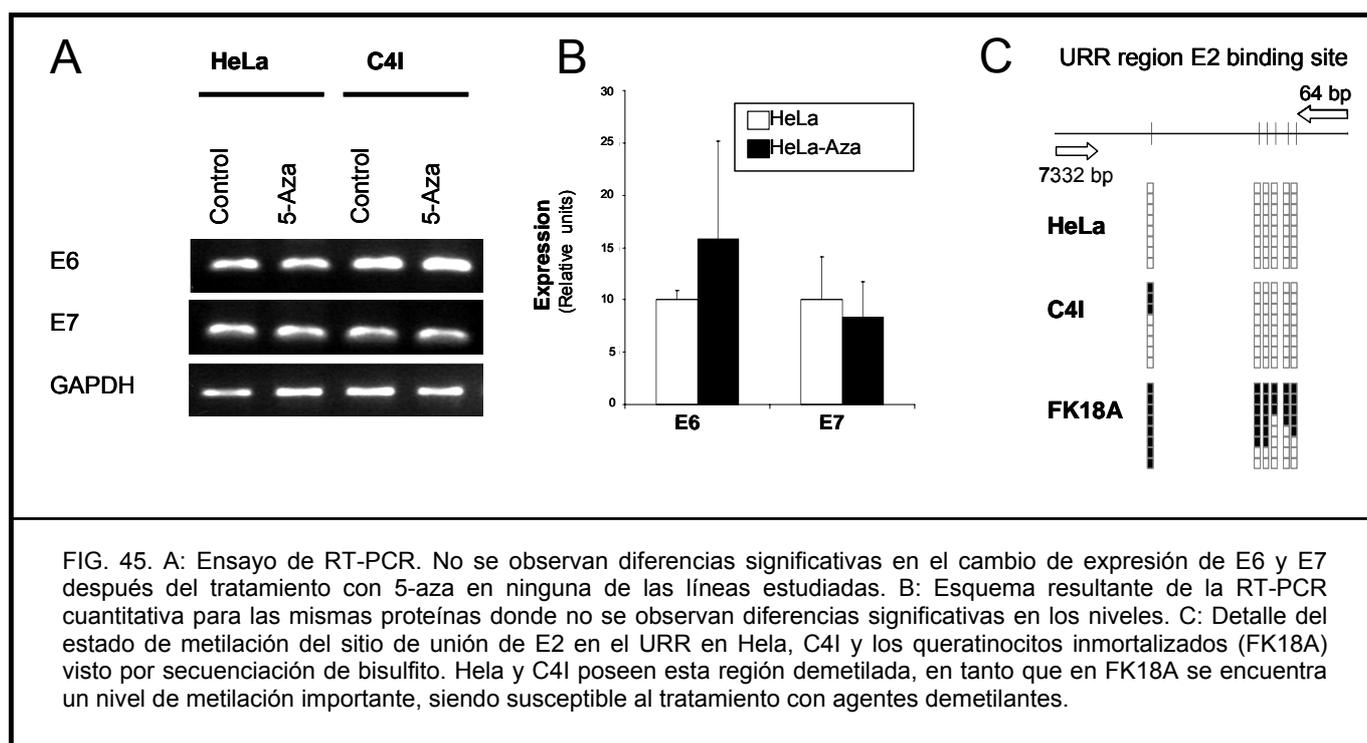
Estos descubrimientos son coherentes con el hecho de que los sitios de unión de E2 en la región URR en estas líneas celulares se encuentran demetilados previo al tratamiento (FIG. 45C),

con lo cual, el control ejercido por E2 al nivel de expresión de las proteínas E6 y E7, no varía por el efecto de un agente que demetila el ADN.



Como se observa en la figura 45, los experimentos de RT-PCR y RT-PCR cuantitativa no muestran diferencias en los niveles de dichos ARN mensajeros antes y después del tratamiento en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

Si en cambio tratamos los queratinocitos transfectados con HPV18 en estadio inmortal, al encontrarse la región de unión de E2 en la URR metilada (FIG. 45C), la respuesta al tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina, da como resultado la bajada en la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 (FIG. 44C), tal como ocurría con Caski en HPV16.



#### 4.2.6. Análisis del estado de metilación de la región E2 por MSP

Para aumentar el análisis a un número mayor de muestras y de ese modo confirmar los resultados obtenidos por secuenciación de bisulfito, se realizó un ensayo de MSP.

Esta técnica es muy sensible para la detección de una pequeña proporción tan baja como el 0,1% de alelos metilados (o no metilados) en una muestra dada (Herman, 1996).

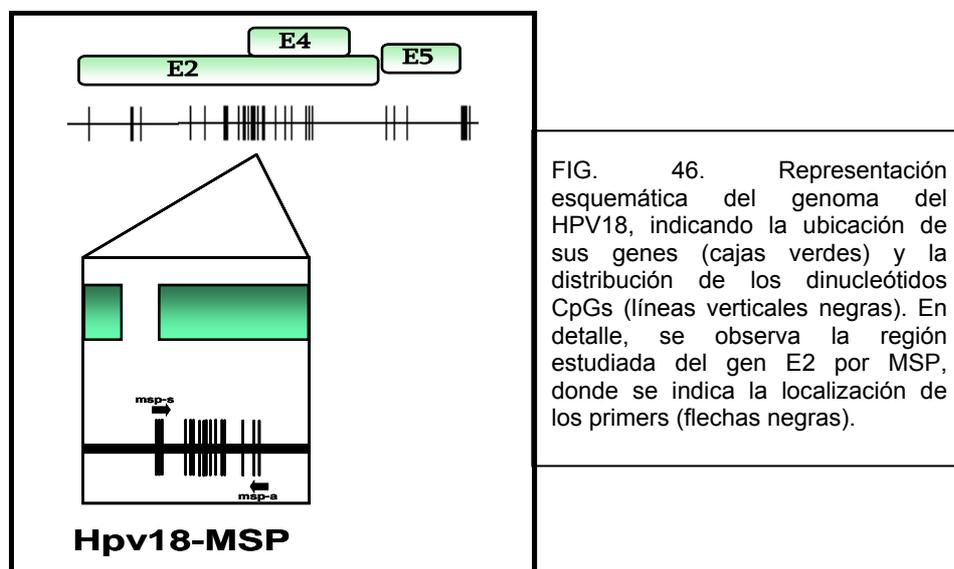
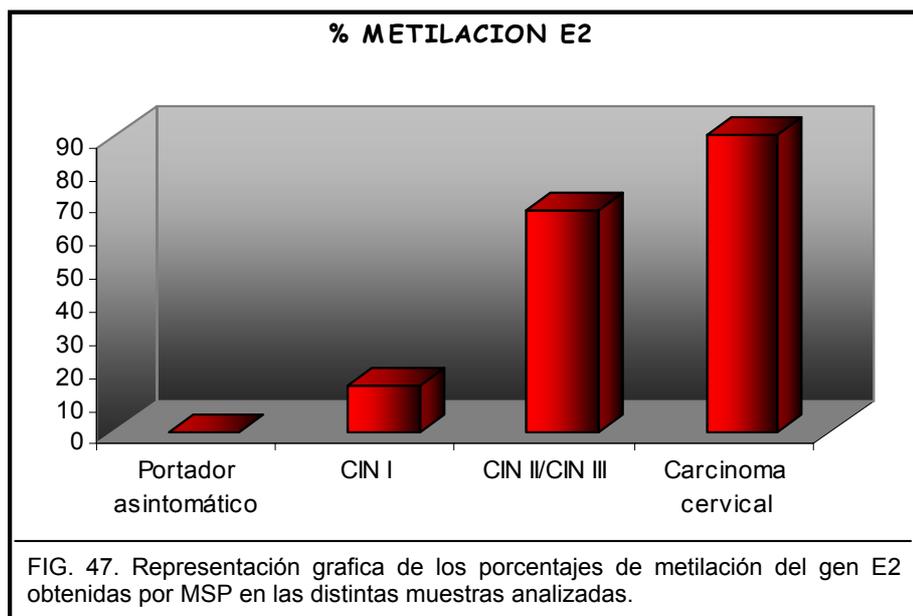


FIG. 46. Representación esquemática del genoma del HPV18, indicando la ubicación de sus genes (cajas verdes) y la distribución de los dinucleótidos CpGs (líneas verticales negras). En detalle, se observa la región estudiada del gen E2 por MSP, donde se indica la localización de los primers (flechas negras).

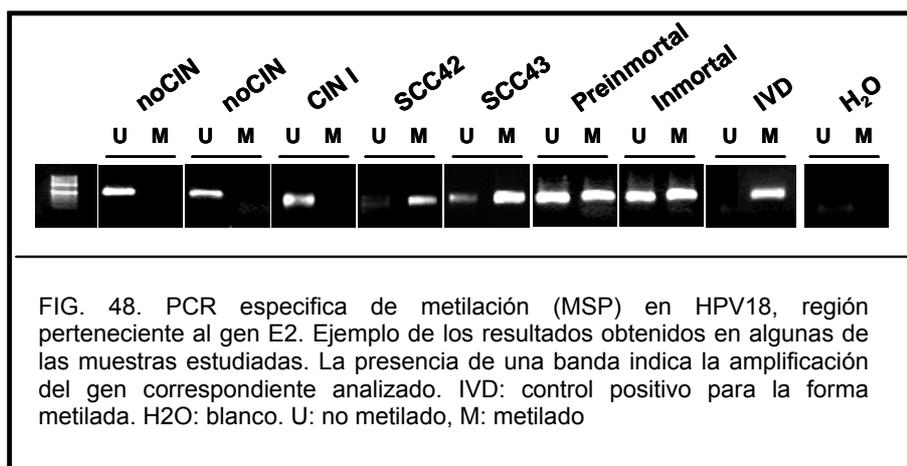
Se estudió la región correspondiente al gen E2, empleando 32 muestras primarias humanas que incluían todas las etapas de la carcinogénesis mediada por HPV18 y como control, 4 líneas celulares establecidas de cáncer cervical asociado a HPV18. En la figura 46 se puede observar con detalle la región en la que se diseñaron los primers para este estudio.

Al igual que vimos en HPV16, también en este caso la técnica de MSP demostró ser un fiel reflejo de lo que ocurría con los niveles de metilación vistos por secuenciación. Los porcentajes de metilación variaron entre el 0% de los portadores asintomáticos hasta el 100% en las líneas celulares establecidas, confirmando la relación entre el aumento en el nivel de metilación y la progresión de la lesión tumoral (FIG 47).

En la figura 48 se pueden ver algunos ejemplos de los resultados obtenidos con esta técnica.



LESION	N=	% METILACION E2
Portador asintomático	6	0
CIN I	7	14
CIN II/CIN III	9	67
Carcinoma cervical	10	90
Líneas celulares	4	100



### 4.3. Tercera parte: El metiloma de EBV

#### 4.3.1. Secuenciación genómica de bisulfito del EBV

El último de los virus que se incluyeron en este proyecto fue el virus Epstein Barr. El extenso genoma del EBV, de aproximadamente 172 Kb, nos impidió secuenciar el metiloma completo de este virus de la misma forma que se hizo con los virus HPV16 y HPV18. En lugar de eso, se realizó el análisis más extenso hasta ahora descrito del genoma del EBV secuenciando múltiples clones de los 77 amplicones que contienen los sitios de inicio de transcripción para las 94 proteínas del EBV y los 2 ARNs estructurales, EBER 1 y EBER 2. En total se incluyeron en el estudio el 95% de las islas CpG, que incluyen 1344 CpGs del genoma viral del EBV (Takai, 2003).

Se obtuvieron 28 metilomas correspondientes a muestras que incluían desde células benignas infectadas, como por ejemplo linfadenitis reactiva o mononucleosis infecciosa, líneas celulares linfoblastoides no tumorales y desordenes linfoproliferativos post trasplante. También se estudiaron linfomas asociados a EBV, tanto de tejidos primarios como de líneas celulares establecidas, incluyendo linfomas no Hodgkin, linfomas Hodgkin, linfomas de Burkitt y tumores nasofaríngeos.

El perfil de metilación observado para EBV se comporta de manera similar a los descritos para HPV16 y HPV18, resultando los tumores con un nivel de metilación mayor que las lesiones premalignas (*FIG. 49*).

Como este virus tampoco codifica para ninguna DNMT propia, se observó que las partículas virales que se encuentran de forma libre en la célula escapan a la maquinaria de metilación celular, por lo que se encuentran demetiladas (*FIG. 49BIS*). Sin embargo, los virus que están presentes en células que se corresponden con lesiones benignas, como por ejemplo en linfadenitis reactiva o mononucleosis infecciosa, comienzan a mostrar algo de metilación en algunos sitios de inicio de transcripción (*FIG. 50*).

LESION	N=
Linfadenitis Reactiva	2
Mononucleosis Infecciosa	1
LCL	5
PTLD	1
Linfoma de Hodgkin	2
Linfoma no Hodgkin	4
Linfoma de Burkitt	9
Linfoepitelioma	2
Carcinoma Nasofaríngeo	1
Virus wild type	1

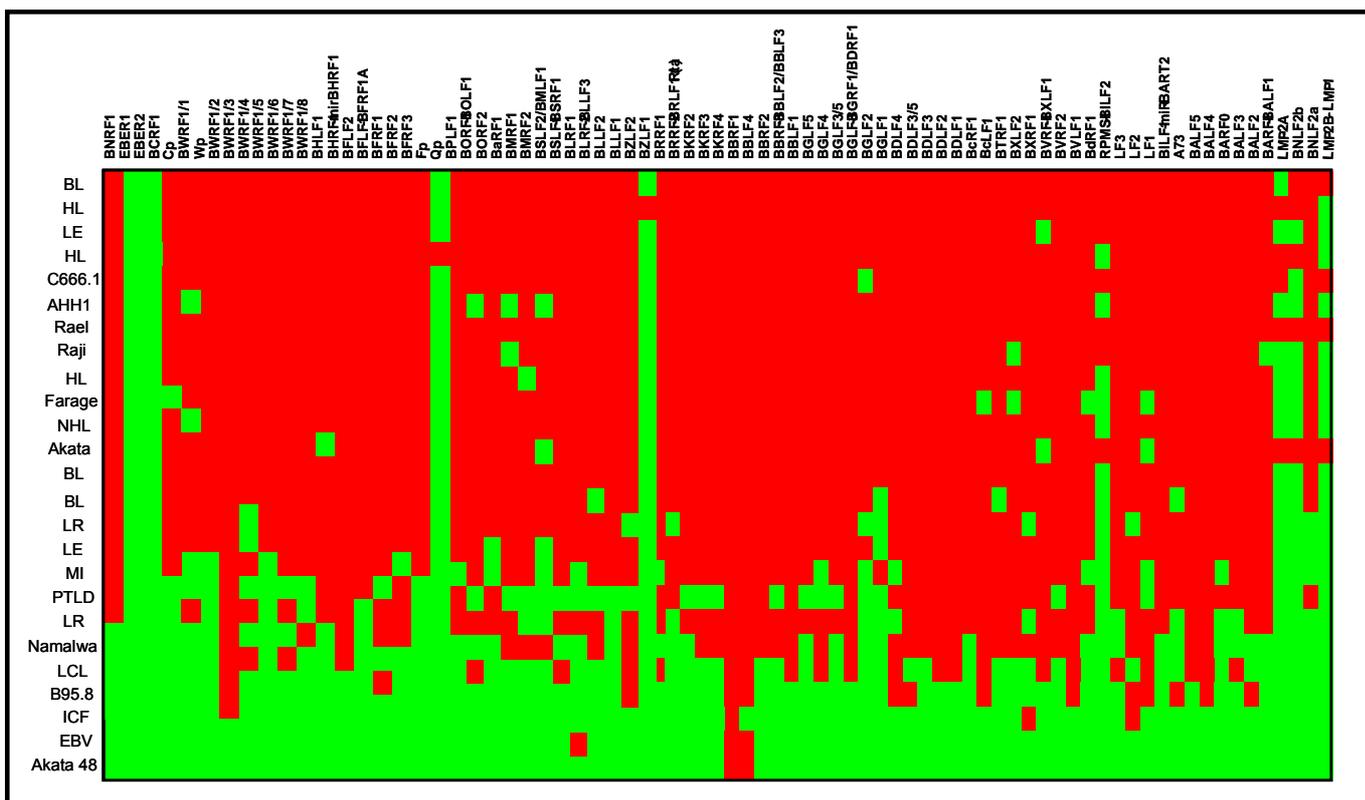


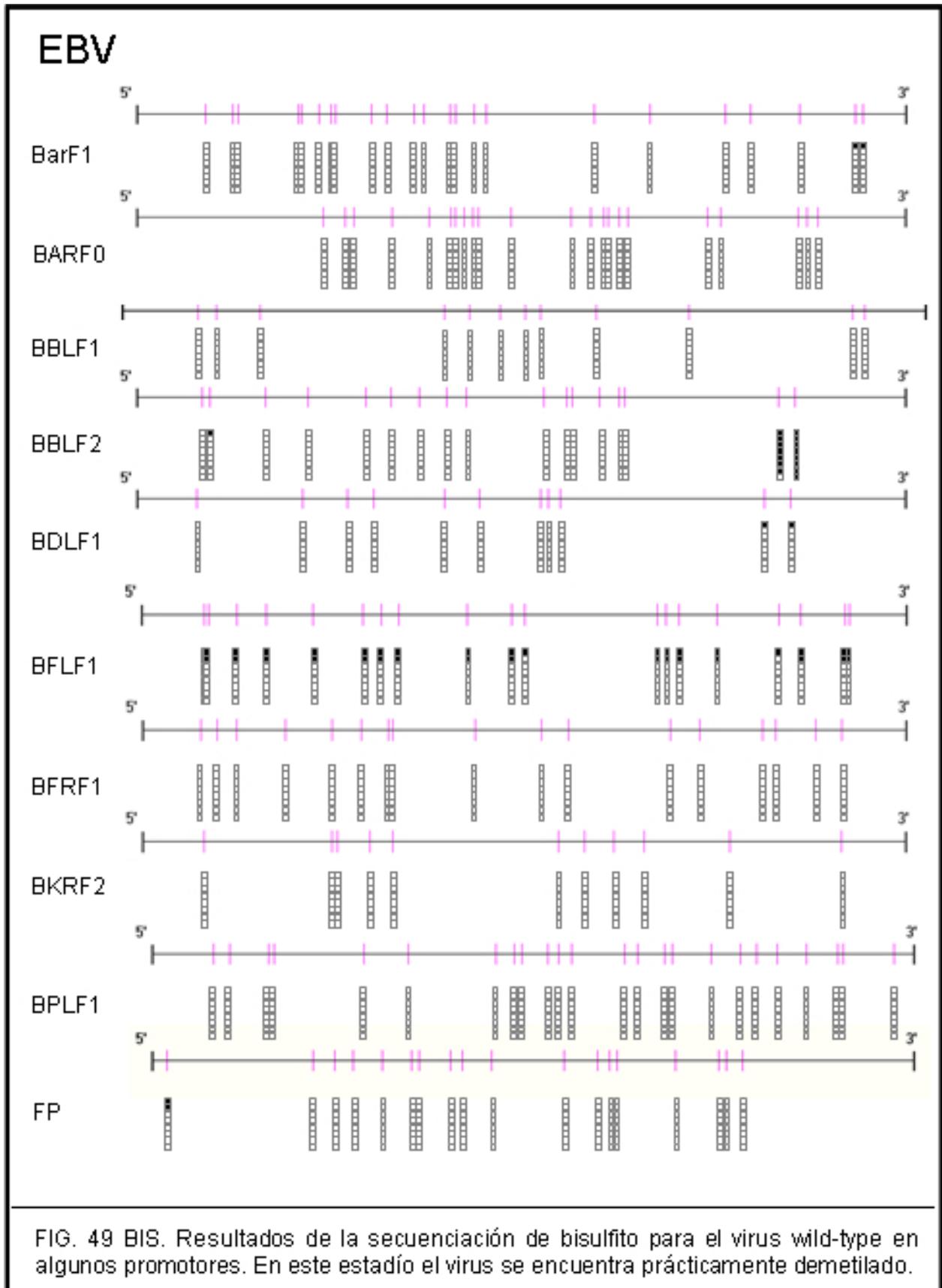
FIG. 49. El metiloma de EBV. En la parte superior se indica el nombre de todos los promotores. A la izquierda las muestras secuenciadas. En el cuadro central se representa el estado de metilación de los promotores, correspondiéndose el color rojo con metilación y el verde a no metilado. Se puede apreciar que los tumores (parte superior) se encuentran mas metilados que las lesiones benignas (parte inferior)

HL: linfoma de Hodgkin. BL: linfoma de Burkitt. NHL: linfoma no Hodgkin. NPC: carcinoma nasofaríngeo. PTLD: desorden proliferativo post trasplante. RL: linfadenitis reactiva. IM: mononucleosis infecciosa.

Esta misma metilación ocasional, también se vio en las líneas celulares que derivan de células B linfoblastoides no oncogénicas (LCL).

Notablemente, cuando observamos células tumorales infectadas con EBV, este patrón cambia significativamente. La mayoría de los linfomas y las muestras de tumores nasofaríngeos (tanto líneas celulares como tumores primarios), poseen la mayoría de los inicios de transcripción metilados (FIG. 51).

Sorprendentemente, de los 77 inicios de transcripción que posee el EBV en todo su genoma, 5 de los fragmentos amplificados, parecerían escapar a la maquinaria de metilación celular, en estos se incluyen los dos ARNs estructurales EBER1 y EBER2, y las secuencias correspondientes a los promotores de Qp, BZLF1 y LMP-2B/LMP-1. Estos resultados son consistentes con estudios previos a menor escala (Ambinder, 1999). Un ejemplo de los resultados obtenidos para el promotor Qp, se puede apreciar en la figura 52. De las 27 muestras esquematizadas, solo un linfoma de Hodgkin parecería estar medianamente metilado, el resto de las muestras se encontraron completamente demetiladas, tanto las provenientes de lesiones benignas, como de los tumores avanzados. Como característica particular, se observó en ciertas muestras pérdida de algunas CpGs.



## Linfadenitis reactiva

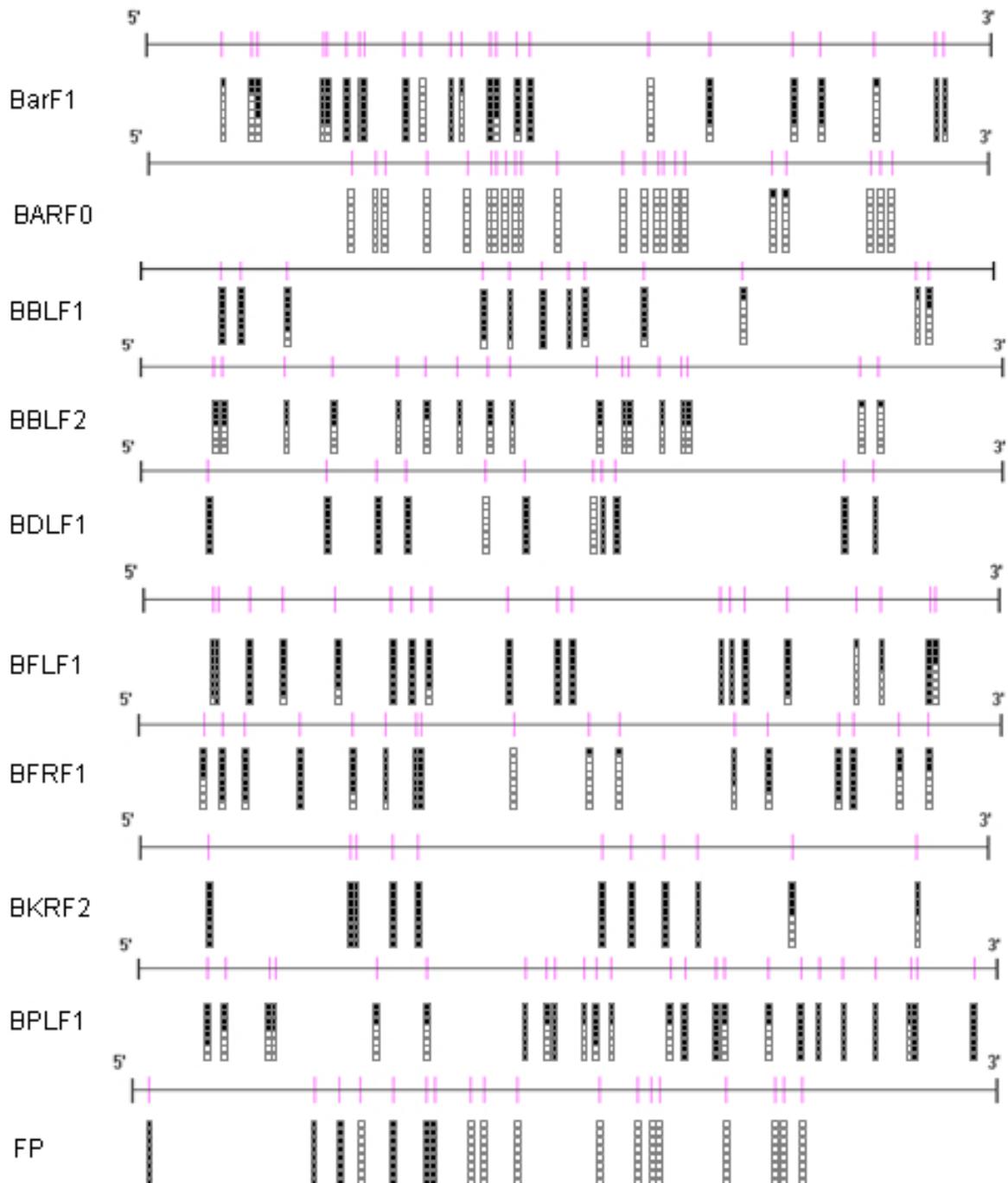
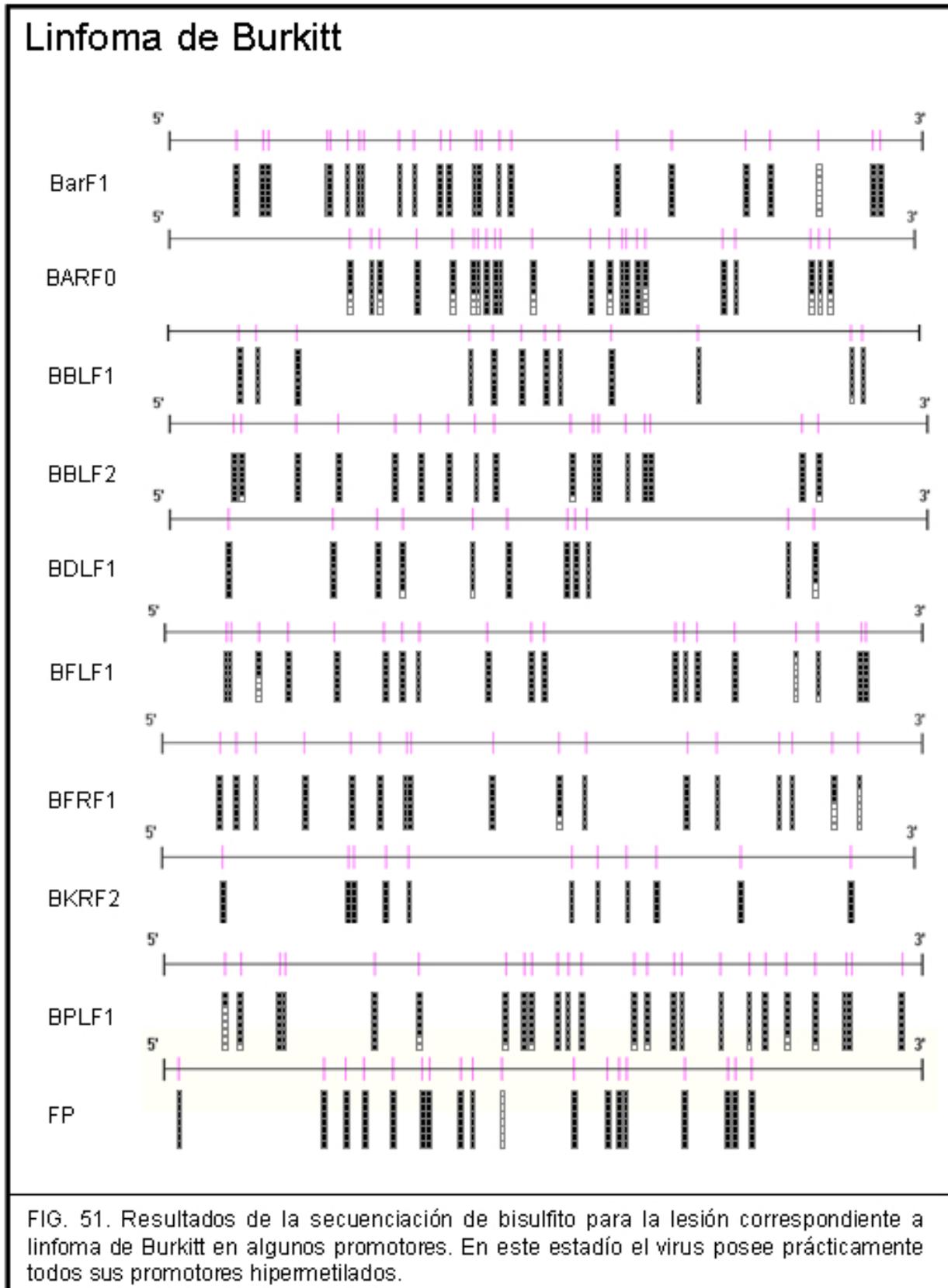


FIG. 50. Resultados de la secuenciación de bisulfito para la lesión correspondiente a linfadenitis reactiva en algunos promotores. En este estadio el virus empieza a metilar la mayoría de sus promotores.



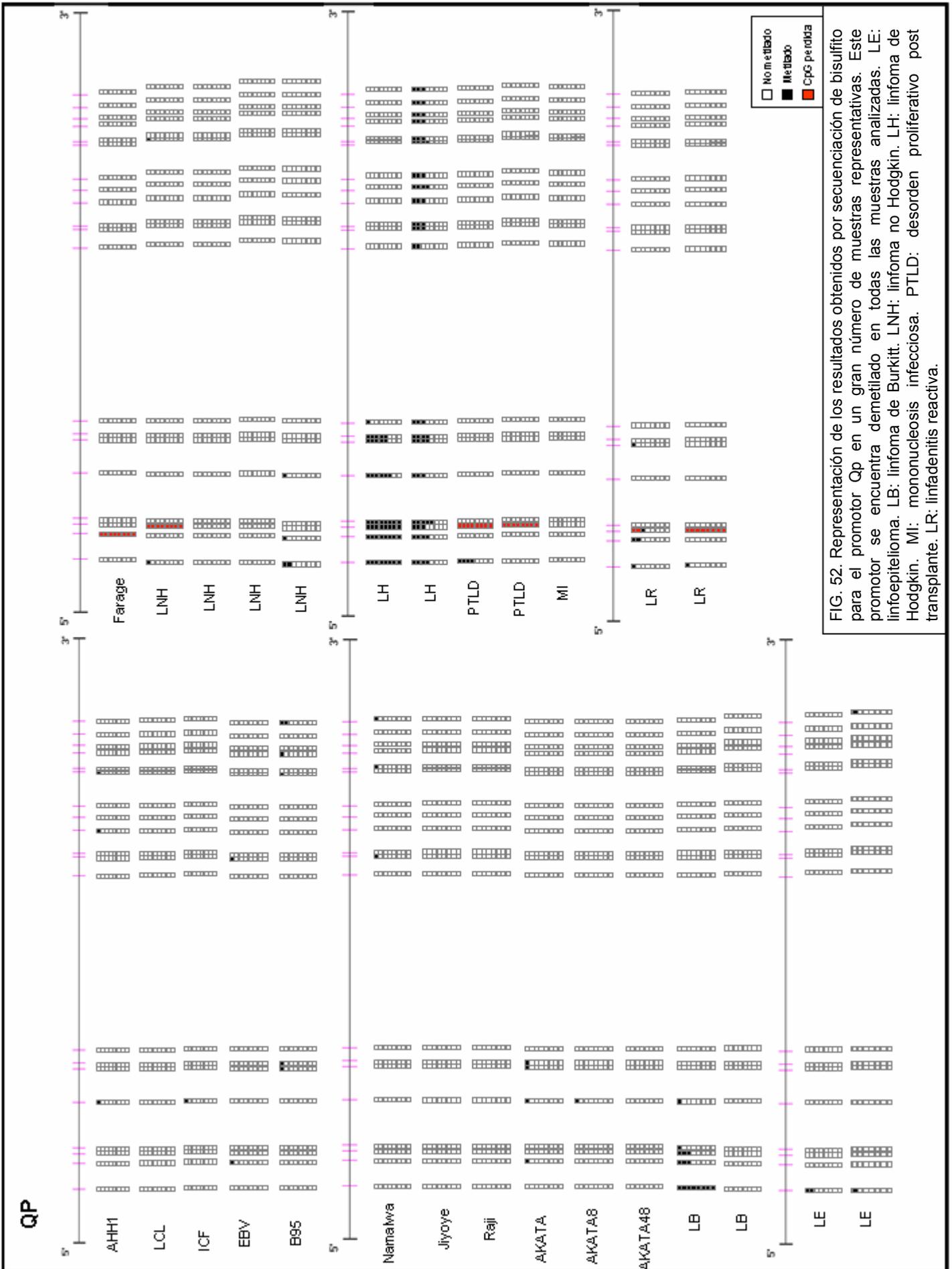


FIG. 52. Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de bisulfito para el promotor Qp en un gran número de muestras representativas. Este promotor se encuentra demetilado en todas las muestras analizadas. LE: linfocitoma. LB: linfoma de Burkitt. LNH: linfoma no Hodgkin. LH: linfoma de Hodgkin. MI: mononucleosis infecciosa. PTL: desorden proliferativo post trasplante. LR: linfadenitis reactiva.

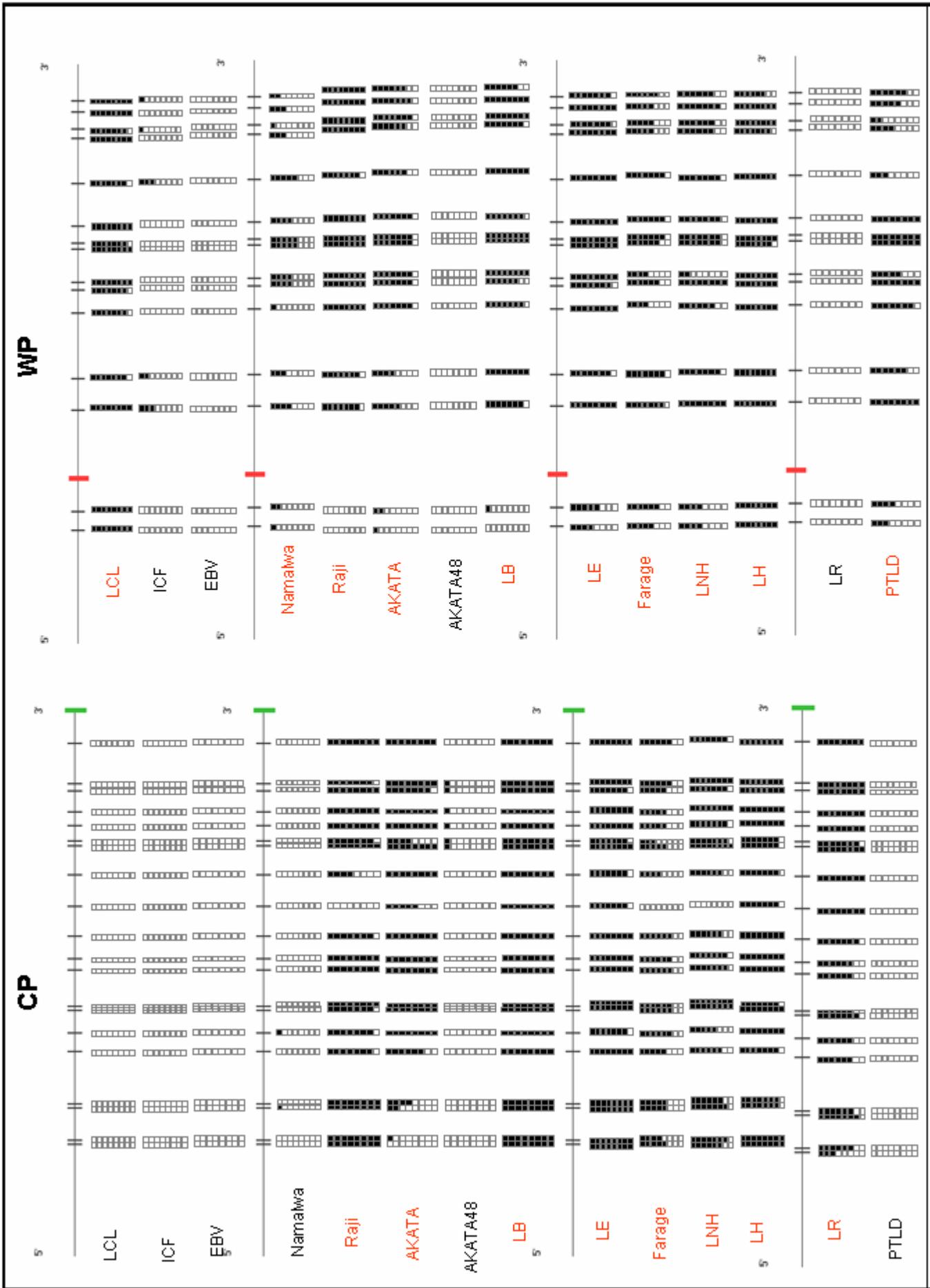


FIG. 53. Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de bisulfito para los promotores Cp y Wp en muestras representativas de cada lesión. LE: linfopitelioma. LB: linfoma de Burkitt. LNHL: linfoma no Hodgkin. LH: linfoma de Hodgkin. MI: mononucleosis infecciosa. PTLD: desorden proliferativo post trasplante. LR: linfadenitis reactiva

#### 4.3.1.1. Metilación diferencial de los distintos promotores de EBNA

Analizando el comportamiento de la metilación de los promotores Wp, Cp y Qp se puede deducir a que programa de latencia pertenecen las muestras. Si observamos los resultados ejemplificados en las figuras 52 y 53, todas las muestras correspondientes a linfomas tienen demetilado el promotor Qp solamente, y altamente metilado Wp y Cp, lo que indica un grado avanzado de lesión. La muestra perteneciente a la línea linfoblastoide (LCL) se encuentra en un nivel intermedio transcribiendo los EBNA desde el promotor Cp que se encuentra no metilado, en contraste con Wp que se encuentra metilado. La muestra de linfadenitis reactiva presenta un nivel de metilación que se corresponde con una lesión inicial, en la que los EBNA se transcriben desde el promotor demetilado Wp.

La metilación del virus wild-type (EBV) y de la línea linfoblastoide portadora de la mutación para DNMT3b (ICF) es nula también para estos tres promotores, coincidiendo con los resultados observados para el resto del genoma viral.

La lesión identificada como PTL (desorden proliferativo post trasplante) posee el promotor Cp completamente demetilado y el Wp con un nivel de metilación considerable, de hecho por MSP se comprobó que estaba metilado.

Otro punto importante a destacar, es la demetilación que se produce en estos promotores al inducir el ciclo lítico en la línea celular AKATA. A las 48 hs de tratamiento, se pierde toda la metilación.

En relación a la cantidad de virus que contienen las líneas, si comparamos a Namalwa con Raji, ambas pertenecientes a linfomas de Burkitt EBV positivas, la diferencia de metilación de estos promotores es notable. En Raji, la que tiene más cantidad de virus (comprobado por la técnica de FISH), la metilación es mucho mayor.

#### 4.3.2. Clustering de las muestras según su perfil de metilación

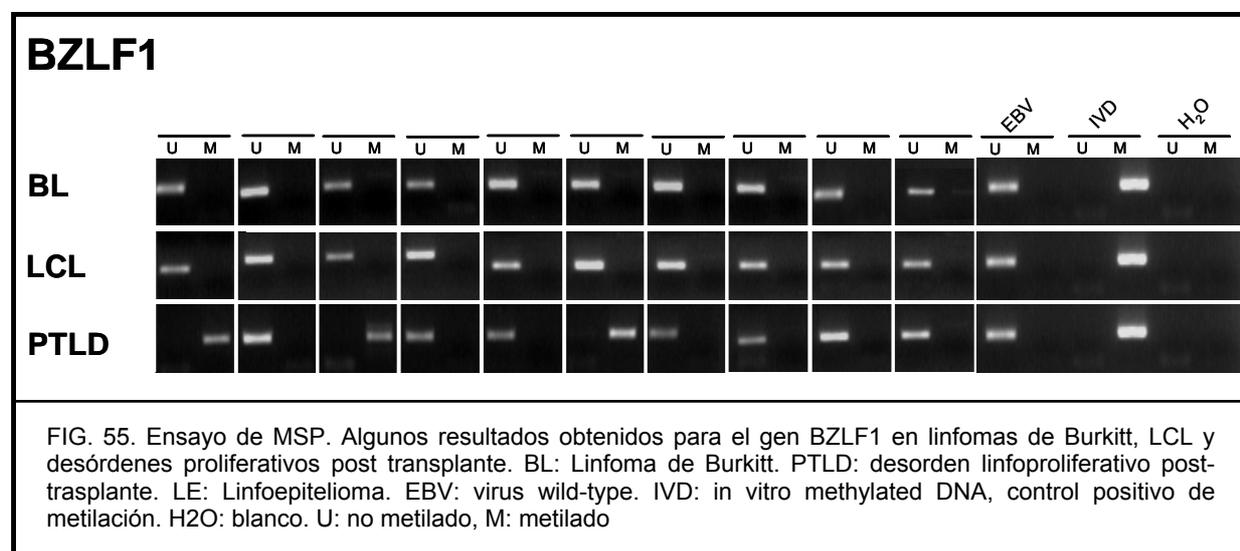
Para organizar el gran volumen de datos obtenidos de una forma un poco más gráfica, nos propusimos realizar un dendrograma con los metilomas analizados de EBV.

A partir del análisis de los datos de metilación se realizó un ensayo de clustering no supervisado de los metilomas del EBV analizados en las distintas muestras. Esto nos permitió establecer agrupaciones diferenciales basándonos en los resultados de los niveles de metilación, generando tres grupos según el origen de la muestra: virus libre, lesiones benignas, y tumores asociados a EBV (linfomas y carcinomas epiteliales) (FIG. 54). La excepción a esto es la presencia de la línea tumoral Namalwa en el grupo de lesiones benignas, ya que la metilación del virus en este caso se comporta como si se tratara de una lesión pretumoral, lo que podría deberse en parte al bajo número de copias presentes en esta línea.



TABLA 10. Porcentajes de metilación obtenidos por MSP en EBV

	LCL	PTLD	Tumores primarios
Cp	0%	60%	100%
Wp	0%	91,60%	100%
Fp	6,25%	63,60%	100%
Qp	0%	0%	0%
BRLF1	46,15%	84,60%	100%
LMP1	0%	20%	33,30%
EBER1	0%	0%	0%
BHRF1	0%	62,50%	100%
BZLF1	0%	35,70%	46,60%



#### 4.3.4. Confirmación de la presencia del EBV en las líneas celulares utilizadas

La presencia viral en las líneas celulares estudiadas se confirmó mediante la técnica de FISH, que también permitió la cuantificación relativa del virus integrado en las mismas (FIG. 57). A modo de ejemplo, se observa que la cantidad de virus integrado presente en la línea Raji es la más abundante, ubicando en una posición intermedia a la línea Akata, y con muchas menos carga viral se encuentra la línea celular Namalwa. Como control negativo, se utilizó la línea celular de linfoma Ramos, que no contiene EBV.

La cantidad de virus presente en las distintas líneas estudiadas, tiene relación directa con el estado de metilación del mismo, encontrándose mucho más metilado en los casos en que se encuentra en mayor número de copias dentro de la célula que lo alberga, como es el caso de la línea celular Raji, disminuyendo el nivel de metilación en concordancia con la cantidad de virus presente. Esto indica que el virus es capaz de regular el nivel de metilación del número de copias virales necesarias y suficientes para mantener la infección y silenciar las que considera dispensables utilizando la maquinaria de metilación celular para su propio beneficio.

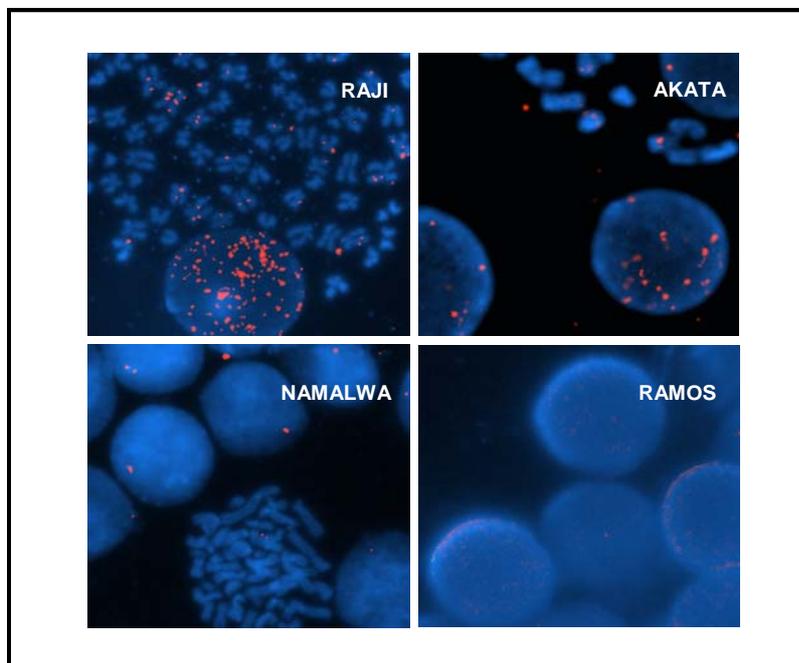
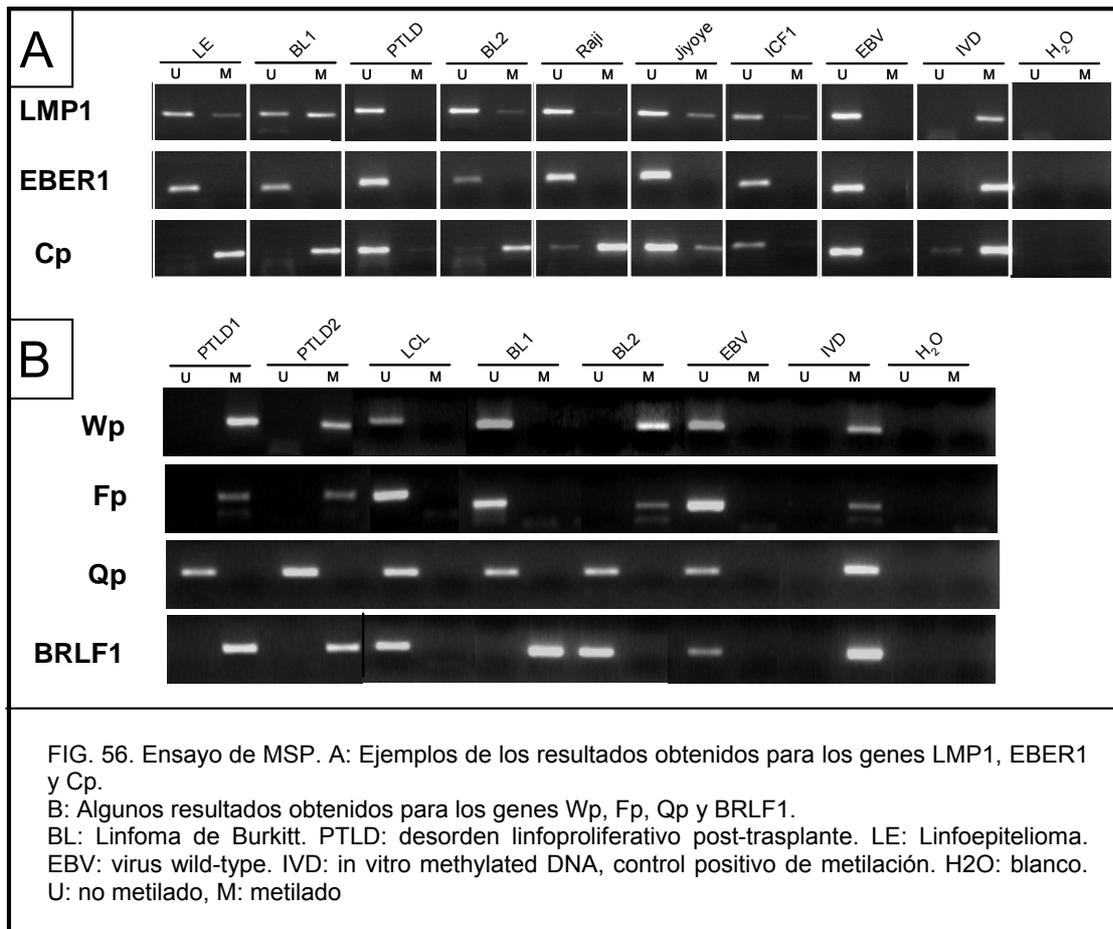


FIG. 57. Técnica de FISH en distintas líneas celulares de linfomas. En rojo se observa la sonda que pertenece al EBV. Raji presenta múltiples copias del virus, Akata un número intermedio y Namalwa pocas copias. La línea celular de linfoma Ramos se utilizó como control negativo.

#### 4.3.5. Efecto del 5-aza en la expresión de los genes en EBV

Para evaluar si la relación que existe entre la metilación de los promotores de los genes y la posterior represión de la expresión proteica descrita en mamíferos se presenta también en el caso del EBV, se realizaron una serie de ensayos incluyendo RT-PCR y Western Blot.

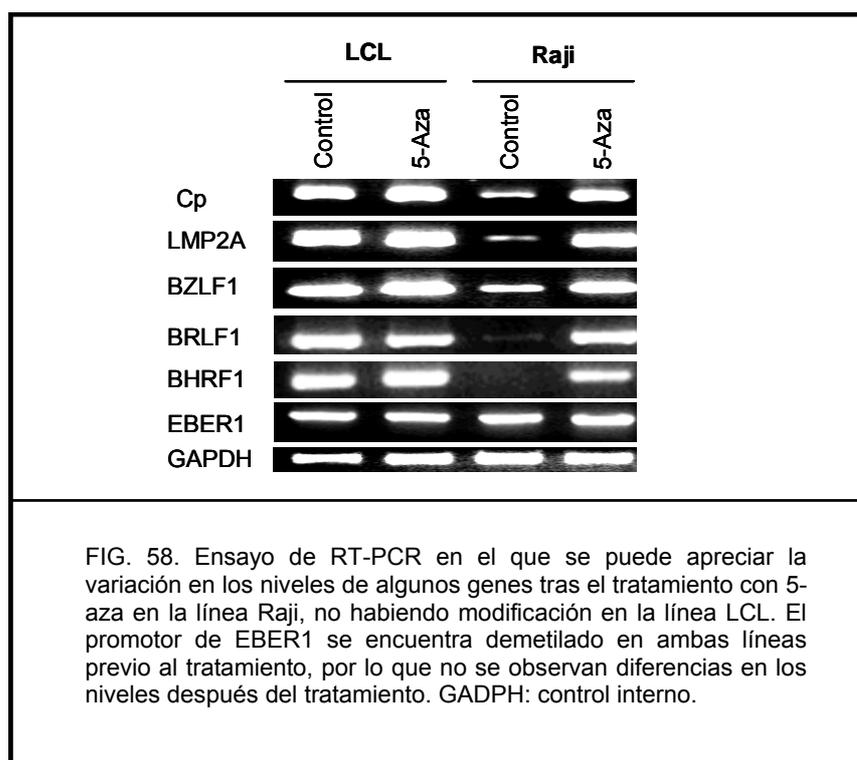
#### 4.3.5.1. Expresión de los genes de EBV según el estado de metilación de sus promotores

La asociación entre metilación del inicio de transcripción y silenciamiento genético se confirmó para los genes Cp, BRLF1, LMP2A, BZLF1 y BHRF1, mediante el análisis por RT-PCR en dos líneas celulares representativas de ambos estados de metilación (LCL y Raji). Para ejemplificar esto, en la figura 58 se observan los resultados obtenidos para los genes metilados en Raji pero no en LCL (Cp, BRLF1, LMP2A, BZLF1 y BHRF1) y EBER1 como ejemplo de gen no metilado en ambas líneas.

El promotor de EBER1 se encontró demetilado en todas las muestras estudiadas por secuenciación de bisulfito y por MSP. Mediante el ensayo de RT-PCR, se confirmó su expresión y se demostró que la misma no se altera mediante el uso de agentes demetilantes.

Ambas líneas se sometieron a tratamiento con el agente demetilante 5-Aza y mediante análisis por RT-PCR se observó que tras el tratamiento, la expresión de los genes que se encontraban metilados antes del tratamiento aumentan de manera significativa en Raji, mientras que no se modifican los niveles en LCL.

Esto nos llevó a pensar que la regulación de estas proteínas está en gran parte influenciada por el estado de metilación del promotor correspondiente.



Una proteína fundamental en la biología del EBV es sin dudas LMP1. El hecho de aparecer demetilado en los resultados vistos por secuenciación, nos llevó a evaluar su expresión en las distintas líneas. Los resultados de la RT-PCR se pueden ver en la figura 60.

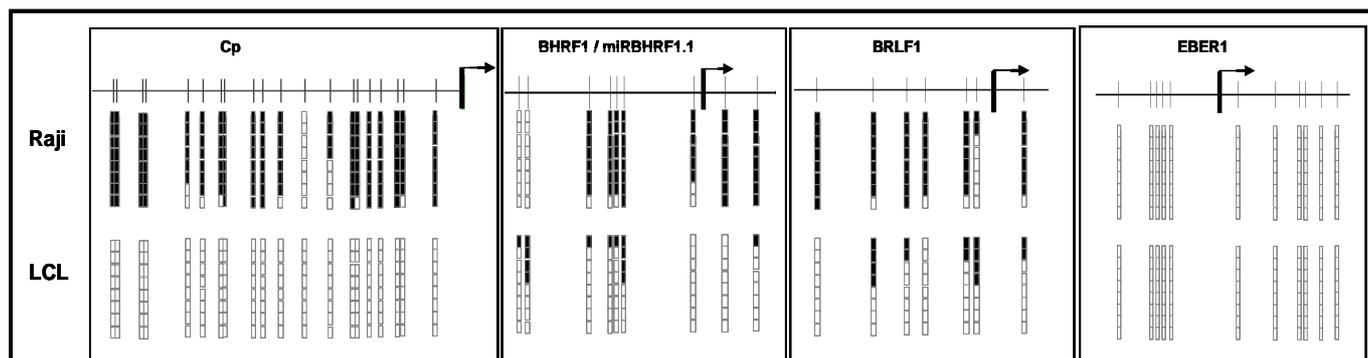


FIG. 59. Detalle de la secuenciación de bisulfito obtenida para algunos de los genes evaluados por RT-PCR. Se representa el estado de metilación de las líneas Raji y LCL previo al tratamiento con 5-aza en los promotores Cp, BHRF1, BRLF1 y EBER1.

Para pasar al siguiente nivel y confirmar lo observado a nivel de ARN por RT-PCR, se realizaron ensayos de Western Blot. Se estudió la variación en la expresión del gen EBNA2 (Cp) y LMP1 en las mismas líneas celulares (LCL y Raji) tras someterlas al tratamiento con 5-aza.

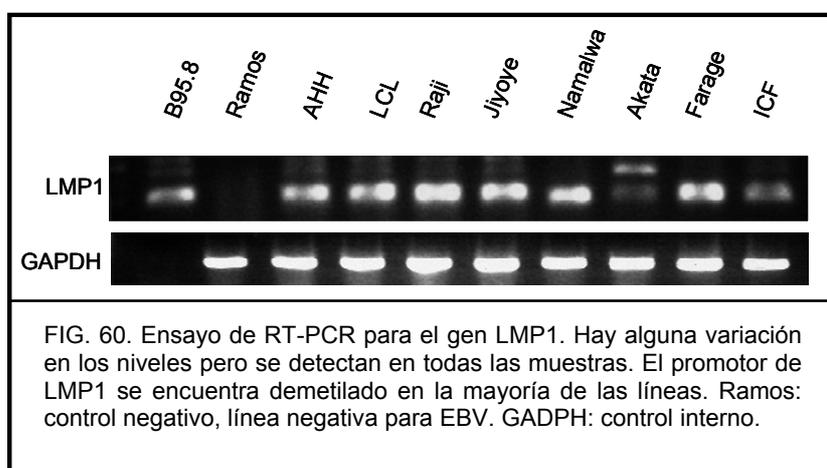


FIG. 60. Ensayo de RT-PCR para el gen LMP1. Hay alguna variación en los niveles pero se detectan en todas las muestras. El promotor de LMP1 se encuentra demetilado en la mayoría de las líneas. Ramos: control negativo, línea negativa para EBV. GAPDH: control interno.

Como se puede apreciar en la figura 61, la expresión de EBNA2 aumenta significativamente en Raji tras el tratamiento, manteniéndose sin modificar en LCL.

En las LCLs y líneas celulares tumorales, LMP1 se transcribe a partir de un promotor que se regula por metilación (Li, 2003). Este se encuentra silenciado en las líneas de linfoma de Burkitt pero puede ser reactivado por el uso de agentes demetilantes (FIG. 61). El silenciamiento de promotores por metilación implica la interferencia directa a la unión de los factores de transcripción, así como también mecanismos indirectos que involucran el reclutamiento de histona deacetilasas.

Como ya habíamos visto y confirmado por secuenciación y MSP, el promotor de ambos genes se encuentra demetilado en LCL, por lo que el tratamiento con un agente demetilante no afecta sus niveles de expresión.

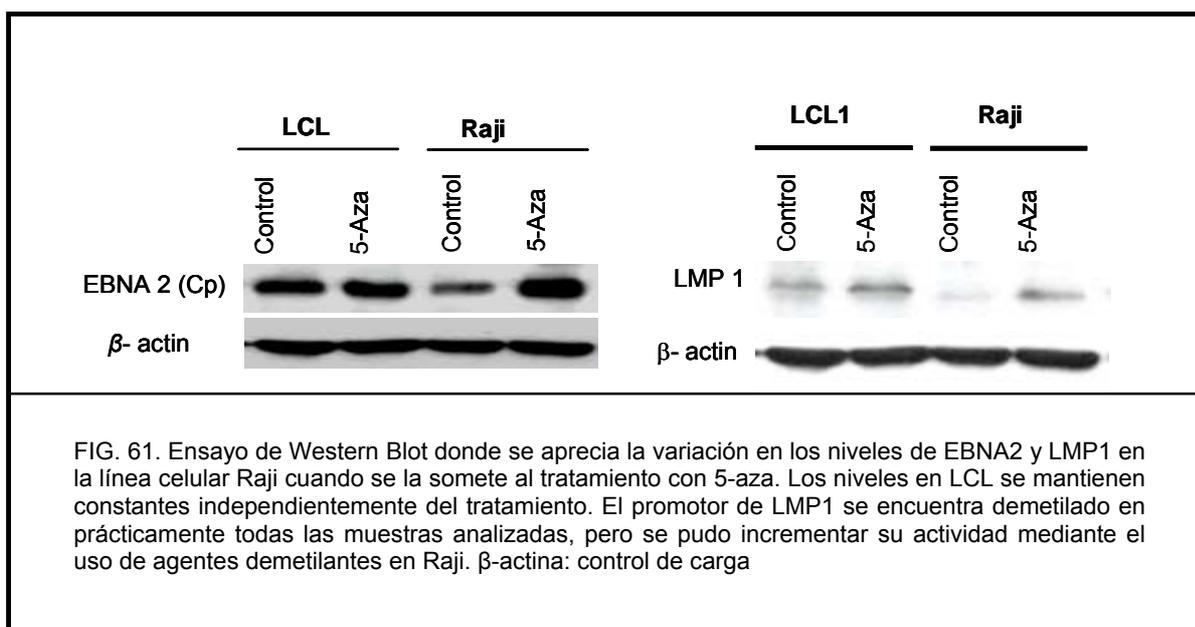


FIG. 61. Ensayo de Western Blot donde se aprecia la variación en los niveles de EBNA2 y LMP1 en la línea celular Raji cuando se la somete al tratamiento con 5-aza. Los niveles en LCL se mantienen constantes independientemente del tratamiento. El promotor de LMP1 se encuentra demetilado en prácticamente todas las muestras analizadas, pero se pudo incrementar su actividad mediante el uso de agentes demetilantes en Raji.  $\beta$ -actina: control de carga

#### 4.3.5.2. Metilación en microRNAs

En la línea celular de linfoma de Burkitt Akata, la región localizada 5' del gen BHFR1 se corresponde con el microRNA miR-BHFR1-1 (Pfeffer, 2004). Según nuestros resultados de secuenciación, esta región se encontraba altamente metilada.

Del mismo modo que sucede en las células humanas (Lujambio, 2007, Saito, 2006), la presencia de metilación en uno de los locus correspondientes a microRNA en EBV, también se corresponde con pérdida de su expresión.

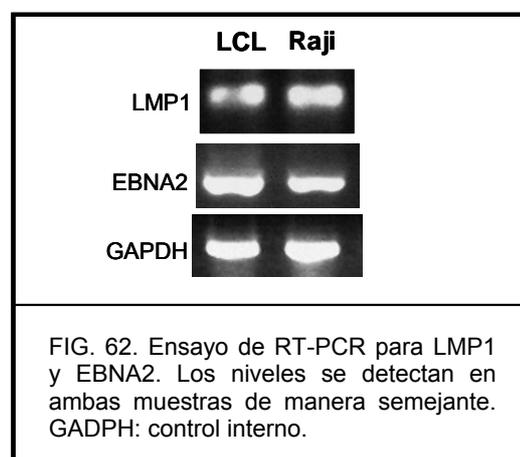


FIG. 62. Ensayo de RT-PCR para LMP1 y EBNA2. Los niveles se detectan en ambas muestras de manera semejante. GAPDH: control interno.

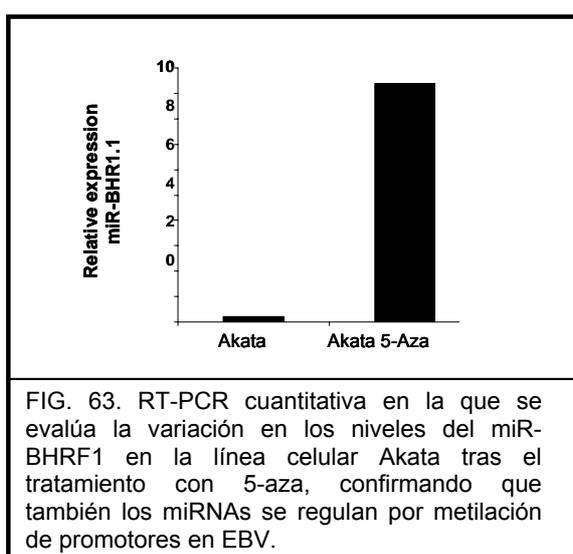


FIG. 63. RT-PCR cuantitativa en la que se evalúa la variación en los niveles del miR-BHFR1 en la línea celular Akata tras el tratamiento con 5-aza, confirmando que también los miRNAs se regulan por metilación de promotores en EBV.

Al realizar la RT-PCR cuantitativa en la línea Akata, se observó que miR-BHFR1-1 no se expresaba, pero que dicha expresión era posible recuperarla tras someter la muestra a tratamiento con 5-Aza, confirmando de este modo la asociación entre la metilación del ADN y el silenciamiento genético (FIG. 63).

#### 4.3.6. Metilación en ICF

En la enfermedad conocida como ICF (*Immunodeficiency, Centromere Instability, Facial Anomalies Syndrome*) los individuos que la padecen nacen con un defecto en la enzima DNMT3b (Okano, 1999, Xu, 1999). Los linfocitos inmortalizados de estos pacientes son una gran herramienta para comprender el funcionamiento de la maquinaria de metilación celular, habiéndose convertido en un instrumento de suma utilidad y ampliamente difundido (Jin, 2008, Matarazzo, 2007).

Si comparamos los linfocitos inmortalizados con EBV de estos pacientes (ICF) con los pertenecientes a un individuo normal (LCL), encontramos que la metilación es mucho menor, lo cual marca la importancia del papel de la enzima DNMT3b celular en la metilación del EBV (FIG. 64).

De manera similar a lo que observábamos en HPV16 y HPV18, parecería existir una comunicación entre las proteínas del EBV y las DNMTs de la célula que lo alberga. La proteína viral LMP1 induce la expresión y aumenta la actividad de las DNMTs humanas (Tsai, 2002). Como se demostró con los experimentos previos de secuenciación, tanto ICF como LCL poseen el promotor de LMP1 demetilado, lo cual supondría que la proteína es activa en ambas líneas y tendría la misma capacidad de reclutar las DNMTs, pero al estar mutada la DNMT3b en ICF, la metilación es menor en esta línea.

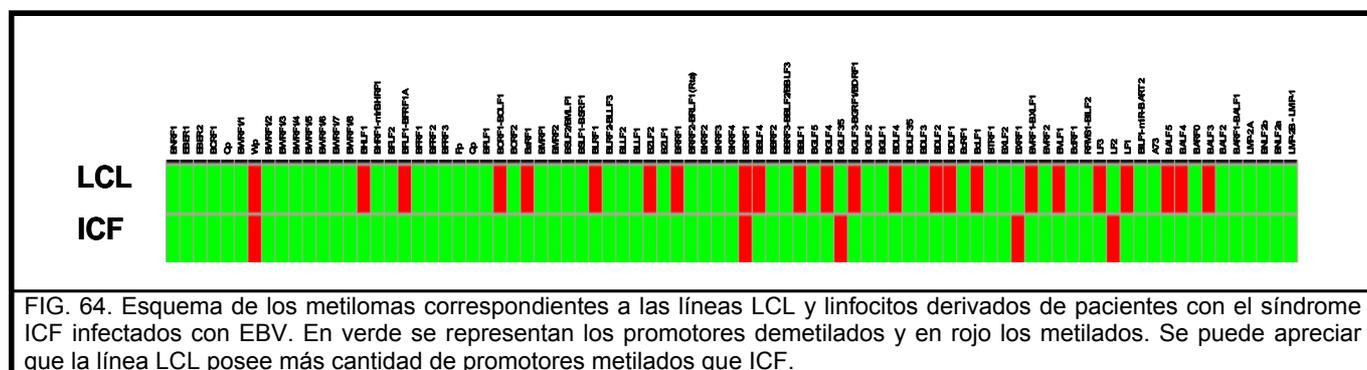


FIG. 64. Esquema de los metilomas correspondientes a las líneas LCL y linfocitos derivados de pacientes con el síndrome ICF infectados con EBV. En verde se representan los promotores demetilados y en rojo los metilados. Se puede apreciar que la línea LCL posee más cantidad de promotores metilados que ICF.

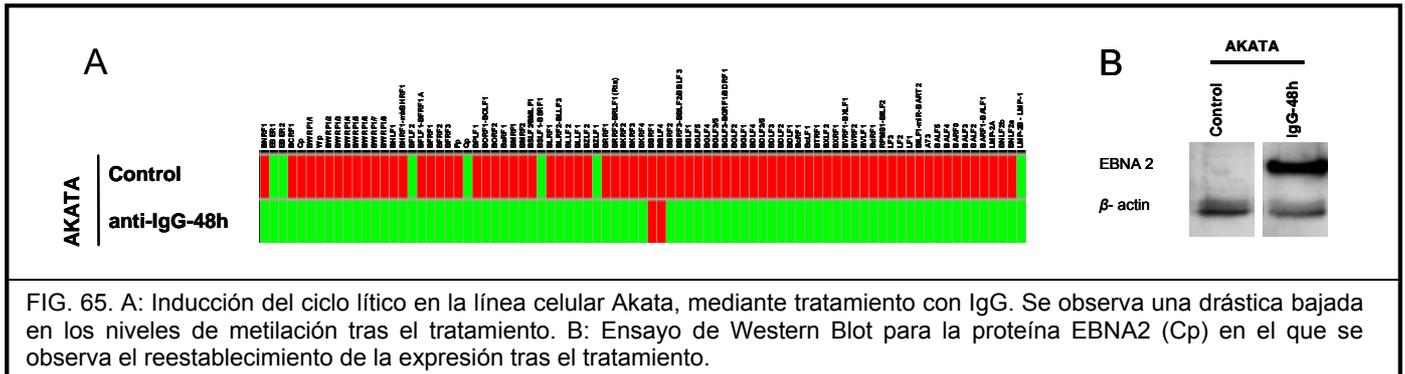
#### 4.3.7. Inducción del ciclo lítico.

Finalmente, como se demostró para los metilomas de HPV16 y HPV18, el nivel de metilación del EBV también sufre modificaciones adaptativas a los cambios del entorno biológico que implica a la célula hospedadora.

Las líneas celulares establecidas, en general contienen varias copias del genoma del EBV en estado latente. Nos propusimos investigar los cambios en el metiloma al pasar del estado de latencia al de ciclo lítico. El ciclo lítico puede inducirse en este tipo de células con tratamientos con varios compuestos, por ejemplo pirimidinas halogenadas, n-butilato, o anti-IgG de membrana (Daibata, 1990). La inducción del ciclo lítico en la línea celular Akata con anti-IgG, provocó un cambio drástico en el metiloma del EBV.

Ya en las primeras 8 horas de tratamiento se comienza a apreciar una demetilación significativa en varios promotores, alcanzándose el máximo a las 48 horas. Esta importante hipometilación, se acompañó del restablecimiento en la expresión de los genes que previamente poseían su promotor metilado. Como ejemplo, se puede ver en la figura 65 en un ensayo de Western Blot para el gen EBNA2, que no se expresaba en la línea antes del tratamiento, y se restablece su expresión después del mismo.

Con todos estos experimentos queda demostrada la naturaleza dinámica del epigenoma de los virus.





Discusión

---



## 5. Discusión

Esta tesis doctoral se ha centrado en indagar en profundidad el papel de la metilación de los genomas virales en los procesos tumorales asociados a éstos. Concretamente, se ha investigado el nivel de metilación en HPV16, HPV18 y EBV, y se ha ido un paso más allá estudiando la relación entre el patrón de metilación de sus CpGs y la expresión diferencial de sus proteínas. Por otro lado, se realizaron experimentos con agentes demetilantes y se analizaron las relaciones y las consecuencias biológicas de los cambios en los niveles de metilación virales. La descripción de los metilomas completos de organismos tan importantes como son los agentes virales asociados al cáncer humano, pueden tener un alto impacto en el éxito futuro del “Proyecto Epigenoma Humano” (Brena, 2006, Jones, 2005).

### 5.1. El metiloma del Papilomavirus humano

De los más de cien tipos de papilomas que existen, solo la infección con los de alto riesgo incluidos en este estudio se asocian con el 90% del cáncer cervical en mujeres y más del 50% de otros tumores anogenitales (zur Hausen, 2002). Lo interesante de esta enfermedad, es que a pesar de que hay en el mundo unas 300 millones de mujeres infectadas, la incidencia de las neoplasias asociadas a la infección es relativamente baja (de Sanjose, 2007). Aproximadamente un 90% de las infecciones con los HPV de alto riesgo se autolimitan y remiten espontáneamente (Moscicki, 2006). Esto quiere decir que el desarrollo del cáncer se produce sólo en aquellas pocas mujeres que no son capaces de resolver la infección y la mantienen durante muchos años. Hasta el momento se sabe poco de los mecanismos moleculares implicados en la progresión tumoral, por lo que la descripción realizada en este trabajo de los metilomas completos de estos virus pueden aportar datos fundamentales para comenzar a comprender mejor la biología del cáncer cervical que se asocia con ellos.

A pesar del gran énfasis que se dedica al diagnóstico precoz y a la mejora de los tratamientos quirúrgicos, la esperanza de vida a 5 años del diagnóstico de las mujeres con carcinoma cervical es de aproximadamente el 50% (Greenlee, 2001). Este problema enfatiza la necesidad de mayores estudios de la biología molecular de la enfermedad. En la última década se identificaron muchos cambios genéticos y epigenéticos relacionados con este tipo de cáncer, siendo el consumo de alcohol y tabaco uno de los factores de riesgo descritos más relacionados (Mashberg, 1993).

La linearización y posterior integración del ADN viral en el ADN cromosómico desencadena respuestas de metilación similares a las de cualquier ADN extraño. En consecuencia, la metilación de su ADN es una parte normal en la progresión a cáncer, y podría afectar a todas aquellas copias del genoma viral que no se requieren para mantener el estado de transformación, de ahí las diferencias observadas en los niveles de metilación de virus provenientes de los mismos tipos tumorales, pero de líneas conteniendo diferente número de copias (FIGS. 22, 26, 30C, 53 (Cp), 57).

El descubrimiento de un patrón de metilación particular para cada estadio de la enfermedad, puede ser utilizado como una importante herramienta para evaluar la progresión del proceso tumorigénico.

Aunque previamente se había hecho una aproximación al estudio de la metilación en estos virus, sólo se analizaron pequeñas regiones y en un número limitado de muestras (Zheng, 2006, Ambinder, 1999, Minarovits, 2006). En este estudio, además de cubrir todo el genoma viral, se analizaron las relaciones y las consecuencias biológicas producidas por los cambios en los niveles de metilación.

Los metilomas de los HPV descritos reflejan fielmente los patrones de expresión proteicos en la tumorigénesis cervical, caracterizada sobre todo por la sobreexpresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 en los carcinomas más avanzados (*FIGS. 30B, 31A*) (Butel, 2000, Gatz, 2005, Zheng, 2006, Wise-Draper, 2008).

La integración de los genomas de HPV en los cromosomas celulares está descrita en todas las líneas celulares de cáncer cervical y en un alto porcentaje de tumores positivos para HPV16 y HPV18, siendo mucho menos frecuente en las lesiones precancerosas (Hopman, 2004). Estas observaciones sugieren que la integración de los genomas virales es un evento clave en la tumorigénesis cervical, ya que podría llevar incluso a inestabilidad cromosómica. Utilizando la técnica de FISH, se confirmó la integración de los HPV en las líneas celulares utilizadas y se pudo cuantificar aproximadamente la presencia viral en cada caso (*FIG. 26*).

La técnica de secuenciación nos permitió confirmar en un determinado número de muestras que porciones del virus se encontraban delecionadas, en general coincidiendo con la región correspondiente a los genes E1/E2. Como se mencionó anteriormente, la proteína E2 inhibe la proliferación celular regulando, a través de la región URR, la represión de las oncoproteínas E6 y E7, y provocando arresto celular en G2 (Frattini, 1997). Teniendo en cuenta estos antecedentes, podríamos pensar que la pérdida genómica de E2 como consecuencia de la integración podría contribuir a la progresión de la enfermedad.

Sin embargo, en muchos casos el genoma viral se encontraba completo, y comprobamos por Western Blot que E2 se expresaba (*FIG. 30A, 44A*). A pesar de esto, al estudiar que pasaba con la metilación en la región URR, encontramos que si esta se encontraba metilada en el sitio de unión de E2, había sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 (*FIG. 30B, 31A*). Con el ensayo de ChIP demostramos que esto podría ocurrir ya que E2 era incapaz de unirse a la URR si se encontraba metilada. Para confirmar esta hipótesis, se empleó un agente demetilante, y tras comprobar la demetilación de URR, se vio que E2 era capaz de volver a unirse en su sitio de la URR y que esto se correlacionaba con una marcada reducción en la expresión de las proteínas E6 y E7, demostrando la importancia de la reversibilidad de las alteraciones epigenéticas (*FIG. 30, 31*).

Se sabe que el proceso tumorigénico es una combinación de alteraciones genéticas y epigenéticas. La alteración epigenética más importante en cáncer es sin lugar a dudas, la

metilación aberrante de citosinas. En las células normales, el patrón de metilación se conserva fielmente a través de las divisiones celulares, sin afectar a la expresión de los genes imprescindibles para ese tipo celular concreto, pero manteniendo silenciados a los genes que no se corresponden con el tipo celular como así también las secuencias repetitivas y endoparasitarias (Jones, 1999, Baylin, 2001, Esteller, 2002). En las células tumorales en cambio, se produce una alteración en los fenómenos de metilación, que llevan a hipometilación global combinada con hipermetilación de ciertos promotores de genes, por ejemplo, supresores de tumores. Ambos procesos están asociados a una actividad desregulada de la maquinaria enzimática de metilación, principalmente las DNMTs. La pérdida de metilación en las células tumorales se produce en los dinucleótidos CpG ubicados en el cuerpo de los genes y en las secuencias repetitivas. Dicha pérdida se correlaciona con inestabilidad cromosómica y reactivación de secuencias endoparasitarias, como los trasposones, que pueden cambiar de posición dentro del genoma celular, con graves consecuencias para la misma.

La proteína E7 aumenta la actividad metiltransferasa de la DNMT1 (Burgers, 2007). Este aumento en la metilación del ADN de la célula puede traer como consecuencia el silenciamiento de genes supresores de tumores, facilitando la transformación maligna. Los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen una alternativa terapéutica más que interesante, ya que el uso de agentes que modulen la metilación, no solo lograrían reactivar los genes celulares silenciados por hipermetilación, sino que también, al actuar sobre las proteínas reguladoras virales, podrían recuperar su función y de este modo reducir la expresión de las oncoproteínas (*FIG. 31A, 44C*).

Aunque no se conocen con certeza todos los factores que determinan la progresión de una lesión subclínica al carcinoma invasivo, se sabe que la inactivación de los genes supresores de tumores por hipermetilación de sus promotores juega un papel fundamental. En el caso de la carcinogénesis cervical, este es un evento temprano, y va aumentando tanto cualitativa como cuantitativamente con la progresión de la lesión. Por ejemplo, la metilación de RAR $\beta$  y GSTP1 sucede al inicio del proceso carcinogénico, posteriormente se encuentra la metilación de p16 y MGMT, y finalmente se metila FHIT (Virmani, 2001, Dong, 2001).

La maquinaria de metilación celular también es capaz de actuar sobre el genoma del virus que está infectando a la célula. Esta hipótesis de defensa mediada por el hospedador se basa en los datos observados en cuanto a la metilación de genes exógenos que se integran en los cromosomas (transgenes, genomas adenovirales transfectados). Sorprendentemente, algunos virus encuentran la forma de interactuar e incluso tomar ventaja de esta modificación, permitiéndoles por ejemplo, establecer infecciones persistentes y ayudándolos a evadir el sistema inmune.

Hemos demostrado la naturaleza dinámica del epigenoma viral estudiando los cambios en los niveles de metilación a lo largo del proceso de immortalización de queratinocitos humanos. En ambos tipos virales, HPV16 y HPV18, se comprobó que los niveles de metilación van aumentando a medida que las células se van immortalizando (*FIGS. 27, 28, 40, 41*). En particular, los infectados con HPV18, se sometieron a tratamiento con 5-aza, observando respuesta tanto a

nivel de reducción de la metilación, como así también en la variación en la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 (FIG. 44C).

Una de las metas de los estudios clínicos en cáncer persigue la definición de parámetros específicos y sensibles que conduzcan a una clasificación precisa, fiable y reproducible de un tumor, que pueda emplearse para la predicción de su comportamiento, probabilidad de metastatizar, respuesta a fármacos y detección temprana entre otros factores. En este trabajo se aportaron argumentos sólidos y evidencias que apoyan el valor de los patrones de metilación como marcadores moleculares de gran utilidad. Los exámenes histológicos y citológicos no distinguen de manera fiable a las pocas mujeres que tienen lesiones asintomáticas que progresarán a cáncer de aquellas cuyas lesiones remitirán espontáneamente. La utilización de la técnica de MSP demostró reproducir fielmente los resultados vistos por secuenciación. Esto puede tener una aplicación práctica inmediata, ya que constituye una técnica rápida, sencilla y económica.

Aunque la mayoría de las mujeres en algún momento se infectarán con el HPV, sólo en unas pocas la infección progresará a cáncer. Por lo tanto, son necesarios biomarcadores más consistentes de progresión de la enfermedad que aquellos que se utilizan del examen morfológico. La identificación de factores virales y del hospedador que modulen el riesgo de progresión de la enfermedad en mujeres infectadas, requiere una comprensión más completa y detallada de la historia natural de la infección con HPV y su relación con la adquisición de anomalías epiteliales.

Es esencial una comprensión más completa de los mecanismos de persistencia del HPV. Una meta más inmediata sería determinar con que frecuencia, en que subpoblación de células epiteliales y de que forma, el ADN del HPV puede detectarse en el tejido cervical tras no haber podido ser detectado en las muestras de citología. También sería interesante estudiar los cambios relacionados con la edad en los patrones de metilación de los genomas virales, dada la posibilidad que el HPV persista en un estado latente regulado epigenéticamente.

Sólo los estudios longitudinales en mujeres con infección por HPV pueden distinguir aquellos eventos epigenéticos directamente atribuibles a la infección con HPV o a otros cofactores (como por ejemplo el tabaco), de aquellos secundarios al proceso de la enfermedad. Estos estudios mostrarán la frecuencia de la persistencia de los cambios epigenéticos después que el HPV no se detecta más mediante citología, o después del tratamiento de una CIN.

En cuanto a las aplicaciones para la investigación básica, el fácil acceso para obtener muestras de cérvix, a diferencia de la mayoría de las otras localizaciones del cáncer, lo convierte en un modelo ideal para explorar la progresión del fenotipo premaligno *in vivo*, en el que se podrían incluir los cambios genéticos y epigenéticos y como estos cambios se relacionan con la presencia de virus oncogénicos. El llegar a comprender completamente estos mecanismos, puede ser relevante para otros modelos de carcinogénesis viral.

En último término, se presume que estas iniciativas constituirán un suministro de potenciales herramientas, contribuyendo a desentrañar los mecanismos moleculares que desencadenan y promueven el proceso neoplásico, y que además se conciben como posibles marcadores biológicos de indudable potencial clínico y biológico.

Algunos estudios a pequeña escala mostraron que el gen L1 de HPV18 se encontraba hipermetilado en los carcinomas y no metilado en las lesiones benignas. En este trabajo se ha analizado el genoma completo en un gran número de muestras, en el que se demuestra que los genomas de los papilomavirus se encuentran hipometilados en las lesiones benignas o asintomáticas, y que esta metilación aumenta a medida que progresa la enfermedad maligna (FIG. 38), confirmando los resultados de grupos previos realizados sólo en pequeños fragmentos del virus (Turan, 2006, Badal, 2004, Kalantari, 2004).

El estudio de la metilación a gran escala en este trabajo se realizó utilizando la secuenciación de bisulfito, la cual aporta también información sumamente útil sobre alteraciones genéticas, convirtiendo el estudio en un análisis muy completo tanto desde el punto de vista epigenético como genético (FIG. 21). Se encontraron en múltiples ocasiones mutaciones puntuales pero que no pudimos relacionar con ningún patrón en particular.

Aunque se está realizando un gran esfuerzo en estos días para prevenir el cáncer cervical, tanto con el desarrollo de vacunas profilácticas y mejorando las técnicas de detección precoz, la naturaleza compleja de la infección con HPV requiere una mayor comprensión de los mecanismos que subyacen tanto el ciclo de vida como los mecanismos de inducción de carcinogénesis mediada por el HPV. El estudio de la metilación aberrante de genes celulares en combinación con el patrón de metilación viral, puede convertirse en una poderosa herramienta tanto diagnóstica como pronóstica del cáncer cervical.

## 5.2. El metiloma del EBV

La regulación transcripcional de los genes del EBV juega un papel primordial al permitir la persistencia del virus durante toda la vida del individuo infectado a pesar de codificar para proteínas altamente inmunogénicas. Hace ya veinte años que se sospecha que los mecanismos epigenéticos, particularmente la metilación del ADN, tienen un papel muy importante en la regulación de sus promotores. De hecho, el EBV parece haber usurpado el sistema de metilación celular para usarlo de tal manera que le permite ocultarse del sistema inmune, para optimizar su habilidad de persistencia a largo plazo.

La secuenciación de todos los promotores del EBV ha sido un proyecto a gran escala y ha generado un gran volumen de información, a la cual se puede acceder mediante la aplicación “Methylyzer” (ver ANEXO I). Se confirmó que la metilación diferencial de los promotores virales desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica viral en tejidos normales y neoplásicos, en la evasión del sistema inmune y en la resistencia de las células infectadas a las drogas antivirales. El análisis exhaustivo del patrón de metilación de todos los

promotores de este virus permitió profundizar en el papel que desempeña la infección por EBV en el desarrollo y progresión tumoral.

Los datos obtenidos parecen indicar que el grado de metilación de los promotores virales está directamente relacionado con la gravedad de la lesión a la que pertenecen. No obstante, se observa que hay genes que permanecen no metilados en un entorno altamente metilado (EBER 1 y 2, Qp, BZLF1 y LMP1), son los que se identifican como genes clave en la persistencia de la infección o con potencial oncogénico (FIG. 49, 52). Otra curiosidad fue la encontrada en relación al número de copias virales presentes en la célula infectada con el nivel de metilación del virus. Mediante el ensayo de FISH, observamos que líneas del mismo tipo tumoral pero portando un mayor número de copias de EBV, los niveles de metilación de este último eran mucho más altos (FIG. 53, 57).

La línea linfoblastoide derivada de pacientes ICF (mutante para la DNMT3b) presenta un bajo nivel de metilación en la mayoría de sus promotores, demostrándose la importancia de la maquinaria de metilación celular, sobre los genomas virales (FIG. 64). Sería interesante poder repetir estos experimentos en líneas linfoblastoides mutantes para otras proteínas de la maquinaria de metilación celular, para evaluar la relevancia relativa de cada uno de sus componentes en la modificación del epigenoma viral, e identificar de este modo posibles dianas terapéuticas.

Resulta interesante que el promotor de LMP1 se encuentra prácticamente demetilado en casi todas las muestras estudiadas por secuenciación. Partiendo de estas observaciones, se comprobó su expresión tanto en los experimentos de RT-PCR como en los de Western Blot, en líneas celulares y también en tumores primarios asociados a EBV (FIG. 60, 61, 62).

LMP1 es una oncoproteína viral crucial en la transformación de las células B *in vitro* para el establecimiento de la infección latente (Kaye, 1993). Esta proteína ejerce una importante función en la progresión del proceso carcinogénico, alterando rutas implicadas en crecimiento y supervivencia celular, induciendo pérdida de adhesividad que favorecería la metástasis tumoral, e inhibiendo la infección por otros virus por la inducción de la producción de IFN. Su expresión en estado de latencia es importante para la producción de señales antiapoptóticas, así como para inhibir la entrada en ciclo lítico mediante la vía de NF-KB (Xu, 2006).

EBNA2 es igualmente importante en el proceso de transformación celular. Junto a EBNA-LP es el primer antígeno viral expresado tras la infección primaria. Induce la expresión del marcador de membrana CD21, así como también la de LMP1 Y LMP2 (Kieff y Rickinson, 2001) y es requerido para estimular y mantener la proliferación de las células B infectadas (Mohan, 2006). En una primera fase de infección, EBNA2 se transcribe a partir del promotor Wp, no obstante, en estadios posteriores, EBNA2 induce la activación de Cp en detrimento de Wp (Young y Murray, 2003) que queda inactivo por metilación.

En la línea LCL se observan altos niveles de expresión de EBNA2, correlacionándose con la ausencia de metilación de sus promotores (FIG. 61, 62). Sin embargo, en la línea celular Raji,

la expresión de EBNA2 es poco significativa, debido a que los promotores a partir de los cuales se transcribe se encuentran altamente metilados, aunque no lo suficiente para reprimir completamente su expresión. Esto coincide con el programa de latencia I (bajos niveles de EBNA2 y LMPs), pero se puede inducir el cambio al estado de latencia III con el uso del 5-aza, aumentando así los niveles de ambas proteínas (FIG. 58, 61, 62).

La transcripción de EBNA2 está regulada por metilación de la región promotora, tal y como muestran los experimentos con el 5-aza: al someter a las líneas metiladas a este tratamiento, la expresión de EBNA2 aumenta, mientras que las líneas no metiladas no exhiben cambios en su expresión. Además, al analizar de forma conjunta la expresión de EBNA2 y LMP1 en líneas tumorales, se observa que la expresión de esta última aumenta ligeramente, a pesar de no mostrar metilación en la región promotora. Esto se atribuye a que EBNA2, además de actuar en la activación de Cp e inactivación de Wp, es transactivador de la expresión de LMP1 (Alazard, 2003). Por lo tanto, un aumento en los niveles de EBNA2 como consecuencia del tratamiento con un agente demetilante incrementa los niveles de LMP1. No obstante, los mecanismos por los que se produce tal activación son desconocidos por ahora, aunque probablemente ocurra a nivel post transcripcional, ya que los niveles de ARN detectados por RT-PCR son mayores que los de proteína vistos por Western Blot, sugiriendo que el punto de control podría situarse entre ambos (FIG. 61, 62).

Dada la importancia de las proteínas derivadas de los promotores Cp y Wp para la biología del EBV, se discutirán más en detalle los resultados obtenidos para estos promotores. En la infección inicial de las células B, Wp es el primer y único promotor activo. La secuenciación de este promotor mostró que se encuentra demetilado tanto en el virus wild-type como en la lesión inicial que se corresponde con la linfadenitis reactiva (FIG. 53). En este contexto, se expresan los seis EBNA, las 3 LMPs y los 2 EBERs.

EBNA2 actúa como un transactivador transcripcional de Cp, lo que lleva a que en unos días, se detiene la transcripción desde Wp y se activa desde Cp, permaneciendo como el promotor dominante de la latencia (Woisetschlaeger, 1991). Esta hipermetilación de Wp predomina en todas las líneas celulares portadoras de EBV estudiadas, como así también en los tumores asociados a EBV y LCLs. La metilación en Wp se empieza a detectar a los 7 días de la infección, alcanzando el máximo a los 18 días (Tierney, 2000). De forma sorprendente, Wp también está metilado en los PTLD que tienen demetilado Cp y expresan las proteínas inmunogénicas de la familia EBNA (FIG. 53).

Los estudios con líneas derivadas de pacientes con el síndrome ICF revelaron que una proporción muy significativa de la metilación *de novo* de Wp es mediada por DNMT3b. Si comparamos los porcentajes de metilación obtenidos en estas líneas linfoblastoides, en la que posee la mutación para la DNMT3b es de un 8,3%, en contraste con el 74% observado en la línea sin mutación (FIG. 64).

Por lo tanto, la metilación del ADN es el mecanismo principal de regulación en el cambio de Wp a Cp después de la infección primaria en células B.

El papel de la metilación en la regulación del promotor Cp también está muy bien caracterizado. Los elementos regulatorios de Cp incluyen al origen de replicación viral (oriP) y los elementos de respuesta de ENBA2 (Jin, 1992).

La secuenciación de bisulfito y la MSP han demostrado que Cp se encuentra demetilado en LCLs y PTLT, que representan un estadio intermedio en la progresión de la enfermedad maligna. Estos datos encajan perfectamente con la clasificación de latencia III a la que pertenecen estas lesiones (Young, 1989, MacMahon, 1991). Contrariamente, Cp se encuentra hipermetilado y silente en la mayoría de los tumores asociados a EBV. Sin embargo, el tratamiento con 5-aza puede reactivar la transcripción desde Cp en estos tumores, induciendo su hipometilación (FIG. 53, 56A, 58).

En LCLs, donde Cp es activo, está descrito que la metilación puede ir aumentando paulatinamente con los sucesivos pasajes. En un estudio utilizando líneas linfoblastoides con mutación en DNMT3b se demostró que al igual que ocurría con Wp, DNMT3b es un importante regulador de la metilación *de novo* de Cp (Tao, 2002). En nuestros resultados de secuenciación de bisulfito, en todas las LCLs, incluyendo las derivadas de pacientes ICF, Cp se encontró completamente demetilado (FIG. 53).

Los antígenos virales expresados inicialmente por el EBV inducen una respuesta por parte de las células T, por lo que el virus debe adoptar una forma alternativa para mantenerse sin ser reconocido por el sistema inmune caracterizada por la expresión restringida a EBNA1 a partir de un promotor alternativo, Qp.

EBNA1 es necesaria para asegurar la replicación y el mantenimiento del episoma viral para garantizar la persistencia de la infección. Además, está implicada en la activación de numerosos genes virales, y no induce respuesta por parte del sistema inmune (Hong, 2006).

De este modo, Wp y Cp deben estar muy bien regulados para permitir la persistencia del EBV en la célula infectada. El virus parece lograr este objetivo haciendo uso de la maquinaria de metilación celular, metilando selectivamente los promotores que llevarían a la expresión de genes susceptibles de ser reconocidos por el sistema inmune (Cp y Wp), y dejando otros demetilados que conducen la expresión de proteínas indispensables para la replicación viral (EBNA1 vía Qp).

Una característica llamativa e interesante es que Qp se encuentra demetilado en todas las situaciones estudiadas (tumores primarios, líneas celulares, etc.) (FIG. 52). Qp es un promotor sin TATA box, rico en secuencias CpG, y regulado por el factor de transcripción celular Sp1 (Tao, 1998).

Si la transcripción de EBNA1 se lleva a cabo por los promotores Wp y Cp, da como resultado un ARN mensajero policistrónico que codifica no sólo para EBNA1, sino también para otros EBNA1s (Bodsworth, 1986). Esta situación resulta en la expresión del extenso patrón genético descrito en la latencia III que se encuentra en las LCLs y en los linfomas de los individuos

inmunocomprometidos: los 6 EBNA1s, las 3 LMPs y los 2 EBERs (TABLA 11). De manera alternativa, EBNA1 puede transcribirse desde Qp, que actúa como un promotor constitutivo, garantizando la expresión de EBNA1 en todas las células positivas a EBV (Schaefer, 1995).

En los linfomas y carcinomas asociados a EBV de pacientes inmunocompetentes, Cp y Wp son inactivos por encontrarse metilados, utilizando a Qp para la transcripción de EBNA1 (Schaefer, 1995, 1997, Nonkwelo, 1996). Esto da como resultado que sólo se expresa EBNA1, la cual no es reconocida por las células T citotóxicas (Levitskaya, 1995). En la latencia I del linfoma de Burkitt se detectan también los EBERs, y en los linfomas y carcinomas en latencia II además de EBNA1 y los EBERs también se detectan las LMPs (Brooks, 1992) (TABLA 11).

Se confirma de este modo el papel fundamental y la asociación de los patrones de metilación del ADN en la regulación de los cambios en la actividad de los diferentes promotores asociados a los distintos tipos de latencia presentes en EBV. La actividad de estos promotores se correlaciona inversamente con su estado de metilación, sin embargo, Qp es la excepción, siendo su actividad independiente de su nivel de metilación.

Regulación de la infección lítica por metilación del ADN.

En las enfermedades linfoides y epiteliales asociadas con EBV la replicación viral es rara. El episoma viral se mantiene por la sola expresión del antígeno nuclear EBNA1, que interacciona con el ADN celular y con el origen de replicación viral.

El EBV debe convertirse periódicamente al ciclo lítico para secretar partículas virales en la saliva de los individuos infectados y así poder infectar nuevos hospedadores (Kieff, 1996, Rickinson, 1996). El ciclo lítico del EBV es iniciado por la expresión de dos genes inmediatos tempranos: Zta y Rta, transcritos desde los promotores Zp y Rp (o BZLF1 y BRLF1) respectivamente (Flemington, 1991). Ambas proteínas son factores de transcripción que se unen y activan a una serie de promotores de genes líticos (Kenney, 1989).

BZLF1 es un factor de transcripción de la familia de b-Zip que exhibe homología con c-Fos y C/EBP (Kouzarides, 1991). Ejerce su actividad asociándose a proteínas implicadas en la transcripción celular (c-Myb, TFIID y CBP) y activando la transcripción de los genes inmediatos tempranos y tempranos del EBV (Kenney, 1992). BZLF1 se une directamente a los motivos AP1 de EBV, como así también al promotor de BRLF1. Además, se une al origen lítico del EBV, lo que es un prerrequisito para la replicación lítica del ADN viral (Fixman, 1995). En la línea de linfoma Raji, la expresión de BZLF1 solamente es suficiente para inducir el ciclo lítico (Rooney, 1989, Zalani, 1996).

BRLF1 activa el ciclo lítico en EBV en células epiteliales y linfocitos B (Ragoczy, 1998), uniéndose directamente a los motivos ricos en CG presentes en ciertos promotores tempranos, pero activa a BZLF1 a través de un mecanismo indirecto (Quinlivan, 1993, Adamson, 2000). También colabora con BZLF1 en la activación de los genes tempranos (Cox, 1990). Además, activa la expresión de E2F1 influenciando la replicación lítica del EBV de manera indirecta (Chang, 1998).

**TABLA 11. Relación de los promotores con los distintos programas de latencia**

LATENCIA	PROMOTOR	EJEMPLO
<b>I</b>	Qp (EBNA1), EBER, BARF0	Linfoma de Burkitt
<b>II</b>	Qp (EBNA1), EBER, BARF0, BARF1, LMPs	Carcinoma Nasofaríngeo
<b>III</b>	Cp (6 EBNA's), EBER, BARF0, LMPs	LCL, líneas cultivadas <i>in vitro</i>

La expresión de Zta es suficiente para iniciar la cascada de expresión de genes líticos que culmina con la producción de nuevas partículas virales infectivas en las células B. BRLF1 requiere la activación de las vías de p38, PI3 kinasa y c-Jun; sin embargo, Rta solamente puede desempeñar este papel en las células epiteliales (Zalani, 1996, Darr, 2001).

La gran mayoría de las células infectadas con EBV tienen al virus en estado de latencia, aunque algunas pueden exhibir activación lítica espontánea (por ejemplo, la ampliamente utilizada B95.8), y ciertos tratamientos como por ejemplo con IgG o TPA pueden inducir la activación del ciclo lítico en ciertas líneas celulares establecidas (Sinclair, 1991).

Aunque Zp y Rp no están tan bien caracterizados como lo estaban Cp y Wp, su regulación controlada es igualmente crucial para la persistencia viral. La activación del ciclo lítico puede ser perjudicial para el EBV debido a que lleva a la lisis celular, y además por que las proteínas expresadas, por ejemplo Zta, son altamente inmunogénicas para las células T citotóxicas (Bodegain, 1994).

El análisis de metilación por secuenciación de BZLF1 reveló que prácticamente todas las muestras analizadas tienen este promotor demetilado (FIG. 49). No está claro el porque este promotor se encuentra aparentemente protegido de la maquinaria de metilación celular. A pesar de esto, al analizar los niveles de mRNA por RT-PCR en la línea de linfoma Raji, se observa un incremento en sus niveles al someterla al tratamiento con 5-aza (FIG. 58). Una posible explicación a esto, podría ser que a pesar de encontrarse el promotor demetilado, los niveles de expresión no son significativos, y se necesita la demetilación de otros promotores para que el producto de BZLF1 alcance el nivel necesario para llevar a cabo su función. Si se comparan los niveles obtenidos en LCL, se comprueba que se mantienen constantes a pesar de someter la muestra al mismo tratamiento demetilante. Esto lleva a pensar que si la diferencia entre ambas muestras no es la metilación de BZLF1 en sí mismo sino la de otros promotores, evidentemente la regulación de esta proteína tan importante no se corresponde con los niveles de metilación de su propio promotor, sino con el nivel de otro u otros que podrían influenciarlo.

Por el contrario, BRLF1 mostró un alto nivel de metilación en la mayoría de los tumores analizados, pero se encuentra demetilado en las LCLs y virus wild-type (FIG. 49). Mediante el ensayo de RT-PCR, se confirmó que sus niveles de expresión eran dependientes de la metilación del promotor. Raji es una línea de linfoma de Burkitt ampliamente utilizada en la investigación con EBV que posee el promotor de Rta altamente metilado. Los niveles de mRNA de este gen no

se pudieron detectar por RT-PCR, en cambio aumentaron significativamente al someter a la línea al tratamiento con 5-aza (*FIG. 58*).

En el caso de LCL, los niveles se mantuvieron constantes a pesar del tratamiento, demostrando la importancia de los niveles de metilación en la regulación de este promotor tan importante para la biología del EBV.

También en el caso de BZLF1 y BRLF1, al observar el estado de metilación de estos promotores en la línea ICF mutante para DNMT3b, se observa que es altamente dependiente de esta enzima, al encontrarse Zp y Rp completamente demetilados.

La actividad del promotor Fp en la mononucleosis infecciosa y los desórdenes proliferativos post trasplante probablemente refleja la replicación lítica del EBV. Estas dos entidades son reconocidas como las manifestaciones clínicas de la infección primaria con EBV (Evans, 1972). Fp se activa bajo la inducción del ciclo lítico (Nonkwelo, 1996).

Si en el linfoma de Burkitt se detectan células que entren en ciclo lítico, se relaciona a una mejor respuesta a la quimioterapia (Gutiérrez, 1993, Labrecque, 1999). La transcripción desde Qp en ausencia de Fp ocurre en linfomas de pacientes inmunocomprometidos (Brink, 2001). La expresión ubicua de los transcritos de Qp indica que éste podría considerarse como un promotor constitutivo, el cual asegura la transcripción constante de EBNA1 y de este modo el mantenimiento del episoma viral en la célula. El conocimiento de que la expresión de los genes de EBV durante la latencia tumoral está restringida de forma de no ser reconocido por las células T, sugiere que es un mecanismo por el cual las células infectadas de forma latente persisten en individuos con sistemas inmunes normales.

Otros promotores que escapan al control por hipermetilación son los pertenecientes a EBER1 y EBER2 (Minarovits, 1992) (*FIG. 49*). Ambos genes EBER son transcritos por la ARN polimerasa III. Aunque sus funciones todavía no se conocen, probablemente sean indispensables para la supervivencia viral, ya que se confirmó su expresión tanto en los tumores asociados a EBV como en LCLs y se encontraron demetilados en la totalidad de las muestras estudiadas por secuenciación.

Alteración de los patrones de expresión génicos por el uso de agentes demetilantes.

La dependencia del EBV en la metilación del ADN y la presencia del virus en todas las células tumorales, ofrecen oportunidades únicas para eliminar específicamente a las células tumorales infectadas con el EBV.

El compuesto 5-aza-2-deoxicitidina reduce la metilación global de ADN actuando como sustrato de las DNMTs, dando como resultado una demetilación pasiva del genoma en la siguiente ronda de replicación (Juttermann, 1994). El uso de agentes demetilantes en enfermedades asociadas a EBV tiene más ventajas que su uso como agente demetilante de genes supresores de tumores. En primer lugar, el genoma del EBV sólo está presente en las células tumorales, y éste tiene la capacidad potencial de codificar numerosos antígenos que desencadenen una respuesta inmunológica potente por parte de las células T citotóxicas en individuos inmunocompetentes. De

este modo por ejemplo, la demetilación de Cp, Wp o Rp podría resultar en la expresión de proteínas inmunogénicas que harían al tumor susceptible al ataque mediado por estas células. En segundo lugar, la inducción de Rp y por consiguiente la entrada en el ciclo lítico proveería además una actividad antitumoral extra, no sólo por presentar más antígenos en la célula tumoral, sino también por la lisis celular inducida por el virus.

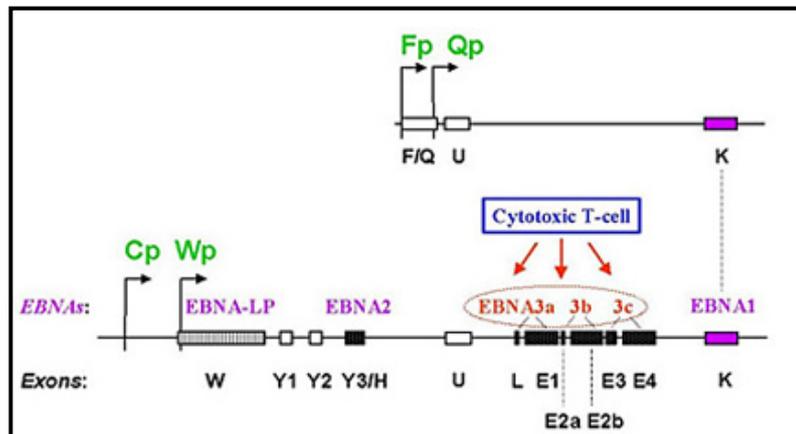
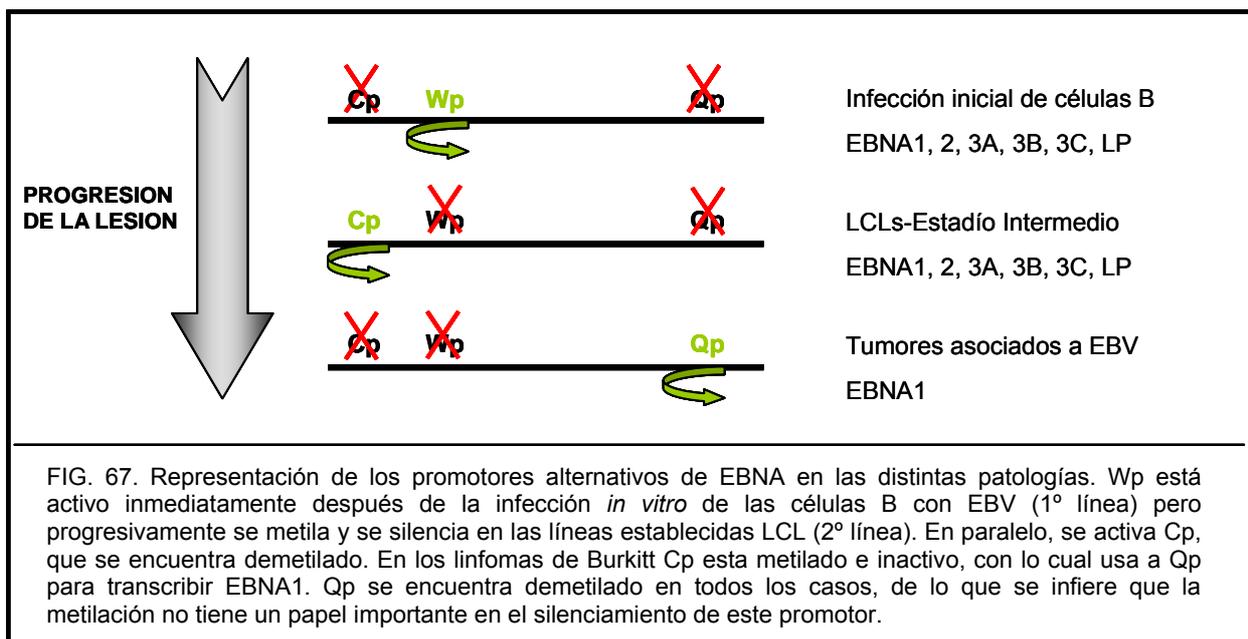


FIG. 66. Los 4 promotores alternativos de EBNA1.



El EBV ejemplifica perfectamente como un invasor extraño a la célula evoluciona y hace uso de la maquinaria celular para persistir en el individuo infectado. La metilación del ADN ha evolucionado como un mecanismo de defensa ante el ADN viral así como también para resguardar al genoma de los efectos nocivos de las grandes cantidades de ADN repetitivo. El EBV parece ser capaz de metilar selectivamente y silenciar regiones de su genoma las cuales si se expresaran serían perjudiciales para la persistencia viral. Otros genes virales, que son

absolutamente cruciales para la propagación del virus, son capaces de expresarse de promotores alternativos que están protegidos de la maquinaria de metilación celular.

### 5.3. Aplicaciones y perspectivas

Esta es la primera vez que se describe el metiloma completo de un organismo relacionado con una enfermedad humana tan importante como es el cáncer. Los virus del papiloma humano tipos 16 y 18 fueron secuenciados en su totalidad, mientras que en el caso del virus de Epstein-Barr se describió el estado de metilación de todos sus inicios de transcripción.

Este trabajo incluyó el estudio de más de 200 muestras humanas infectadas con los distintos virus, abarcando todos los estadios de progresión de la enfermedad. Este intento de secuenciación a gran escala reveló la naturaleza dinámica del epigenoma viral, al menos en lo referido a los niveles de metilación del ADN.

Uno de los principales descubrimientos de este trabajo es el incremento gradual del nivel de metilación en el genoma de estos virus a medida que se progresa desde lesiones benignas, precancerosas hasta llegar a los tumores malignos.

Esto puede tener varias explicaciones, y esperamos que incentive futuras investigaciones multidisciplinarias que completen aún más este cuadro.

La posibilidad más interesante es que la metilación del ADN viral bloquee la presentación antigénica y pueda servir como un dispositivo de encubrimiento que camufle al virus del sistema inmune (Hilleman, 2004, Tao, 2004).

Se ha observado que EBV se sirve de la maquinaria de metilación celular para conseguir la hipermetilación de sus promotores y prolongar así su persistencia en las células infectadas silenciando su propia expresión génica. Mediante la manipulación de los patrones de metilación de las zonas promotoras de dichos genes, se podría inducir su expresión, exponiendo a los antígenos virales a la vigilancia del sistema inmune. Se han llevado a cabo experimentos piloto con tratamientos con 5-aza que no han logrado resultados significativos (Ambinder, 1999). No obstante, en un estudio realizado posteriormente, se consiguió interferir la expresión de EBNA1 en líneas celulares de linfoma de Burkitt infectadas con EBV. Se obtuvo como resultado un descenso en el potencial proliferativo de las células tumorales, así como también una desestabilización del genoma viral en las células infectadas (Hong, 2006).

La oncoproteína viral LMP1 se perfila como posible objetivo para la inmunoterapia (Demachi-Okamura, 2006). En un estudio publicado recientemente, se exponía que la transfección de una variante de LMP1 con una delección en su extremo amino terminal en células presentadoras de antígenos, estimulaba la producción de linfocitos T específicos que reaccionaban contra las LMP1 en las células inicialmente infectadas.

Si nos planteáramos la posibilidad de utilizar agentes demetilantes como tratamiento adicional, no solo podríamos reactivar a los genes supresores de tumores celulares silenciados,

sino que también podríamos reactivar la respuesta inmune del hospedador, mejorando así los beneficios terapéuticos.

Este tipo de estudios son de vital interés ya que pueden ayudar a desarrollar nuevas terapias en enfermedades asociadas a virus. El uso de drogas farmacológicas para manipular los patrones de metilación puede ofrecer la oportunidad de desenmascarar antígenos virales y exponer los tumores cervicales positivos a HPV a la vigilancia inmunológica.

Otra curiosidad que se desprende de los resultados obtenidos en este trabajo, es la relación que existe entre los niveles de metilación y la cantidad de copias virales presentes en la célula. Pudimos comprobar en varias ocasiones que líneas celulares pertenecientes al mismo tipo tumoral, poseían mayor metilación en los virus que albergaban si éstos estaban presentes en mayores cantidades. Una posible explicación a esta cuestión es que el virus se regule a sí mismo en cuanto a la cantidad que debe expresar, metilando las copias que no necesite para su supervivencia.

Los resultados presentados en este trabajo, son un buen punto de partida para la que investigación biomédica intente responder a estas cuestiones.

Otro punto muy interesante para continuar investigando es la relación que existe entre las proteínas virales y las DNMTs celulares. Quedó demostrado que los virus presentados en este trabajo son capaces de utilizarlas para establecer infecciones persistentes, ahora bien, el poder comprender los mecanismos moleculares que subyacen este proceso, permitiría en el futuro manipularlo para beneficio del hospedador.

Estas cuestiones van mucho más allá de la investigación básica, y podrían tener un gran impacto en la salud pública, ya que muchos millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con estos agentes biológicos.

Además de lo mencionado anteriormente, este trabajo puede funcionar como un excelente punto de partida para los proyectos de secuenciación que pretenden completar el metiloma humano, tal como pasó anteriormente cuando la secuenciación de microorganismos estimuló lo que terminó en la descripción del genoma humano. Sin duda, las nuevas tecnologías que permiten la secuenciación masiva acelerarán este proceso (Meissner, 2008, Wheeler, 2008).

Esperamos que los metilomas virales presentados aquí sirvan como punto de partida para alentar a completar los proyectos de epigenoma humano que ya están en marcha.

Conclusiones

---



## 6. Conclusiones

1. El metiloma de los virus ADN asociados a cáncer humano analizados en este estudio sufre un aumento progresivo en la metilación de su ADN a medida que progresa la enfermedad, por la necesidad de mantenerse oculto del sistema inmune y persistir en la célula.
2. Este aumento en la metilación del ADN viral se correlaciona con el grado de lesión tumoral.
3. El metiloma viral en sí mismo permite la clasificación de las muestras de acuerdo a la severidad de la lesión tumoral.
4. El empleo de agentes demetilantes afecta tanto la a metilación del genoma celular como también la viral.
5. El uso de la técnica de MSP se correlaciona con los resultados obtenidos por secuenciación, siendo de mayor utilidad para el diagnóstico de un número mayor de muestras.
6. La maquinaria de metilación celular es la responsable de la metilación del ADN viral. La depleción de las DNMT1 y DNMT3b celulares induce hipometilación viral.
7. Los promotores de EBV asociados a la persistencia del virus en estado latente no ven afectados sus niveles de metilación.
8. La expresión de los genes de EBV, incluso de sus microRNAs, está relacionada con el estado de metilación de sus promotores.
9. La inducción del ciclo lítico en EBV produce hipometilación generalizada de los promotores virales.
10. La metilación del ADN es el mecanismo principal de regulación en el cambio de la actividad de los promotores de latencia W<sub>p</sub> a C<sub>p</sub> tras la infección primaria por EBV en células B.



Bibliografía

---



**Bibliografia**

- Aapola, U., Liiv, I. and Peterson, P. (2002). *Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity*. *Nucleic Acids Res* 30(16): 3602-8.
- Adamson, A. L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R. A., Mauser, A., Swenson, J. and Kenney, S. (2000). *Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases*. *J Virol* 74(3): 1224-33.
- Alazard, N., Gruffat, H., Hiriart, E., Sergeant, A. and Manet, E. (2003). *Differential hyperacetylation of histones H3 and H4 upon promoter-specific recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr virus chromatin*. *J Virol* 77(14): 8166-72.
- Alves, G., Tatro, A. and Fanning, T. (1996). *Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells*. *Gene* 176(1-2): 39-44.
- Ambinder, R. F., Lemas, M. V., Moore, S., Yang, J., Fabian, D. and Krone, C. (1999). *Epstein-Barr virus and lymphoma*. *Cancer Treat Res* 99: 27-45.
- Ambinder, R. F., Robertson, K. D. and Tao, Q. (1999). *DNA methylation and the Epstein-Barr virus*. *Semin Cancer Biol* 9(5): 369-75.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993). *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11995-9.
- Badal, S., Badal, V., Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Chuang, L. S., Li, B. F. and Bernard, H. U. (2004). *The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation*. *Virology* 324(2): 483-92.
- Badal, V., Chuang, L. S., Tan, E. H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., Li, B. F. and Bernard, H. U. (2003). *CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression*. *J Virol* 77(11): 6227-34.
- Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C. and Brown, J. C. (1991). *Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction*. *Biophys J* 60(6): 1445-56.
- Bakos, A., Banati, F., Koroknai, A., Takacs, M., Salamon, D., Minarovits-Kormuta, S., Schwarzmann, F., Wolf, H., Niller, H. H. and Minarovits, J. (2007). *High-resolution analysis of CpG methylation and in vivo protein-DNA interactions at the alternative*

---

*Epstein-Barr virus latency promoters Qp and Cp in the nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1.* Virus Genes 35(2): 195-202.

Ballestar, E. and Esteller, M. (2005). *The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications.* Prog Mol Subcell Biol 38: 169-81.

Ballestar, E. and Wolffe, A. P. (2001). *Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression.* Eur J Biochem 268(1): 1-6.

Ballestar, E., Paz, M. F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M. F., Espada, J., Cigudosa, J. C., Huang, T. H. and Esteller, M. (2003). *Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer.* Embo J 22(23): 6335-45.

Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K. and Herman, J. G. (2001). *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.* Hum Mol Genet 10(7): 687-92.

Beck, S. and Rakyán, V. K. (2008). *The methylome: approaches for global DNA methylation profiling.* Trends Genet 24(5): 231-7.

Beck, S., Olek, A. and Walter, J. (1999). *From genomics to epigenomics: a loftier view of life.* Nat Biotechnol 17(12): 1144.

Bernard, H. U. (2002). *Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches.* Antivir Ther 7(4): 219-37.

Bestor, T. H. (2000). *The DNA methyltransferases of mammals.* Hum Mol Genet 9(16): 2395-402.

Bestor, T. H. and Tycko, B. (1996). *Creation of genomic methylation patterns.* Nat Genet 12(4): 363-7.

Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. and Szyf, M. (1999). *A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA.* Nature 397(6720): 579-83.

Bird, A. (1999). *DNA methylation de novo.* Science 286(5448): 2287-8.

Bird, A. (2002). *DNA methylation patterns and epigenetic memory.* Genes Dev 16(1): 6-21.

Bodescot, M., Brison, O. and Perricaudet, M. (1986). *An Epstein-Barr virus transcription unit is at least 84 kilobases long.* Nucleic Acids Res 14(6): 2611-20.

- Bogedain, C., Alliger, P., Schwarzmann, F., Marschall, M., Wolf, H. and Jilg, W. (1994). *Different activation of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes in Burkitt lymphoma cells and lymphoblastoid cell lines*. J Virol 68(2): 1200-3.
- Bradbury, J. (2003). *Human epigenome project--up and running*. PLoS Biol 1(3): E82.
- Braun, D. K., Dominguez, G. and Pellett, P. E. (1997). *Human herpesvirus 6*. Clin Microbiol Rev 10(3): 521-67.
- Brena, R. M., Huang, T. H. and Plass, C. (2006). *Toward a human epigenome*. Nat Genet 38(12): 1359-60.
- Brink, A. A., Meijer, C. J., Nicholls, J. M., Middeldorp, J. M. and van den Brule, A. J. (2001). *Activity of the EBNA1 promoter associated with lytic replication (Fp) in Epstein-Barr virus associated disorders*. Mol Pathol 54(2): 98-102.
- Brooks, L., Yao, Q. Y., Rickinson, A. B. and Young, L. S. (1992). *Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts*. J Virol 66(5): 2689-97.
- Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T. and Fuks, F. (2007). *Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases*. Oncogene 26(11): 1650-5.
- Butel, J. S. (2000). *Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease*. Carcinogenesis 21(3): 405-26.
- Calin, G. A. and Croce, C. M. (2006). *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer 6(11): 857-66.
- Castellsague, X., Bosch, F. X. and Munoz, N. (2002). *Environmental co-factors in HPV carcinogenesis*. Virus Res 89(2): 191-9.
- Cavalcanti, S. M., Zardo, L. G., Passos, M. R. and Oliveira, L. H. (2000). *Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil*. J Infect 40(1): 80-7.
- Chang, P. J., Chang, Y. S. and Liu, S. T. (1998). *Role of Rta in the translation of bicistronic BZLF1 of Epstein-Barr virus*. J Virol 72(6): 5128-36.
- Chen, C. Z. (2005). *MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. N Engl J Med 353(17): 1768-71.

- Chen, T., Ueda, Y., Xie, S. and Li, E. (2002). *A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation*. J Biol Chem 277(41): 38746-54.
- Chen, Z., Terai, M., Fu, L., Herrero, R., DeSalle, R. and Burk, R. D. (2005). *Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses*. J Virol 79(11): 7014-23.
- Cox, M. A., Leahy, J. and Hardwick, J. M. (1990). *An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators*. J Virol 64(1): 313-21.
- Daibata, M., Humphreys, R. E., Takada, K. and Sairenji, T. (1990). *Activation of latent EBV via anti-IgG-triggered, second messenger pathways in the Burkitt's lymphoma cell line Akata*. J Immunol 144(12): 4788-93.
- Darr, C. D., Mauser, A. and Kenney, S. (2001). *Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation*. J Virol 75(13): 6135-42.
- de Bustros, A., Nelkin, B. D., Silverman, A., Ehrlich, G., Poiesz, B. and Baylin, S. B. (1988). *The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A 85(15): 5693-7.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N. and Bosch, F. X. (2007). *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis*. Lancet Infect Dis 7(7): 453-9.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. and zur Hausen, H. (2004). *Classification of papillomaviruses*. Virology 324(1): 17-27.
- Demachi-Okamura, A., Ito, Y., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Morishima, Y., Takahashi, T. and Kuzushima, K. (2006). *Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1-specific cytotoxic T lymphocytes targeting EBV-carrying natural killer cell malignancies*. Eur J Immunol 36(3): 593-602.
- Doerfler, W. (1983). *DNA methylation and gene activity*. Annu Rev Biochem 52: 93-124.
- Dong, S. M., Kim, H. S., Rha, S. H. and Sidransky, D. (2001). *Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix*. Clin Cancer Res 7(7): 1982-6.

- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T. V., Davies, R., Down, T. A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D. K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K. and Beck, S. (2006). *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet 38(12): 1378-85.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. and Gehrke, C. (1982). *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res 10(8): 2709-21.
- Ehrlich, M., Sanchez, C., Shao, C., Nishiyama, R., Kehrl, J., Kuick, R., Kubota, T. and Hanash, S. M. (2008). *ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation*. Autoimmunity 41(4): 253-71.
- Espada, J., Ballestar, E., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J. C., Robertson, K. D., Fuks, F. and Esteller, M. (2004). *Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern*. J Biol Chem 279(35): 37175-84.
- Esteller, M. (2002). *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. Oncogene 21(35): 5427-40.
- Esteller, M. (2007). *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet 8(4): 286-98.
- Esteller, M. (2008). *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med 358(11): 1148-59.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (2001). *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res 61(8): 3225-9.
- Evans, A. S. (1972). *Clinical syndromes associated with EB virus infection*. Adv Intern Med 18: 77-93.
- Fehrman, F. and Laimins, L. A. (2003). *Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation*. Oncogene 22(33): 5201-7.
- Fixman, E. D., Hayward, G. S. and Hayward, S. D. (1995). *Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays*. J Virol 69(5): 2998-3006.
- Flemington, E. K., Goldfeld, A. E. and Speck, S. H. (1991). *Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis*. J Virol 65(12): 7073-7.

- Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A. M., Esteller, M. and Feil, R. (2002). *Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes*. *Embo J* 21(23): 6560-70.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C. and Esteller, M. (2005). *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10604-9.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and Esteller, M. (2005). *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. *Nat Genet* 37(4): 391-400.
- Frattini, M. G., Hurst, S. D., Lim, H. B., Swaminathan, S. and Laimins, L. A. (1997). *Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein*. *Embo J* 16(2): 318-31.
- Fuks, F. (2005). *DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes*. *Curr Opin Genet Dev* 15(5): 490-5.
- Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M. and Kouzarides, T. (2001). *Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription*. *Embo J* 20(10): 2536-44.
- Gatza, M. L., Chandhasin, C., Ducu, R. I. and Marriott, S. J. (2005). *Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation*. *Environ Mol Mutagen* 45(2-3): 304-25.
- Giannoudis, A. and Herrington, C. S. (2001). *Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix*. *J Pathol* 193(3): 295-302.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. and Bestor, T. H. (2006). *Methylation of tarnasp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science* 311(5759): 395-8.
- Goto, T. and Monk, M. (1998). *Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 362-78.

- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G. and Jeltsch, A. (2005). *Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L*. J Biol Chem 280(14): 13341-8.
- Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T. and Thun, M. (2001). *Cancer statistics, 2001*. CA Cancer J Clin 51(1): 15-36.
- Gutierrez, M. I., Bhatia, K. and Magrath, I. (1993). *Replicative viral DNA in Epstein-Barr virus associated Burkitt's lymphoma biopsies*. Leuk Res 17(3): 285-9.
- He, L. and Hannon, G. J. (2004). *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet 5(7): 522-31.
- Hebner, C. M. and Laimins, L. A. (2006). *Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity*. Rev Med Virol 16(2): 83-97.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996). *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9821-6.
- Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M. and et al. (1994). *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 9700-4.
- Hermann, A., Schmitt, S. and Jeltsch, A. (2003). *The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity*. J Biol Chem 278(34): 31717-21.
- Hilleman, M. R. (2004). *Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections*. Proc Natl Acad Sci U S A 101 Suppl 2: 14560-6.
- Hong, M., Murai, Y., Kutsuna, T., Takahashi, H., Nomoto, K., Cheng, C. M., Ishizawa, S., Zhao, Q. L., Ogawa, R., Harmon, B. V., Tsuneyama, K. and Takano, Y. (2006). *Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by ARN interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells*. J Cancer Res Clin Oncol 132(1): 1-8.
- Hong, S., Cho, Y. W., Yu, L. R., Yu, H., Veenstra, T. D. and Ge, K. (2007). *Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(47): 18439-44.
- Hopman, A. H., Smedts, F., Dignef, W., Ummelen, M., Sonke, G., Mravunac, M., Vooijs, G. P., Speel, E. J. and Ramaekers, F. C. (2004). *Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities*. J Pathol 202(1): 23-33.

- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet 33 Suppl: 245-54.
- Januchowski, R., Prokop, J. and Jagodzinski, P. P. (2004). *Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. J Appl Genet 45(2): 237-48.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J. and Thun, M. J. (2005). *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin 55(1): 10-30.
- Jin, B., Tao, Q., Peng, J., Soo, H. M., Wu, W., Ying, J., Fields, C. R., Delmas, A. L., Liu, X., Qiu, J. and Robertson, K. D. (2008). *DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function*. Hum Mol Genet 17(5): 690-709.
- Jin, X. W. and Speck, S. H. (1992). *Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter*. J Virol 66(5): 2846-52.
- John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. S. (2004). *Human MicroRNA targets*. PLoS Biol 2(11): e363.
- Jones, P. A. (1999). *The DNA methylation paradox*. Trends Genet 15(1): 34-7.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2002). *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet 3(6): 415-28.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2007). *The epigenomics of cancer*. Cell 128(4): 683-92.
- Jones, P. A. and Martienssen, R. (2005). *A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR Human Epigenome Workshop*. Cancer Res 65(24): 11241-6.
- Jones, P. A. and Taylor, S. M. (1980). *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell 20(1): 85-93.
- Jost, J. P., Fremont, M., Siegmann, M. and Hofsteenge, J. (1997). *The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine- DNA glycosylase targets DNA demethylation*. Nucleic Acids Res 25(22): 4545-50.
- Jung, W. W., Chun, T., Sul, D., Hwang, K. W., Kang, H. S., Lee, D. J. and Han, I. K. (2004). *Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer*. J Microbiol 42(4): 255-66.

- Juttermann, R., Li, E. and Jaenisch, R. (1994). *Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation*. Proc Natl Acad Sci U S A 91(25): 11797-801.
- Kalantari, M., Calleja-Macias, I. E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H. A., Wiley, D. J. and Bernard, H. U. (2004). *Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia*. J Virol 78(23): 12762-72.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R. P., Benes, V., Gannon, F. and Reid, G. (2008). *Transient cyclical methylation of promoter DNA*. Nature 452(7183): 112-5.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M. and Kieff, E. (1993). *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(19): 9150-4.
- Kenney, S. C., Holley-Guthrie, E., Quinlivan, E. B., Gutsch, D., Zhang, Q., Bender, T., Giot, J. F. and Sergeant, A. (1992). *The cellular oncogene c-myc can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells*. Mol Cell Biol 12(1): 136-46.
- Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Lin, J. C., Mar, E. C. and Pagano, J. (1989). *The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters*. J Virol 63(4): 1729-36.
- Kieff E. and Rickinson A.B. (2001). Epstein-Barr virus. In: D.M. Knipe and P.M. Howley *et al.*, Editors, *Fields Virology* (fourth ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2575–2627
- Kieff E. (1996). *Virology, Fields BN, Knipe DM and Howley PM eds 3rd edn*. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, PA, pp 2343–2396.
- Kim, C. J., Jeong, J. K., Park, M., Park, T. S., Park, T. C., Namkoong, S. E. and Park, J. S. (2003). *HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions*. Gynecol Oncol 89(2): 210-7.
- Klein, E., Kis, L. L. and Klein, G. (2007). *Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions*. Oncogene 26(9): 1297-305.
- Kornberg, R. D. (1974). *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science 184(139): 868-71.

- Kouzarides, T. (2002). *Histone methylation in transcriptional control*. *Curr Opin Genet Dev* 12(2): 198-209.
- Kouzarides, T., Packham, G., Cook, A. and Farrell, P. J. (1991). *The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper*. *Oncogene* 6(2): 195-204.
- Kriaucionis, S. and Bird, A. (2003). *DNA methylation and Rett syndrome*. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R221-7.
- Kubicek, S. and Jenuwein, T. (2004). *A crack in histone lysine methylation*. *Cell* 119(7): 903-6.
- Labrecque, L. G., Xue, S. A., Kazembe, P., Phillips, J., Lampert, I., Wedderburn, N. and Griffin, B. E. (1999). *Expression of Epstein-Barr virus lytically related genes in African Burkitt's lymphoma: correlation with patient response to therapy*. *Int J Cancer* 81(1): 6-11.
- Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Laird, P. W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., Weinberg, R. A. and Jaenisch, R. (1995). *Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation*. *Cell* 81(2): 197-205.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G. and Masucci, M. G. (1995). *Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1*. *Nature* 375(6533): 685-8.
- Li, H. and Minarovits, J. (2003). *Host cell-dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes: regulation by DNA methylation*. *Adv Cancer Res* 89: 133-56.
- Li, H. P., Leu, Y. W. and Chang, Y. S. (2005). *Epigenetic changes in virus-associated human cancers*. *Cell Res* 15(4): 262-71.
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H. and Ecker, J. R. (2008). *Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis*. *Cell* 133(3): 523-36.
- Liu, L., Wylie, R. C., Andrews, L. G. and Tollefsbol, T. O. (2003). *Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection*. *Mech Ageing Dev* 124(10-12): 989-98.
- Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (2006). *Prophylactic human papillomavirus vaccines*. *J Clin Invest* 116(5): 1167-73.

- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. and Golub, T. R. (2005). *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature 435(7043): 834-8.
- Lujambio, A. and Esteller, M. (2007). *CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer*. Cell Cycle 6(12): 1455-9.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M. F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P. P., Caldas, C., Miska, E. and Esteller, M. (2007). *Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells*. Cancer Res 67(4): 1424-9.
- MacMahon, E. M., Glass, J. D., Hayward, S. D., Mann, R. B., Becker, P. S., Charache, P., McArthur, J. C. and Ambinder, R. F. (1991). *Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma*. Lancet 338(8773): 969-73.
- Maraschio, P., Zuffardi, O., Dalla Fior, T. and Tiepolo, L. (1988). *Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome*. J Med Genet 25(3): 173-80.
- Mashberg, A. (1993). *Head and neck cancer*. N Engl J Med 328(24): 1783; author reply 1784.
- Matarazzo, M. R., Boyle, S., D'Esposito, M. and Bickmore, W. A. (2007). *Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(42): 16546-51.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R. and Lander, E. S. (2008). *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature 454(7205): 766-70.
- Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F. and Salbert, G. (2008). *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter*. Nature 452(7183): 45-50.
- Mikovits, J. A., Young, H. A., Vertino, P., Issa, J. P., Pitha, P. M., Turcoski-Corrales, S., Taub, D. D., Petrow, C. L., Baylin, S. B. and Ruscetti, F. W. (1998). *Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production*. Mol Cell Biol 18(9): 5166-77.

- Minarovits, J. (2006). *Epigenotypes of latent herpesvirus genomes*. *Curr Top Microbiol Immunol* 310: 61-80.
- Miska, E. A. (2005). *How microRNAs control cell division, differentiation and death*. *Curr Opin Genet Dev* 15(5): 563-8.
- Mohan, J., Dement-Brown, J., Maier, S., Ise, T., Kempkes, B. and Tolnay, M. (2006). *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces FcRH5 expression through CBF1*. *Blood* 107(11): 4433-9.
- Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W. (2005). *Epigenetic reprogramming in mammals*. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R47-58.
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S. and Villa, L. L. (2006). *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. *Vaccine* 24 Suppl 3: S42-51.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, C. A., Luis Villanueva, S. and Maruo, T. (2004). *The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis*. *Kobe J Med Sci* 50(1-2): 9-19.
- Munger, K. and Howley, P. M. (2002). *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. *Virus Res* 89(2): 213-28.
- Murrell, A., Rakyán, V. K. and Beck, S. (2005). *From genome to epigenome*. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R3-R10.
- Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A. and Sample, J. (1996). *Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein*. *J Virol* 70(1): 623-7.
- O'Connor, M. J., Stunkel, W., Zimmermann, H., Koh, C. H. and Bernard, H. U. (1998). *A novel YY1-independent silencer represses the activity of the human papillomavirus type 16 enhancer*. *J Virol* 72(12): 10083-92.
- Okano, M. and Li, E. (2002). *Genetic analyses of DNA methyltransferase genes in mouse model system*. *J Nutr* 132(8 Suppl): 2462S-2465S.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell* 99(3): 247-57.

- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998). *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res* 26(11): 2536-40.
- Ooi, S. K. and Bestor, T. H. (2008). *The colorful history of active DNA demethylation*. *Cell* 133(7): 1145-8.
- Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G. and Esteller, M. (2003). *A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines*. *Cancer Res* 63(5): 1114-21.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. (2004). *Identification of virus-encoded microRNAs*. *Science* 304(5671): 734-6.
- Pope, J. H., Achong, B. G. and Epstein, M. A. (1968). *Cultivation and fine structure of virus-bearing lymphoblasts from a second New Guinea Burkitt lymphoma: establishment of sublines with unusual cultural properties*. *Int J Cancer* 3(2): 171-82.
- Quinlivan, E. B., Holley-Guthrie, E. A., Norris, M., Gutsch, D., Bachenheimer, S. L. and Kenney, S. C. (1993). *Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1*. *Nucleic Acids Res* 21(14): 1999-2007.
- Ragoczy, T., Heston, L. and Miller, G. (1998). *The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes*. *J Virol* 72(10): 7978-84.
- Rajewsky, N. and Socci, N. D. (2004). *Computational identification of microRNA targets*. *Dev Biol* 267(2): 529-35.
- Reik, W., Dean, W. and Walter, J. (2001). *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. *Science* 293(5532): 1089-93.
- Remus, R., Kammer, C., Heller, H., Schmitz, B., Schell, G. and Doerfler, W. (1999). *Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences*. *J Virol* 73(2): 1010-22.
- Rickinson A and Kieff E. (1996). *Virology, Fields BN, Knipe DM and Howley PM eds 3rd Edn*. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, PA, pp 2397-2446.
- Romanczuk, H., Thierry, F. and Howley, P. M. (1990). *Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters*. *J Virol* 64(6): 2849-59.

- Rooney, C. M., Rowe, D. T., Ragot, T. and Farrell, P. J. (1989). *The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle*. J Virol 63(7): 3109-16.
- Ropero, S., Fraga, M. F., Ballestar, E., Hamelin, R., Yamamoto, H., Boix-Chornet, M., Caballero, R., Alaminos, M., Setien, F., Paz, M. F., Herranz, M., Palacios, J., Arango, D., Orntoft, T. F., Aaltonen, L. A., Schwartz, S., Jr. and Esteller, M. (2006). *A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition*. Nat Genet 38(5): 566-9.
- Rosas, S. L., Koch, W., da Costa Carvalho, M. G., Wu, L., Califano, J., Westra, W., Jen, J. and Sidransky, D. (2001). *Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients*. Cancer Res 61(3): 939-42.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A. and Jones, P. A. (2006). *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell 9(6): 435-43.
- Salamon, D., Takacs, M., Ujvari, D., Uhlig, J., Wolf, H., Minarovits, J. and Niller, H. H. (2001). *Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency-associated promoters Qp, Cp, and LMP1p of Epstein-Barr virus*. J Virol 75(6): 2584-96.
- Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G. H., Koch, W. M., Jen, J., Herman, J. G. and Sidransky, D. (2000). *Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients*. Cancer Res 60(4): 892-5.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L. and Speck, S. H. (1995). *Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A 92(23): 10565-9.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L. and Speck, S. H. (1997). *Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs*. Mol Cell Biol 17(1): 364-77.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985). *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature 314(6006): 111-4.
- Sell, S. (2006). *Cancer stem cells and differentiation therapy*. Tumour Biol 27(2): 59-70.

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004). *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell 119(7): 941-53.
- Sinclair, A. J., Brimmell, M., Shanahan, F. and Farrell, P. J. (1991). *Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle*. J Virol 65(5): 2237-44.
- Slack, A., Cervoni, N., Pinard, M. and Szyf, M. (1999). *DNA methyltransferase is a downstream effector of cellular transformation triggered by simian virus 40 large T antigen*. J Biol Chem 274(15): 10105-12.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). *The language of covalent histone modifications*. Nature 403(6765): 41-5.
- Tang, P., Park, D. J., Marshall Graves, J. A. and Harley, V. R. (2004). *ATRX and sex differentiation*. Trends Endocrinol Metab 15(7): 339-44.
- Tao, Q. and Robertson, K. D. (2003). *Stealth technology: how Epstein-Barr virus utilizes DNA methylation to cloak itself from immune detection*. Clin Immunol 109(1): 53-63.
- Tao, Q., Huang, H., Geiman, T. M., Lim, C. Y., Fu, L., Qiu, G. H. and Robertson, K. D. (2002). *Defective de novo methylation of viral and cellular DNA sequences in ICF syndrome cells*. Hum Mol Genet 11(18): 2091-102.
- Tao, Q., Robertson, K. D., Manns, A., Hildesheim, A. and Ambinder, R. F. (1998). *The Epstein-Barr virus major latent promoter Q<sub>p</sub> is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive*. J Virol 72(9): 7075-83.
- Tao, Q., Young, L. S., Woodman, C. B. and Murray, P. G. (2006). *Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics*. Front Biosci 11: 2672-713.
- Taylor, S. M. and Jones, P. A. (1979). *Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine*. Cell 17(4): 771-9.
- Tierney, R. J., Kirby, H. E., Nagra, J. K., Desmond, J., Bell, A. I. and Rickinson, A. B. (2000). *Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter W<sub>p</sub> coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation*. J Virol 74(22): 10468-79.
- Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y. and Chang, Y. S. (2002). *The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin*

- gene expression via activation of DNA methyltransferases. Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 10084-9.
- Turan, T., Kalantari, M., Calleja-Macias, I. E., Cubie, H. A., Cuschieri, K., Villa, L. L., Skomedal, H., Barrera-Saldana, H. A. and Bernard, H. U. (2006). *Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? Virology* 349(1): 175-83.
- Turan, T., Kalantari, M., Cuschieri, K., Cubie, H. A., Skomedal, H. and Bernard, H. U. (2007). *High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. Virology* 361(1): 185-93.
- Van Tine, B. A., Kappes, J. C., Banerjee, N. S., Knops, J., Lai, L., Steenbergen, R. D., Meijer, C. L., Snijders, P. J., Chatis, P., Broker, T. R., Moen, P. T., Jr. and Chow, L. T. (2004). *Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. J Virol* 78(20): 11172-86.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kissel'jov, F., Durst, M., Schneider, A. and von Knebel Doeberitz, M. (2008). *Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. Cancer Res* 68(1): 307-13.
- Virmani, A. K., Muller, C., Rathi, A., Zochbauer-Mueller, S., Mathis, M. and Gazdar, A. F. (2001). *Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. Clin Cancer Res* 7(3): 584-9.
- Wang, R. Y., Gehrke, C. W. and Ehrlich, M. (1980). *Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. Nucleic Acids Res* 8(20): 4777-90.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A. and Allis, C. D. (1999). *Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. Cell* 97(1): 99-109.
- Weiss, A. and Cedar, H. (1997). *The role of DNA demethylation during development. Genes Cells* 2(8): 481-6.
- Weiss, A., Keshet, I., Razin, A. and Cedar, H. (1996). *DNA demethylation in vitro: involvement of ARN. Cell* 86(5): 709-18.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S. and von Knebel Doeberitz, M. (2004). *Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res* 64(11): 3878-84.

- Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y. J., Makhijani, V., Roth, G. T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C. L., Irzyk, G. P., Lupski, J. R., Chinault, C., Song, X. Z., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D. M., Margulies, M., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A. and Rothberg, J. M. (2008). *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. Nature 452(7189): 872-6.
- Williams, H. and Crawford, D. H. (2006). *Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice*. Blood 107(3): 862-9.
- Wise-Draper, T. M. and Wells, S. I. (2008). *Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets*. Front Biosci 13: 1003-17.
- Woisetschlaeger, M., Jin, X. W., Yandava, C. N., Furmanski, L. A., Strominger, J. L. and Speck, S. H. (1991). *Role for the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection*. Proc Natl Acad Sci U S A 88(9): 3942-6.
- Wolffe, A. P. and Matzke, M. A. (1999). *Epigenetics: regulation through repression*. Science 286(5439): 481-6.
- Wolffe, A. P., Jones, P. L. and Wade, P. A. (1999). *DNA demethylation*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(11): 5894-6.
- Woodman, C. B., Collins, S. I. and Young, L. S. (2007). *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer 7(1): 11-22.
- Xu, D., Brumm, K. and Zhang, L. (2006). *The latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus (EBV) primes EBV latency cells for type I interferon production*. J Biol Chem 281(14): 9163-9.
- Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourc'his, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J. and Viegas-Pequignot, E. (1999). *Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene*. Nature 402(6758): 187-91.
- Yates, J. L. and Guan, N. (1991). *Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells*. J Virol 65(1): 483-8.
- Young, L. S. and Murray, P. G. (2003). *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene 22(33): 5108-21.
- Young, L. S. and Rickinson, A. B. (2004). *Epstein-Barr virus: 40 years on*. Nat Rev Cancer 4(10): 757-68.

- Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K. C., Ritz, J., Shapiro, R. S., Rickinson, A., Kieff, E. and et al. (1989). *Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease*. N Engl J Med 321(16): 1080-5.
- Zaina, S., Lindholm, M. W. and Lund, G. (2005). *Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia?* J Nutr 135(1): 5-8.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S. (1996). *Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(17): 9194-9.
- Zheng, Z. M. and Baker, C. C. (2006). *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci 11: 2286-302.
- zur Hausen, H. (1996). *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers*. Biochim Biophys Acta 1288(2): F55-78.
- zur Hausen, H. (2002). *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer 2(5): 342-50.

ANEXOS

---



## ANEXO I

### Análisis computacional

Paralelamente a los experimentos expuestos en esta tesis, el departamento de bioinformática del CNIO desarrolló un software Java en la forma de servidor Web denominado “METHYLYZER”.

Este programa es capaz de analizar los datos obtenidos de la metilación de secuencias modificadas con bisulfito, y publicarlas en Internet.

Analiza cada CpG de forma que representa cualquier pérdida o ganancia de las mismas, y asigna un valor a las que se encuentran metiladas. También reconoce las mutaciones que pudieran presentar las muestras, incluyendo inserciones, deleciones o reemplazos.

El “*methylyzer*” genera gráficos de los perfiles de metilación que permiten la comparación del estado de metilación en distintas muestras al mismo tiempo.

Todos los datos obtenidos en este trabajo fueron incluidos y analizados con el Methylyzer. Los metilomas de los virus presentados aquí, y las actualizaciones subsiguientes pueden ser consultadas en:

<http://ubio.bioinfo.cnio.es/Methylyzer/main/index.html>



## ANEXO II

**TABLA PRIMERS USADOS PARA HPV16. BS: secuenciación de bisulfito; MSP: PCR específica de metilación; RT: Reverse Transcription-PCR; ChIP: chromatin immunoprecipitation**

PRIMERS	FORWARD 5'-3'	REVERSE 3'-5'
<b>BS</b>		
BS-HPV16-1	TAATAATTTTATGTATAAAAATTAAGGG	ATCCAAATATCTTTACTTTTCTT
BS-HPV16-2	TGTTAAAAGTTATTGTGTTTTGAAG	ATCCAACTAAACCATCTATTTCAT
BS-HPV16-3	ATGAAATAGATGGTTTAGTTGG	TCATCTAATATAACATCCCCTATT
BS-HPV16-4	ATAGGGGATGTTATATTAGATG	AATATATCTTTTCTACTAACACCC
BS-HPV16-5	TTAGTAATGTAAGGTAGTAATGTTAG	TTCCCCATAAACATACTAAAC
BS-HPV16-6	GTGTTTTTAATGTGTATGATG	TACCTATATTAACACACCATATAAT
BS-HPV16-7a	TGTTGGTATAGATTTTAGTGG	CAACCAATATTAACACCACTTAA
BS-HPV16-7b	ATAAGGTTAGAGAAAATGGGATT	AACCCCTCTACCACAATTAATAAT
BS-HPV16-8	TAGTGGAAAGTGTAGTTTGATGG	CACATCTCCACTAAATCTCTATAACA
BS-HPV16-9a	AAGTTGTTGTATAGAGATTTAGTGG	TAAACAAACACACAAAAACACA
BS-HPV16-9b	TTTTGTGTGTTTTTGTGTGTTT	AAACACCTAAACRCAAAAATA
BS-HPV16-10a	TAGTAGTTTTTGYGTTTAGGTG	TTCAACAATAATTTTACCTTCAAC
BS-HPV16-10b	GGTTGAAGGTAATAATTTAGTTG	ACACCAACATCAATAAAAATAATTT
BS-HPV16-11	AGTAATTAGTAGTATATTTATATTAGGG	ATCATAATAATAATATACCTTAACACC
BS-HPV16-12	CGATTATGATATTTATGTAGATGAT	ATCCAACTACAAAATAATCTAAATTT
BS-HPV16-13	TAAAGTATTAGGATTATAATATAGGG	TCTATTATCCACACCTACATTTA
BS-HPV16-14a	GGTTTTGGTGTATGGATTTTA	TTAATTACCCCAACAAATACCA
BS-HPV16-14b	AAAGGTTTTGGTTTTTGTAA	ATTCCAATCCTCCAAAATAATA
BS-HPV16-15a	AAAGGAAAAGTTTTTGTAGATTT	TAAATAACCACAACCAATTAATAAA
BS-HPV16-15b	AGGATTGAAGGTTAAATTAATAAT	AACACATTTTATACCAAAAAACA
BS-HPV16-16	GTTGTATGTTTTTGGTATAAAAAT	ATTACTTATAAATATATAACCCAAAATC
<b>MSP</b>		
MSP-HPV16-4M	TGCGATATAAACGTTTTGTAAAAC	AATATACCCAATACGTCGCG
MSP-HPV16-4U	TAATGTGATATAAATGTTTTGTAATAAT	AAATATACCCAATACATCCACCT
<b>RT*</b>		
RT-HPV16-E6	ACTGCGACGTGAGGTGTATTA	TGGAATCTTTGCTTTTTGTCC
RT-HPV16-E7	CCGGACAGAGCCCATTAACAT	ACGTGTGTGCTTTGTACGCAC
<b>ChIP</b>		
ChIP-HPV16-E2	TTGCATATTTGGCATAAGGTTT	ACTAACCGGTTTCGGTTCAA

\*de Boer, MA., Jordanova, ES., Kenter, GG., Peters, AA., Corver, WE., Trimbos, JB. & Fleuren, GJ. High human Papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.* 13, 132-8 (2007).

\*Lamarq, L., Deeds, J., Ginzinger, D., Perry, J., Padmanabha, S. & Smith-McCune, K. Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn.* 4, 97-102 (2002)

**TABLA PRIMERS USADOS PARA HPV18. BS: secuenciación de bisulfito; MSP: PCR específica de metilación; RT: Reverse Transcription-PCR; ChIP: chromatin immunoprecipitation**

PRIMERS	FORWARD 5'-3'	REVERSE 3'-5'
<b>BS</b>		
BS-HPV18-0	TAATTGTAGTATATAAAAAAGGGAGT	TACACAAATCAAATAACTTATAAAAATC
BS-HPV18-1	GGTGTATATAAAGATGTGAGAAATAT	ATAAAAATACTACTCTCTATACACCAC
BS-HPV18-2	TTTGTGTATGGAGATATATTGGA	ACTCTAAATACAATACAATATCTTACAA
BS-HPV18-3	AGTATGTATGGATTTAAGGTAATTTG	ATTACTTACTACTAAAAATACACACCAC
BS-HPV18-4	GTGGTGTGATTTTAGTAGTAAGTAAT	CCTATACTATCTCTAACTCTACCTATTC
BS-HPV18-5	GAATAGGTAGAGTTAGAGATAGTATAGG	CACTTCAAACAACCCATAAC
BS-HPV18-6	GTTGGAGGTGGATATAGAGTTAA	ACTATTATTACCCTCTATACCCC
BS-HPV18-7	GGGGGTATAGAGGGTAATAATA	TAACAACATTAATCTACTCTTACCAC
BS-HPV18-8	GGGTTATAGTTATATTTGGAGTAAAT	TATCCACTCAAATATATCTCCCA
BS-HPV18-9	ATGGGAGATATATTTGAGTGG	ACATCATCTAACATAACCACCT
BS-HPV18-10.1	TTTATTAGTTATTTTTGGTTGGAA	AAACCATATCCTTTCAAATAAAC
BS-HPV18-10.2	TTTTTTGAAAGGATATGGTTTA	AAAACCTTATAAAAACCATTTAC
BS-HPV18-11	AAAGTTATTGAATTGTAATGGTTT	ACAATCCCCTATAACTTACACAA
BS-HPV18-12	TGATTTATGTAGTATGGGATAGTG	AACAATCCACAATACTACTCTCTC
BS-HPV18-13	GAGAAGTAGTATTGGATTTGTT	TCATTACCTACACCTATCCAAT
BS-HPV18-14	TTTTTGTGTATGTATGTATGTGTGT	ACATAAACATAAAAAACAAAATACA
BS-HPV18-15	TTTTTTATGTTTTTGTATTTTTGT	CCCCTATACCACTACCAATAC
BS-HPV18-16	TTTGTGTTGTTTTTAAGGTGG	TAAAACCCACAATTTCAATAACC
BS-HPV18-17	AGTGTTATTGAATTTGTGGT	CTACCACCTCCCAATTTATAA
BS-HPV18-18a	AAGTTTTATAAATGGGGAGGT	CCATAAAATCTAAATCAAACAATC
BS-HPV18-18b	AGTGATGTTTTGATTTAGATTTT	AAAAATAAACCCCTAACACCTATTT
BS-HPV18-19a	TAGGTGTTAGGGTTTTATTTTATTATG	CACATCCCAAAAAAATAATTA
BS-HPV18-19b	TTTTAATTTTTTTTTGGGATGTG	ACCACCTACAAAAACCCATAAA
BS-HPV18-20	TTTGTAGGTGGTGGTAATAAGTAGGA	CCCAATAACAAAAACACAACCC
BS-HPV18-21	TTGGTTGTGTTTTTGTATTG	CACAATATCACCCATAATACCTAC
BS-HPV18-22	TAGAGGATTGGAATTTTGGTGT	ACACAAAACATACAAACACAACAATAA
BS-HPV18-23	GTATGATTGATTGTATGGTATGTATG	ACAAAACATAAACCAAAAAACAAC

BS-HPV18-24	TTTTGGTTTATGTTTGTGGTT	TATAATATATACTACCCAACCTATTTTC
<b>MSP</b>		
MSP-HPV18-3M MSP-HPV18-3U	AGTATCGTGTTCGTGGGTATC TTTAGTATTGTGTTTGTGGGTATT	ACAATACTACTTCTCCGGAAT ACAATACTACTTCTCCACAAATCCA
<b>RT</b>		
RT-HPV18-FULL RT-HPV18-E6* RT-HPV18-E7	CAGAGGTATTTGAATTTGCATT AACTTACAGAGGTGCCTGCG GACTCAGAGGAAGAAAACGAT	AATCTATACATTTATGGCATGC TAGTGCCCAGCTATGTTGTG GTGACGTTGTGGTTCGGCT

\*de Boer, MA., Jordanova, ES., Kenter, GG., Peters, AA., Corver, WE., Trimbos, JB. & Fleuren, GJ. High human Papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.* **13**, 132-8 (2007).

\*Lamarcq, L., Deeds, J., Ginzinger, D., Perry, J., Padmanabha, S. & Smith-McCune, K. Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn.* **4**, 97-102 (2002)

**TABLA PRIMERS USADOS PARA EBV. BS: secuenciación de bisulfito; MSP: PCR específica de metilación; RT: Reverse Transcription-PCR; ChIP: chromatin inmunoprecipitation**

PRIMERS	FORWARD 5'-3'	REVERSE 3'-5'
<b>BS</b>		
EBV-A73	GGATATTTGTAGGATTAGGTTAGTTT	TCCCATCCCAACAATATATAT
EBV-BALF1	AGGGTTGGTAAAGGTAGGTTTT	CTCCTCTCCTAAACCCAATTTA
EBV-BALF2	GTTTAGGGTGGTGTGGTTA	ACACCCTACATAATACCCAAA
EBV-BALF3	GGATTTTTGGAGGGAGTGT	ATAACCTCCAACCTCRACCAAC
EBV-BALF4	GAGYGATTGGATAGAGATTT	CRAATCATCTCTCATTTAAAA
EBV-BALF5	AGTAATATGTTTTGGTGAGGG	TCAAACTTTTTCAAAAAACCTT
EBV-BARF0	ATTTTTTATTTGGAGGTAGG	ACCAAAAAACATTCCTAATTC
EBV-BarF1	GAGTTGGGTTTGAAGATTATTATGT	CAAAACAAAACCTCATAATCAC
EBV-BARF1	AGGGTTGGTAAAGGTAGGTTTT	CTCCTCTCCTAAACCCAATTTA
EBV-BBLF1	AGGTTTGGAAATTTAAAGATG	CTTACCACCCCACTATAAC
EBV-BBLF2/BBLF3	GGGGTTTTAGGGAGTTTTTA	TCAATTAACATTCACCTTTTAA
EBV-BBLF4	GGTAGATGTTGGTGGTTAGTAGGTT	TAACCAAAATCCCTATCCTCCT
EBV-BBRF1	AGTAGAGTTTTTGGGTTGGT	CTTCTACCTTTTTCAACCTATA
EBV-BBRF2	TTTGATTGAATTTGGGAAA	CTTACTTTTTACATAATCAAATC
EBV-BBRF3	GGGGTTTTAGGGAGTTTTTA	TCAATTAACATTCACCTTTTAA
EBV-BcLF1	GTGTATGTGATGATTTTGGGTA	ATCAAATAATTAACACRACCT
EBV-BCRF1	GAGAATTTTTTGTGTTGGTT	TCCACACTCAAATACCAATAA
EBV-BcRF1	TGTTTGTGGTAATTTTGAATTA	CCCTCTTACCTTATATCATAAC
EBV-BDLF1	GTTTGTAGTGATTGTTGGTATTG	CCAAAAATAAAATACAACCAATC
EBV-BDLF2	GGTTTGGTTTTTGGGATAATT	TAATACCCCTTTATCTTAACCAA
EBV-BDLF3.5	AGAGTTTTAGTTGGTTGATGG	TTATCAAAAAAAAACCCCTACC
EBV-BDLF3	TTTAAGGATGTGTTGGTTTTTA	TCCAAATAAACTTATCTCACAAA
EBV-BDLF4	AGAAAGTTGGTGGTTTGGTTA	ACCTTAATCTAACATTCACCC
EBV-BdRF1	TTGAAGTATTTAGTGATTTGG	CAAACCTACTCTCTCTCTAC
EBV-BFLF1	AGATGTAGTGATTTAGGAGGTTT	AAATCCTCCATCTTTAAATTC
EBV-BFLF2	TTAGGTTAAGGGTTTGGTTGTA	CCAATTCCTTAATAACATCCAC
EBV-BFRF11	AAGGATAAGGTGGGTTAGTAAGTTT	ACCCAAAATCACACAAAAATAA
EBV-BFRF1A	AGATGTAGTGATTTAGGAGGTTT	AAATCCTCCATCTTTAAATTC
EBV-BFRF2	GTTGGGATTTGGATAATTTTTT	CAAAAACATCAAAAAACAAACC
EBV-BFRF3	TAGAGGTAGAATTGTTATTTGGTGA	CCCAACCACACTAACTCTCTAC
EBV-BGLF1	GGGAGTTTGAATAAGTTTAGGG	AAACTAAAAACACATCCACC
EBV-BGLF2	GGAAAGTTGTTGGGTGAAAGTTATTA	CTCAACACCCAAAAACACTCCT
EBV-BGLF3.5	TGGAAGGGTGAGGATATAGTTT	TAATCCCTCCCAATCTATCAC
EBV-BGLF3	ATTTGGATTGGATTGGGGTGT	CCAATACCAATTCCAAACACTAC
EBV-BGLF4	GGGGTGTTTTTAGAGTTTTTG	ACAATCACCTTCCCCAAAAAAA
EBV-BGLF5	TTTTAAAGGTGGTGTGTTGGAG	TCATCTCTCCATAAAATCCTC
EBV-BGRF1/BDRF1	ATTTGGATTTGGATTGGGGTGT	CCAATACCAATTCCAAACACTAC
EBV-BHLF1	TATGGAGGGGATTTTTTGG	CCCAACCRAACCCTAAT
EBV-BHRF1	TGGTTGTTTTTGGGATGTATTA	TCTTATCAACCTCTTCAAACCC
EBV-BILF1	TTGTTATTATTATYGGGAAAGG	ATCATATTAACCACCAAATCC
EBV-BILF2	GGTTAAGGGTAGTTGTTTATTT	ATCTCTTACCTCACATAAAAAA
EBV-BKRF2	AGGGTGATTGTGTAGTTTTTG	ACCCAATTACCCCATATTA AAAA
EBV-BKRF3	TTTTAATATGGGGTAATTGGGT	AAAAAACAAATTTCTCCTTTCA
EBV-BKRF4	AAGAAGTATTTGGTTTTGATTTTT	TCAAACCTCATCAATCACTCA
EBV-BLLF1	GGTGGGATTTTTTGTTTTTT	TTAAAAAACCAAATCTTCACC
EBV-BLLF2	TAGGTGGTGAAATATAATAGGTTG	AAATTAACCTTTCCACCTATTA
EBV-BLLF3	AGGTTTTTATGGTGATGATTTA	CAAAAAAAAATACAACAACC
EBV-BLRF1	GGGTTAGGTTTTTGGTAAAGA	CACCATAAAAAACCTATCCACAC
EBV-BLRF2	AGGTTTTTATGGTGATGATTTA	CAAAAAAAAATACAACAACC
EBV-BMRF1	GGTGAGGTAGAGATTGTTTTT	ATCACAACAACAACAACAACC
EBV-BMRF2	TATAAGTTTTTGTAGTGTGGGG	ACTCTCCCAATAAAAAATCCTAA
EBV-BNLF2a	GAGGTAGGAATATTTGTTGTTGA	TAAAAATCCAAACAAAAACAAA
EBV-BNLF2b	GGTATTTTGTGTTTTGTTTGA	AATTTCTTTATTAACACCCCCAA
EBV-BNRF1	TTTTTGTGTTTGGATTTTTA	ATATTTACCTCTCCATCTTACCC
EBV-BOLF1	GTATTAGTATYGGTTGGGTTAAA	RTATTCCTCAACCAACCCAC
EBV-BORF1	GTATTAGTATYGGTTGGGTTAAA	RTATTCCTCAACCAACCCAC
EBV-BORF2	GTTTGGGGATATTTAGTGTATT	TAACCTTAACCTTTAACTCATCA
EBV-BPLF1	GTATTTGTAAGGTTTTTGGTGA	TTCTACCRITACCCAAA

EBV-BRLF1	GAAAGAGTGATATTTTGTGTTTGTG	ACCATACAATACAAATAAATTTCTCTT
EBV-BRRF1	GTTTGGATGAAGAATTTGTTAG	AACTCCTAAAAATCAAAAAACAAC
EBV-BRRF2	TGTTGTGTTTTGTATGGTATTTT	CCTCCAAAAAATAACATCTT
EBV-BSLF1	AGTTTGGGAGATAGAAGGTTAT	AAAAAAAAAAAAACCTCCTCC
EBV-BSLF2/BMLF1	TATGATAGAGGGATATTTGGGT	ATCTTAACTAACCTCAACCCTATTT
EBV-BSRF1	AGTTTGGGAGATAGAAGGTTAT	AAAAAAAAAAAAACCTCCTCC
EBV-BTRF1	GTTTGTGTTTTGTTTTTAAGAGAAG	CATTTTCCCAAACAATC
EBV-BVLF1	GTTAGTAGTTTGGTTAGGGATAG	RAAACATCCRACAAATATTCCAC
EBV-BVRF1	TTGTGGTAGTTTTGTAGTTTTA	CCAAAACTAAAACTCTACCT
EBV-BVRF2	GGTTTTGTGATATTAGGT	CTCAAATTTTTACACCTATC
EBV-BWRF1	GGGGGTAGAGATAGGTAGG	AAAAAAAAACAACCAACACC
EBV-BXLF1	TTGTGGTAGTTTTGTAGTTTTA	CCAAAACTAAAACTCTACCT
EBV-BXLF2	GGGGGATATTATAGTTTGGATG	CTCTAAAAAATCCACAAACACAA
EBV-BXRF1	TAGTGGGTGGGTATTTGGTAG	TCCCAACTTTAAAAAACAACAA
EBV-BZLF1	TGTGGATAGATGGATTTGAGTT	AAATCCATCATCTTCAACAAAA
EBV-BZLF2	GGTTAAGTTAAGTAATTGTTG	CAAAAATAAAACAATAACAAAT
EBV-Cp	TAGAAATTAGTTGAGAGGTTAGTGT	ATAAAACCTTAATCCCCC
EBV-EBER1	GGGAAATGAGGGTTAGTATAGGT	TAAAAAACAACCAACCAACACC
EBV-EBER2	GTTTTGATTTAAATTTTTGTTTTAGGA	TACCCTTCTCCAAAAAATTA
EBV-Fp	GGGTAYGAAATATGGTGTATGT	AACACTCCCTCAATAATCACC
EBV-LF1	TTTTTGGTTTTATGTTGTTTTTG	AATCCTCTAATCCCTATCTCCA
EBV-LF2	TTTTGGGGTTTTATTTTTAGG	AAAAAATCTCRTACTTCCACA
EBV-LF3	AGGATAATGGAATTTATGGAT	ACAATACCTTAAAAATTTACTCAAAAA
EVB-LMP-1	AAGGTTTAGGGAAGAGGAGAGG	CATTCCCACAACCTTACCCCC
EBV-LMP-2A	TGTTATAGTTGTTGTTTTGGAGA	ACCATTTCTAAAAACCCCATAA
EVB-LMP-2B	AAGGTTTAGGGAAGAGGAGAGG	CATTCCCACAACCTTACCCCC
EBV-miR-BART-2	TTGTTATTATTATYGGGAAAGG	ATCATATTAACCACCAAAATCC
EBV-miR-BHRF1	TGGTTGTTTTGGGATGTATTA	TCTTATCAACCTCTTCAAACCC
EBV-Qp	TTAGTTTGATTAAGGGTGAGGT	CAACTACCCAAAATACCAAAAT
EBV-RPMS1	GGTTAAGGGTAGTTGTTTATTT	ATCTCTTACCTCACATAAAAAA
EBV-Wp	AGTTTTAGGGAGGGGGATTATT	TTAAAAATCCACTTACCTCTAACCC
EBV-Wp2	AATTTTTGGTAGTGATTGGAT	AAAAATAAAAAACCCCTCTTAC
<b>MSP</b>		
MSP-EBV-Cp-m	ACGTTTTATTTGGGAGGAGC	CAAACGTAATTAATCCCGC
MSP-EBV-Cp-u	ATAATGTTTTATTTGGGAGGAGT	ACAAAACATAATTAATCCCACCC
MSP-EBV-Wp-m	TTTTTTAGTTTAGCGCGTTTAC	AACGCTCTAATACGACCCAAA
MSP-EBV-Wp-u	GGTTATTTTTTAGTTTAGTGTATTAT	CCTAACACTCTAATACAACCAAAA
MSP-EBV-Qp-m	TTGTTTGGTCGTTAGATGGC	TATATTACCCGCCATCCGAT
MSP-EBV-Qp-u	ATGTTGTTGGTTGTTAGATGGT	TATATTACCCACCATCCAATAAC
<b>RT*</b>		
RT-EBV-EBNA2	AGAGGAGGTGGTAAGCGGTTT	TGACGGGTTTTCCAAGACTATCC
RT-EBV-BRLF1	ACCATACAGGACACAACACCT	GATGTTGAGCGTGGCCATTAG
RT-EBV-BHRF1	GTCAAGGTTTCGTCTGTGTG	TTCTCTTGCTGCTAGCTCCA
RT-EBV-EBER1	AAAACATGCGGACCACCAGC	AGGACCTACGCTGCCCTAGA

\*Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S. & Rickinson AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* **68**, 7374-85 (1994).

\*Felton-Edkins, Z.A., Kondrashov, A., Karali, D., Fairley, J.A., Dawson, C.W., Arrand, J.R., Young, L.S. & White, R.J. Epstein-Barr virus induces cellular transcription factors to allow active expression of EBER genes by ARN polymerase III. *J Biol Chem*. **281**, 33871-80 (2006)

\*Luo, B., Wang, Y., Wang, X.F., Liang, H., Yan, L.P., Huang, B.H. & Zhao, P. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. **11**, 629-33 (2005).

\*Oudejans, J.J., van den Brule, A.J., Jiwa, N.M., de Bruin, P.C., Ossenkuppele, G.J., van der Valk, P., Walboomers, J.M. & Meijer, C.J. BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the BCL-2 protooncogene, is transcribed in EBV-associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood* **86**, 1893-902 (1995).



## ANEXO III

## Indice de tablas y figuras

<b>FIGURAS</b>	<b>PAG</b>
<i>FIGURA 1</i> A: Representación esquemática del ensamblaje de las histonas nucleares en el nucleosoma B: Estructura del nucleosoma	9
<i>FIGURA 2</i> Compactación del DNA	10
<i>FIGURA 3</i> Mecanismo de metilación del anillo de citosina	12
<i>FIGURA 4</i> Modificaciones post-traduccionales de las histonas	16
<i>FIGURA 5</i> Representación esquemática de la distribución de la metilación en células normales y células tumorales	20
<i>FIGURA 6</i> Estructura de los viriones de HPV	23
<i>FIGURA 7</i> Los papilomavirus están contenidos en 5 grupos	24
<i>FIGURA 8</i> Representación esquemática de la organización del genoma del HPV16	26
<i>FIGURA 9</i> Progresión de las lesiones en la infección con HPV	27
<i>FIGURA 10</i> Representación del genoma de HPV 16	28
<i>FIGURA 11</i> A: Esquema de la progresión histológica desde el epitelio normal hasta el carcinoma invasivo B: Representación del episoma de HPV	30
<i>FIGURA 11BIS</i> E6 y E7 interactúan con p53 y pRB	31
<i>FIGURA 12</i> Preparado delgado con grupo de células normales cervicales y células infectadas con HPV	33
<i>FIGURA 13</i> Microfotografía electrónica del EBV	38
<i>FIGURA 14</i> A: Esquema de la morfología del EBV. B: Representación del ciclo vital	40
<i>FIGURA 15</i> El genoma del EBV	45
<i>FIGURA 16</i> Esquema mostrando los pasos de las técnicas de secuenciación de bisulfito y MSP	61
<i>FIGURA 17</i> Representación esquemática del ensayo de ChIP	67
<i>FIGURA 18</i> Representación esquemática del genoma del HPV16	73
<i>FIGURA 19</i> Patrón de Metilación del HPV 16 en smears de distinto grado	74
<i>FIGURA 20</i> Patrón de Metilación del HPV 16 en carcinomas de células escamosas cervicales	76
<i>FIGURA 21</i> Ejemplo de alineamiento de la línea Caski	75
<i>FIGURA 22</i> Patrón de Metilación del HPV 16 en líneas celulares establecidas	77
<i>FIGURA 23</i> Representación de los porcentajes de metilación en las muestras secuenciadas en HPV16	78
<i>FIGURA 24</i> Cluster no supervisado en HPV16	79
<i>FIGURA 25</i> Ejemplo de alineamiento de la línea 866	80
<i>FIGURA 26</i> Técnica de FISH	80
<i>FIGURA 27</i> Secuenciación de bisulfito en queratinocitos transfectados con HPV16	81
<i>FIGURA 28</i> Variación en los porcentajes de metilación en la immortalización de queratinocitos humanos	82
<i>FIGURA 29</i> Secuenciación de bisulfito representando dos fragmentos en la línea celular Caski	82
<i>FIGURA 30</i> Ensayo de Western Blot en las líneas Caski y SiHa	83
<i>FIGURA 31</i> RT-PCR cuantitativa	84

<i>FIGURA 32</i>	Representación esquemática del genoma del HPV16	84
<i>FIGURA 33</i>	Resultados obtenidos por MSP para el gen L2	85
<i>FIGURA 34</i>	Representación gráfica de los porcentajes de metilación del gen L2	85
<i>FIGURA 35</i>	Representación esquemática del genoma del HPV18	86
<i>FIGURA 36</i>	Resultados de la secuenciación de bisulfito	87
<i>FIGURA 37</i>	Patrón de Metilación del HPV 18 en líneas celulares	88
<i>FIGURA 38</i>	Representación de los porcentajes de metilación en las muestras secuenciadas de HPV18	89
<i>FIGURA 39</i>	Cluster no supervisado representativo del metiloma de HPV18	90
<i>FIGURA 40</i>	Secuenciación de bisulfito en queratinocitos transfectados con HPV18	90
<i>FIGURA 41</i>	Resumen de la progresión de la metilación en queratinocitos transfectados con HPV18	91
<i>FIGURA 42</i>	Secuenciación de bisulfito de la línea celular Hela	92
<i>FIGURA 43</i>	Distintos enfoques para evaluar la demetilación del HPV18 en la línea celular Hela	92
<i>FIGURA 44</i>	Ensayo de Western Blot	93
<i>FIGURA 45</i>	Ensayo de RT-PCR	93
<i>FIGURA 46</i>	Representación esquemática del genoma del HPV18	94
<i>FIGURA 47</i>	Representación grafica de los porcentajes de metilación del gen E2	95
<i>FIGURA 48</i>	PCR específica de metilación (MSP) en HPV18	95
<i>FIGURA 49</i>	El metiloma de EBV	97
<i>FIGURA 49BIS</i>	Resultados de la secuenciación de bisulfito para el virus wild-type en algunos promotores	98
<i>FIGURA 50</i>	Resultados de la secuenciación de bisulfito para la lesión correspondiente a linfadenitis reactiva en algunos promotores	99
<i>FIGURA 51</i>	Resultados de la secuenciación de bisulfito para la lesión correspondiente a linfoma de Burkitt en algunos promotores	100
<i>FIGURA 52</i>	Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de bisulfito para el promotor Qp	101
<i>FIGURA 53</i>	Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de bisulfito para los promotores Cp y Wp	102
<i>FIGURA 54</i>	Cluster no supervisado del metiloma de EBV	104
<i>FIGURA 55</i>	Ensayo de MSP para el gen BZLF1	105
<i>FIGURA 56</i>	A: Ensayo de MSP para los genes LMP1, EBER1 y Cp. B: Ensayo de MSP para los genes Wp, Fp, Qp y BRLF1.	106
<i>FIGURA 57</i>	Técnica de FISH	106
<i>FIGURA 58</i>	Ensayo de RT-PCR	107
<i>FIGURA 59</i>	Secuenciación de bisulfito obtenida para algunos de los genes evaluados por RT-PCR	108
<i>FIGURA 60</i>	Ensayo de RT-PCR para el gen LMP1	108
<i>FIGURA 61</i>	Ensayo de Western Blot donde se aprecia la variación en los niveles de EBNA2 y LMP1 en la línea celular Raji	109
<i>FIGURA 62</i>	Ensayo de RT-PCR para LMP1 y EBNA2	109
<i>FIGURA 63</i>	RT-PCR cuantitativa en la que se evalúa la variación en los niveles del miR-BHRF1 en la línea celular Akata	109
<i>FIGURA 64</i>	Esquema de los metilomas correspondientes a las líneas LCL y linfocitos derivados de pacientes con el síndrome ICF infectados con EBV	110
<i>FIGURA 65</i>	Inducción del ciclo lítico en la línea celular Akata	111
<i>FIGURA 66</i>	Los 4 promotores alternativos de EBNA1	126
<i>FIGURA 67</i>	Representación de los promotores alternativos de EBNA en las distintas patologías	126

<b>TABLAS</b>		<b>PAG</b>
<b>TABLA 1</b>	CLASIFICACIÓN DE LOS ALFA PAPILOMAVIRUS	25
<b>TABLA 2</b>	GENES Y PROTEÍNAS DEL HPV Y SUS RESPECTIVAS FUNCIONES	33
<b>TABLA 3</b>	UBICACIÓN DE LAS LESIONES SEGÚN EL TIPO DE PAPILOMA VIRUS INVOLUCRADO	35
<b>TABLA 4</b>	CLASIFICACION DE LOS HERPESVIRUS HUMANOS	36
<b>TABLA 5</b>	TUMORES ASOCIADOS a EBV	43
<b>TABLA 6</b>	GENES DE LATENCIA DEL EBV	44
<b>TABLA 7</b>	LINEAS CELULARES TUMORALES UTILIZADAS PARA CADA TIPO DE VIRUS	57
<b>TABLA 8</b>	TUMORES PRIMARIOS UTILIZADOS PARA CADA TIPO DE VIRUS	58
<b>TABLA 9</b>	ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS	65
<b>TABLA 10</b>	PORCENTAJES DE METILACIÓN OBTENIDOS POR MSP EN EBV	105
<b>TABLA 11</b>	RELACIÓN DE LOS PROMOTORES CON LOS DISTINTOS PROGRAMAS DE LATENCIA	124