

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Silenciamiento epigenético del gen SLC5A8,
candidato supresor de tumores en cáncer cervicouterino**

Tesis que presenta:

M. en C. JENNIFER YAOCIHUATL HERNÁNDEZ JUÁREZ

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Juan Patricio Gariglio Vidal

Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Agradecimientos

En primera instancia, agradezco al **CONACyT** (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por el apoyo económico otorgado durante esta etapa de mis estudios de doctorado, y al **CINVESTAV IPN** (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional) por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de esta reconocida institución.

Mi agradecimiento por su tutoría al **Doctor Patricio Gariglio Vidal**, Investigador del CINVESTAV, y al **Doctor José de la Luz Díaz Chávez**, Investigador del Instituto Nacional de Cancerología.

Agradezco a la **Doctora Rosa María Bermúdez**, al **Doctor Jaime García Mena** y al **Doctor Efraín Garrido Guerrero** por sus comentarios y sugerencias para este proyecto.

Mi gratitud a la **M. en C. Patricia De La Torre**, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su colaboración para realizar las secuenciaciones del ADN.

Agradezco al personal administrativo de esta institución, especialmente a **Gabriela Mora Macías**, por la ayuda en todos los trámites.

Por último, quisiera agradecer a **mis amigos** de laboratorio: a Jesús, por los buenos momentos compartidos y los consejos; a Janini, por apoyarme y asesorarme; a Rubiceli, por confiar en mí y por tu generosidad; a Genaro, por tener siempre la energía de alegrar el día; a Eli y Karlita, por haberme adoptado en su laboratorio.

*El presente trabajo es dedicado a quienes han sido
parte fundamental en este camino.*

*A Josefina: por tus dichos, por tus lecciones,
por tu sabiduría, por siempre haberme dicho que estudiara;*

*A Margarita: por tus grandes enseñanzas y sacrificios, por confiar en mí,
por apoyarme y por ser una pieza clave de este gran sueño;*

*A Citla: por ser un ejemplo de disciplina, por tu complicidad en cada uno de
mis proyectos, por ser una luz en los momentos más oscuros,
por ser "Poder Vinculación";*

*A Yetla: por ser mi defensora y consejera, por motivarme
en las situaciones difíciles;*

*A Breitner, porque me has apoyado a tu manera, más allá
de las distancias y circunstancias.*

Ustedes son la razón por la que pude seguir adelante.

Mil gracias.

Índice general

1. Introducción	5
1.1. Cáncer cérvicouterino	5
1.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)	6
1.3. Epigenética y regulación de la expresión génica	8
1.4. Metilación del ADN	11
1.5. Alteraciones epigenéticas en cáncer	13
1.5.1. Hipometilación global del ADN en cáncer	14
1.5.2. Hipermetilación del ADN en cáncer	15
1.5.3. Modificaciones de histonas en células cancerosas	17
1.6. Modificaciones epigenéticas en cáncer cervical	19
1.7. Papel de E6 y E7 en la regulación del estado de metilación del ADN	19
1.8. Interacción de E6 y E7 con las enzimas modificadoras de histonas	21
1.9. Metabolismo en cáncer	22
1.10. Transportadores de nutrientes en cáncer	24
1.11. SLC5A8 y su silenciamiento en cáncer	26
1.12. Rol de SLC5A8 como supresor de tumores	27
1.13. Terapia epigenética contra el cáncer	28
2. Justificación	30
3. Hipótesis	31

4. Objetivos	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. Estrategia experimental	34
6. Materiales y Métodos	37
6.1. Materiales	37
6.1.1. Líneas celulares	37
6.1.2. Muestras de tejidos cervicales humanos	37
6.2. Métodos	38
6.2.1. Cultivo celular	38
6.2.2. Extracción de ARN	38
6.2.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	39
6.2.4. RT-PCR	40
6.2.5. Extracción de ADN de líneas celulares de CaCU	41
6.2.6. Extracción de ADN de muestras de pacientes y genotipificación	42
6.2.7. Modificación del ADN con bisulfito de sodio	42
6.2.8. PCR metilo-específica (MS-PCR)	43
6.2.9. PCR con ADN modificado por bisulfito (bs-PCR)	43
6.2.10. Clonación del producto de bs-PCR en el vector pJet1.2	44
6.2.11. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α	45
6.2.12. Confirmación de presencia de bs-SLC5A8 en <i>E. coli</i> DH5 α	45
6.2.13. Extracción de plásmido	45
6.2.14. Secuenciación genómica por bisulfito (bs-seq)	46
6.2.15. Medición de la metilación global	47
6.2.16. Medición de la densidad de sitios CpG metilados	47
6.2.17. Inhibición de la metilación del ADN y la desacetilación de histonas	48
6.2.18. Transfección de células HeLa	48
6.2.19. Ensayo de proliferación celular	49

6.2.20. Modelo de xenoinjertos en ratones desnudos	50
6.2.21. Análisis estadístico	50
7. Resultados	52
7.1. Análisis de expresión y metilación de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU .	52
7.1.1. Análisis de expresión de SLC5A8	52
7.1.2. Análisis de metilación mediante MS-PCR	52
7.1.3. Análisis de metilación mediante bs-seq	55
7.2. Efecto de inhibición de la metilación del ADN y desacetilación de histonas .	58
7.3. Análisis de expresión y metilación de SLC5A8 en TT cervicales	61
7.4. Efecto de la reexpresión de SLC5A8 en la proliferación celular	67
7.5. Efecto de la reexpresión de SLC5A8 en el crecimiento de tumores	69
8. Discusión	71
9. Conclusiones	78
10. Perspectivas	80
Bibliografía	80

Índice de Figuras

1.1. Genoma del VPH	7
1.2. Progresión neoplásica asociada al VPH en el epitelio cervical	9
1.3. El paisaje epigenético	10
1.4. Representación esquemática de la metilación del ADN	11
1.5. Cambios de metilación en el ADN en diversos tipos de cáncer	14
7.1. Análisis de expresión de SLC5A8 mediante RT-PCR	53
7.2. Esquema de la localización de la ICG en SLC5A8	54
7.3. MS-PCR de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU	54
7.4. Amplificación de bs-SLC5A8 en líneas celulares de CaCU	55
7.5. Hipermetilación de la ICG de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU	57
7.6. Metilación global de la ICG de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU	58
7.7. Reactivación de la expresión de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU	60
7.8. Expresión diferencial de SLC5A8 en TT de pacientes con CaCU	64
7.9. Perfiles de metilación de la ICG de SLC5A8 en CaCU	65
7.10. Densidad de mCpG dentro de la ICG de SLC5A8 en TT cervicales	66
7.11. Metilación global de la ICG de SLC5A8 en TT cervicales	67
7.12. Inhibición de la proliferación de células HeLa transfectadas con SLC5A8	68
7.13. Disminución del crecimiento tumoral por SLC5A8 en xenoinjertos	70

Índice de Tablas

1.1. Principales alteraciones epigenéticas en CaCU	20
6.1. Secuencias de primers para PCR	51
6.2. Condiciones de PCR	51
7.1. Caracterización clínica de tejidos tumorales con CaCU	61

Lista de abreviaturas

CaCU: cáncer cervicouterino;

VPH: Virus del Papiloma Humano;

ICG: isla CpG;

TT: tejido tumoral;

DNMT: ADN-metiltransferasa;

5-azadC: 5-aza-2'-desoxicitidina;

TSA: tricostatina A;

GST: gen supresor de tumores;

HDAC: desacetilasas de histonas;

MS-PCR: PCR metilo-específica;

β 2M: β -2 microglobulina;

M-SLC5A8: SLC5A8 metilado;

U-SLC5A8: SLC5A8 desmetilado;

bs-SLC5A8: secuencia modificada con bisulfito de SLC5A8;

bs-seq: secuenciación genómica por bisulfito

Resumen

El gen SLC5A8 codifica al transportador de monocarboxilatos acoplado a sodio SMCT1 (también denominado como proteína SLC5A8), y se encuentra inactivado epigenéticamente en diversos tipos de cáncer. El silenciamiento del gen SLC5A8 impide la entrada de inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC) y favorece la reprogramación metabólica de las células neoplásicas. Sin embargo, su expresión y regulación en el cáncer cervicouterino (CaCU) no se habían dilucidado hasta este momento. Por tanto, el objetivo de este estudio fue investigar si la expresión de SLC5A8 está silenciada en CaCU y si mecanismos epigenéticos están involucrados en su regulación.

Utilizando ARN de líneas celulares humanas de CaCU (HeLa, Calo, SiHa, CaSki y C-33A) y tejidos tumorales de pacientes con CaCU, se analizó la expresión de SLC5A8 mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); mientras que el perfil de metilación de la isla CpG (ICG) de SLC5A8 se analizó mediante secuenciación alelo-específica de ADN modificado con bisulfito. Además, se examinó el efecto de reactivación de SLC5A8 en las líneas celulares de CaCU, después de ser tratadas con inhibidores de metilación del ADN (5-aza-2'-desoxicitidina) y/o de HDAC (tricostatina A y piruvato).

Todas las líneas celulares de CaCU y un rango de tejidos tumorales (65.5 %) mostraron represión total o parcial de la expresión de SLC5A8. La secuenciación por bisulfito reveló que, en la mayoría de los casos, la hipermetilación de la ICG dentro del primer exón de SLC5A8 correlaciona con una disminución en su expresión. La expresión de SLC5A8 se restauró en las líneas celulares de CaCU después de la exposición a 5-aza-2'-desoxicitidina, sola, o en

combinación con tricostatina A o piruvato, lo que sugiere que la metilación del ADN y la desacetilación de histonas contribuyen a su inhibición, de una forma dependiente de la línea celular.

Juntos, los resultados del presente estudio demuestran que la represión del gen SLC5A8 es un evento común en CaCU, y resaltan el papel clave de la hipermetilación del ADN en la represión de SLC5A8 en esta enfermedad, así como la participación de la desacetilación de histonas, al menos parcialmente. Asimismo, resultados preliminares sugieren la posible función de SLC5A8 como supresor de tumores en CaCU, aunque se requieren estudios adicionales para validar su implicación en el desarrollo de este padecimiento, y su posible utilidad como biomarcador o blanco terapéutico.

Abstract

The SLC5A8 gene encodes the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (also referred to as SLC5A8 protein), which is epigenetically inactivated in various tumour types. This has been attributed to the fact that its silencing prevents the entry of histone deacetylase (HDAC) inhibitors and favours the metabolic reprogramming of neoplastic cells. Nevertheless, its expression and regulation in cervical cancer (CC) have not been elucidated to date. Thus, the aim of the present study was to investigate whether SLC5A8 expression is silenced in CC and if epigenetic mechanisms are involved in its regulation.

Using RNA and DNA from human CC cell lines (HeLa, Calo, SiHa, CaSki and C-33A) and tumour tissues from patients with CC, the expression of SLC5A8 was analysed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the methylation status of its CpG island (CGI) by bisulphite-sequencing. Additionally, SLC5A8 reactivation was examined in the CC cell lines following treatment with DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and HDAC inhibitors (trichostatin A and pyruvate).

All the CC cell lines and a range of tumour tissues (65.5 %) exhibited complete or partial loss of SLC5A8 expression. The bisulphite-sequencing revealed that hypermethylation of the CGI within SLC5A8 first exon was associated with its downregulation, in the majority of cases. The transporter expression was restored in the CC cell lines following exposure to 5-aza-2'-deoxycytidine alone, or in combination with trichostatin A or pyruvate, suggesting that DNA methylation and histone deacetylation contribute to its inhibition in a cell line-dependent manner.

Together, the results of the present study demonstrate that the repression of the SLC5A8 gene is a common event in CC and highlight the key role of DNA hypermethylation in the repression of SLC5A8 in this malignancy, as well as the involvement of histone deacetylation, at least partially. Furthermore, preliminary results suggest its potential function as a tumour suppressor in CC, but additional studies are required to validate the implication of SLC5A8 in the development of this malignancy, and its potential as a biomarker or therapeutic target.

Introducción

1.1. Cáncer cérvicouterino

De acuerdo a las estimaciones del proyecto GLOBOCAN 2018, el cáncer cervicouterino (CaCU) es el cuarto cáncer más común entre la población femenina a nivel mundial, con una incidencia de 570,000 casos nuevos y 311,000 muertes en 2018. Sin embargo, el CaCU ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad, detrás del cáncer de mama, en regiones con un bajo índice de desarrollo humano [1]. La mayoría de estos casos tienden a presentarse en la etapa media de la vida, afectando principalmente a mujeres entre los 35 y 44 años [2]. En México, 7,869 nuevos casos son diagnosticados con CaCU por año, con 4,121 muertes anualmente [1,3], siendo la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas de 15-44 años [3].

Estudios epidemiológicos y moleculares han documentado que la infección persistente con el virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo juega un papel etiológico crucial en el CaCU [4]. De los diversos tipos de VPH de alto riesgo, el 16 y 18 causan el 70 % de los casos de CaCU y el 50 % de las lesiones cervicales de alto grado [5]. El tipo histológico más frecuentemente encontrado en las mujeres es el carcinoma de células escamosas, el cual inicia en la zona de transformación escamocolumnar, es decir, donde el exocérvix se une al endocérvix. Sólo un pequeño porcentaje de casos se trata de adenocarcinomas, los cuales surgen de las células glandulares productoras de mucosa del endocérvix [2, 4, 5]. Con menos

frecuencia hay casos que tienen características de ambos carcinomas, llamados carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos [2].

La infección del cérvix con VPH es el contagio viral de transmisión sexual más común en todo el mundo [6]. Se considera que aproximadamente el 80 % de las mujeres sexualmente activas han sido infectadas con VPH de alto riesgo en algún momento de su vida [7]. La mayoría de estas infecciones desaparecen espontáneamente, pero la infección persistente con los VPH de alto riesgo puede conducir al cáncer [8]. Dado que no todas las infecciones progresan a CaCU, la presencia del VPH se ha calificado como una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de la enfermedad. Existe una variedad de factores adicionales que actúan en conjunto con el virus en el proceso de carcinogénesis [9].

1.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los virus del papiloma humano pertenecen a la familia Papillomaviridae. Son capaces de infectar las células basales de la mucosa y el epitelio cutáneo, de una manera específica de especie, e inducir proliferación celular [6]. Se tratan de pequeños virus de 52-55 nm de diámetro, su material genético está compuesto de ADN de doble cadena, sin envoltura y con una cápside icosaédrica [6, 10]. Su genoma consta de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb) [11], el cual se divide en tres regiones funcionales: una región temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales E1-E7 necesarias para la replicación del ADN viral, el control de la transcripción viral, la transformación e inmortalización celular; una región tardía L (Late) que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2, que participan en el ensamblaje del virión; y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la secuencia de ADN que permite controlar la replicación y transcripción del genoma viral [6, 9, 10] (ver Figura 1.1).

Según su potencial oncogénico, los VPH se dividen en grupos de alto y bajo riesgo. Dentro de la categoría de alto riesgo se encuentran los VPH de tipo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. En particular, los tipos 16 y 18 son responsables del desarrollo de

la mayoría de los carcinomas cervicales [6].

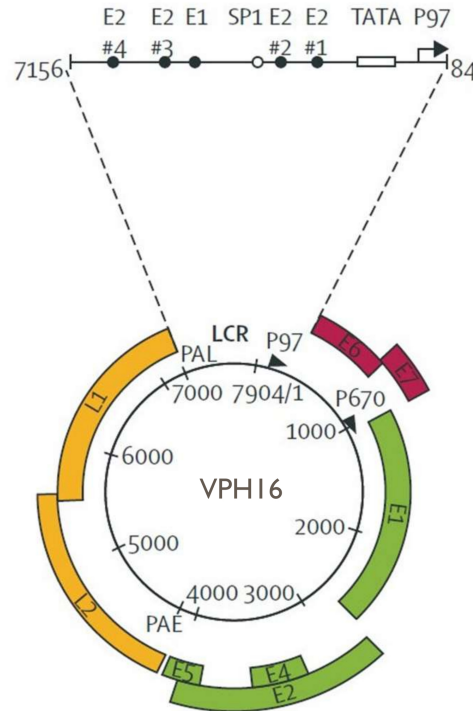


Figura 1.1: Genoma del VPH. Organización genómica del VPH de alto riesgo tipo 16, demostrando la región temprana (E), la región tardía (L) y la región larga de control (LCR). Reproducido de [11]

El VPH establece una infección en las células basales del epitelio escamoso a través de microlesiones dentro del tejido, o puede dirigirse a las células en, o cerca de, la unión escamocolumnar, donde estos virus tienen un mayor potencial de transformación viral [12]. El ciclo de vida del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula huésped infectada (Figura 1.2). La infección inicial de las células basales generalmente se asocia con una baja amplificación del genoma del VPH (20-100 copias/célula), el cual se mantiene en forma episomal y con una baja expresión de los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7. A medida que las células basales infectadas se replican y las células hijas se mueven hacia la capa parabasal, la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 evita que las células infectadas se diferencien, al tiempo que las conducen a reingresar al ciclo celular para reactivar la síntesis de ADN y así mantener un elevado número de copias del genoma viral (mínimo

1,000 copias/célula) [12, 13]. La migración de las células a las capas superiores provoca que los genomas virales se repliquen con mayor eficacia y que las proteínas L1 y L2 se sinteticen. El ciclo de vida productivo se completa con la encapsidación de los episomas en viriones infecciosos, que luego se liberan de forma no lítica desde las células en descamación del epitelio hacia el entorno externo inmediato [8, 12, 13].

Un ciclo viral productivo se mantiene en una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. Ocasionalmente se produce una infección persistente por VPH, durante la cual la expresión de los genes tardíos se pierde y se desarrolla una lesión intraepitelial escamosa de alto grado [8, 12, 13]. Un paso importante en la progresión maligna es la integración del VPH en el genoma del huésped. La integración inhibe la expresión del represor viral E2, el cual normalmente se une a la región viral LCR para regular la transcripción y la replicación de los genes del VPH. La ausencia de la proteína E2 permite la expresión permanente de las oncoproteínas E6 y E7, que promueven la transformación y la inmortalización celular al inactivar a las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb, respectivamente. Lo anterior permite la expresión alterada de genes del huésped que participan en procesos de adhesión celular, apoptosis, ciclo celular, reparación del ADN o metabolismo celular. Además, la integración viral cerca o dentro de un gen puede conducir al crecimiento celular y a alteraciones de la proliferación, así como a inducir la modificación epigenética de genes virales y celulares (ver sección 1.6, 1.7 y 1.8), repercutiendo en su expresión [14]. Cuando las células transformadas adquieren propiedades móviles que les permiten penetrar en la membrana basal epitelial e invadir el estroma subyacente, surge el carcinoma de células escamosas [8, 12, 13].

1.3. Epigenética y regulación de la expresión génica

Hasta hace poco, las investigaciones de biología molecular se habían centrado en analizar el papel de las alteraciones directas en la secuencia del ADN debido a mutaciones, deleciones, inserciones o reordenamientos genómicos, y su efecto sobre la expresión génica. Sin embargo, actualmente han dirigido su interés a mecanismos alternativos en la modulación génica, los cuales afectan su expresión sin modificar la secuencia actual del gen y se preservan después

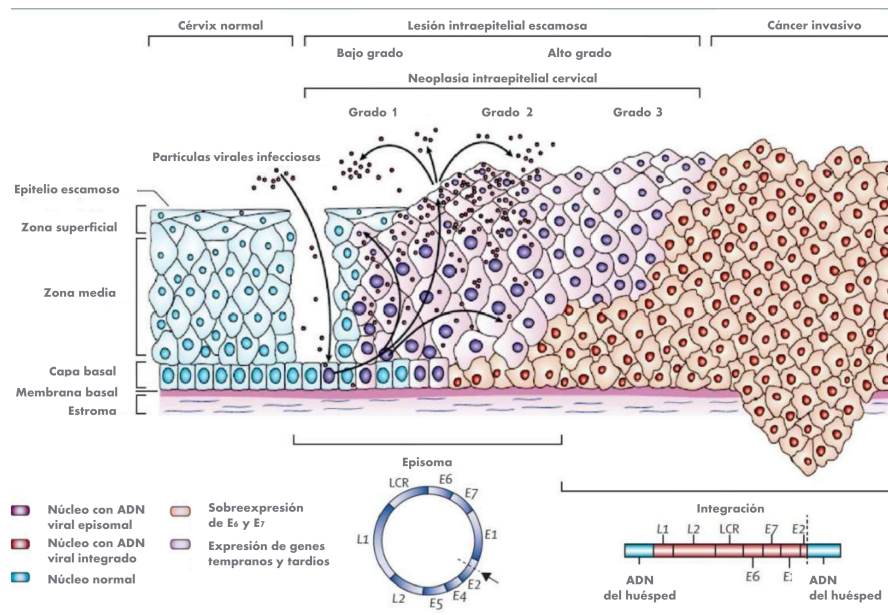


Figura 1.2: Progresión neoplásica asociada al VPH en el epitelio cervical. El VPH puede acceder a las células basales a través de microlesiones en el epitelio. Después de la infección, los genes tempranos del VPH se expresan y el ADN viral se replica en forma episomal. En las capas superiores (zona media y zona superficial), el genoma viral se replica aún más y los genes tardíos son expresados. L1 y L2 encapsidan los genomas virales para formar su progenie e iniciar una nueva infección. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado mantienen la replicación viral productiva. La progresión de las lesiones a cáncer microinvasivo e invasivo se asocia con la integración del genoma viral en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la pérdida o alteraciones de la expresión de E2, y la subsecuente regulación positiva de la expresión de E6 y E7. Reproducido de [8]

de la división celular, lo cual se conoce como epigenética [15].

En el núcleo, el ADN se compacta en una estructura definida como cromatina, donde el nucleosoma es la unidad básica. Cada nucleosoma está formado por ADN superenrollado, empaquetado alrededor de un octámero de histonas (cuatro pares de H3, H4, H2A y H2B). La cromatina puede asumir dos conformaciones: euromatina, que se caracteriza por un ADN con un enrollamiento más relajado que permite la transcripción génica, y la heterocromatina, que está asociada a un ADN compactado al que no puede unirse la maquinaria de transcripción (ver Figura 1.3). Mediante mecanismos epigenéticos puede haber una transición entre estas dos conformaciones, lo que permite a las células modular la activación transcripcional o el silenciamiento génico, y provocar cambios significativos en sus fenotipos y funciones

biológicas [16, 17].

Se han identificado varios mecanismos que interactúan en la regulación epigenética. Dentro de estos mecanismos, la metilación del ADN y la modificación covalente de histonas influyen en la conformación de la cromatina, junto con los complejos de remodelación de nucleosomas; mientras que los microRNAs (miRNAs) influyen en la expresión de genes post-transcripcionalmente [16].

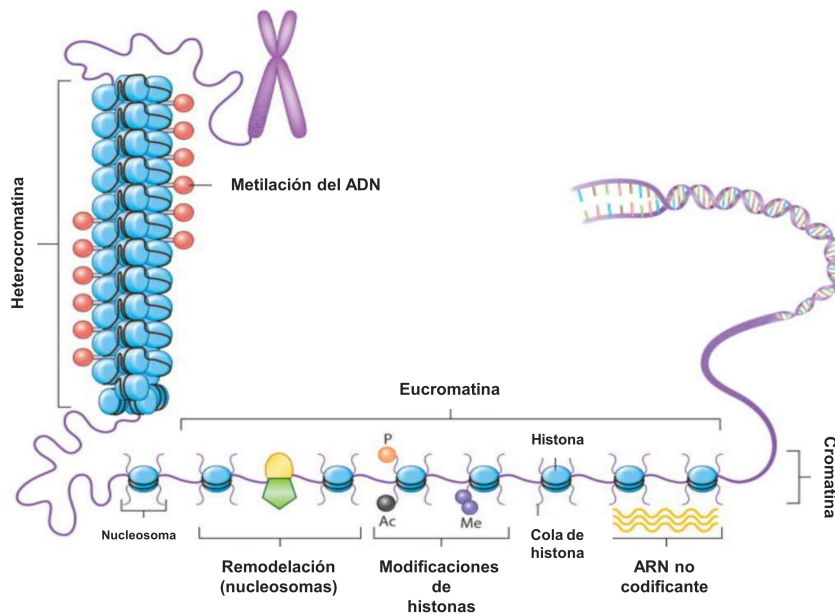


Figura 1.3: El paisaje epigenético. Las conformaciones de la cromatina son compatibles con la activación transcripcional o el silenciamiento génico, lo que permite que las regiones reguladoras de genes cambien estos estados a través de la colocación de los nucleosomas (círculos azules). La conformación más abierta (eucromatina) deja el sitio de inicio de la transcripción libre de nucleosomas. La metilación del ADN (círculos rojos), las modificaciones de las colas de histonas del nucleosoma (líneas que se extienden desde los círculos azules) incluidas la fosforilación de serinas (círculo naranja), la acetilación de lisinas (círculo negro) y la metilación de lisinas (círculo púrpura), así como los complejos de remodelación de nucleosomas (pentágono verde con óvalo amarillo) determinan la conformación que adquiere la cromatina. Adicionalmente, los ARN no codificantes (ondas amarillas), como los miRNAs, influyen en esta modulación. Modificado de [18]

1.4. Metilación del ADN

La modificación epigenética más ampliamente caracterizada es la metilación del ADN, la cual se reconoce como un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica [15]. La metilación biológica en vertebrados ocurre por la unión covalente de un grupo metilo a la posición del carbono 5 de una citosina unida a una guanina por un enlace fosfodiéster (CpG) en el ADN [16,19]. En el genoma humano, la prevalencia real del dinucleótido CpG es significativamente menor a la esperada estadísticamente, ya que es del 1 % en comparación con el 6 % esperado [15]. Su proceso de metilación es inducido por las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMT), que usan S-adenosil metionina (SAM) como molécula donadora del grupo metilo [20]. A menudo, las DNMT se clasifican como: *de novo* (DNMT3A y B) porque metilan predominantemente ADN no metilado, y de mantenimiento (DNMT1) porque preserva el patrón preexistente de metilación después de la replicación celular [16].

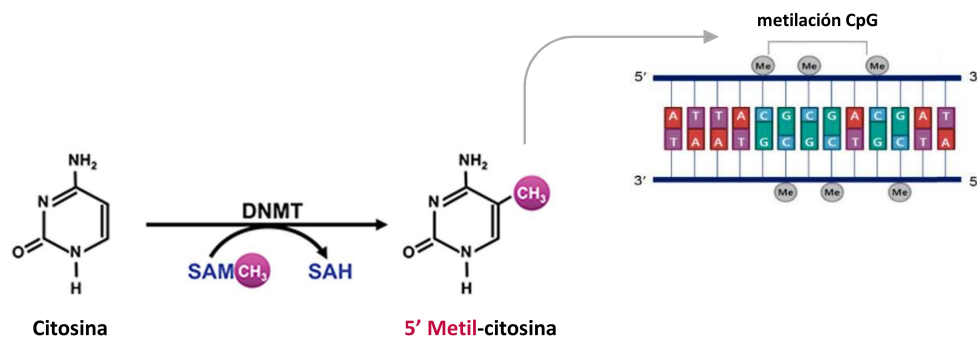


Figura 1.4: Representación esquemática de la metilación del ADN, que convierte a la citosina en 5'-metil-citosina a través de las ADN-metiltransferasas (DNMT). La metilación del ADN típicamente ocurre en citosinas que son seguidas por una guanina, es decir, en sitios CpG. Modificado de [21]

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos aleatoriamente, sino que se concentran en regiones llamadas islas CpG (ICG) [22]. Las ICG se definen como fragmentos de ADN mayores de 200 pb, que se desvían significativamente del patrón genómico promedio por presentar en su secuencia un contenido de guaninas y citosinas superior al 50 %, con especial abundancia de dinucleótidos CpG (60 %) [23]. Están situadas preferentemente en el extremo 5' de los

genes [24], ya sea en la región promotora, en el primer exón, o incluso en las regiones 5' UTR [23]. Se encuentran en alrededor del 70 % de los genes conocidos, incluida la mayoría de los genes constitutivos y algunos genes tejido-específico, genes que controlan el desarrollo y genes supresores de tumor (GST) [25,26]. También los genes no codificantes de proteínas, como los que codifican para miRNAs, pueden poseer ICG, ubicadas cerca o dentro de la región promotora [14]. Las ICG participan en la modulación epigenética de los genes en los que se encuentran [16], mediante la adaptación de la arquitectura de la cromatina local, la cual es influenciada por cambios en el estado de metilación del ADN [25]. No obstante, normalmente la mayoría de las ICG se encuentran hipometiladas, lo que se ha relacionado con la protección de estas zonas contra la actividad de las DNMT. Esto ocurre mediante la unión enriquecida de varios factores de transcripción, como Sp1, E2F o CTCF [27], cada uno de los cuales contiene sitios CpG en su secuencia consenso. Aunque cabe señalar que hay un pequeño porcentaje de las ICG que se encuentran metiladas, como las de los promotores en algunos tejidos somáticos, así como en los promotores con un contenido de sitios CpG relativamente bajo [26].

Los sitios CpG restantes que se extienden por todo el genoma están fuertemente metilados [20]. Muchos de estos residuos CpG modificados se encuentran sobre los cuerpos intergénicos y las secuencias repetidas (por ejemplo, en repetidos centroméricos y elementos transponibles que constituyen una gran fracción del genoma de mamíferos). Esta adición del grupo metilo funciona como un mecanismo para prevenir la inestabilidad cromosómica, al contribuir a la inmovilización de transposones de mamíferos y al minimizar el ruido transcripcional, mediante el silenciamiento del ADN no codificante [24,26] o elementos genéticos potencialmente dañinos [20].

Como se mencionó anteriormente, en las células normales la metilación del ADN está predominantemente excluida de las ICG, con lo cual se propicia un estado de cromatina transcripcionalmente activo [25, 26]. Sin embargo, éste es un mecanismo esencial por el cual la célula inactiva la expresión de ciertos genes cuando no son requeridos durante los procesos biológicos normales, por ejemplo: en la inactivación de uno de los cromosomas X en las mu-

jes; en la impronta genómica, donde la hipermetilación en uno de los dos alelos parentales garantiza su expresión monoalélica; o en el silenciamiento de ciertos genes tejido-específico o genes específicos de células germinales [15, 19, 26, 28–31].

La metilación del ADN se asocia menos frecuentemente con la activación transcripcional, por ejemplo, cuando ocurre en los cuerpos génicos (región después del primer exón). La metilación de los sitios CpG de estas zonas es común en los genes expresados de forma ubicua, y está positivamente correlacionada con la eficacia de la elongación y la prevención de iniciaciones espurias de la transcripción [28].

En resumen, la metilación del ADN es una modificación prevalente que se encuentra en los promotores y potenciadores de genes inactivos, en elementos repetitivos y dentro de los cuerpos génicos de los genes activos. Su presencia en los promotores influye directamente en los patrones de expresión génica y en la identidad celular [32].

1.5. Alteraciones epigenéticas en cáncer

La transición de las células normales en células cancerosas implica una serie de modificaciones en los patrones de expresión génica o en la actividad funcional de algunas proteínas [16]. La amplificación de proto-oncogenes o el silenciamiento de GST modifica el balance que normalmente controla la proliferación celular, repercutiendo en la desregulación del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación. A lo largo de este proceso, hay etapas intermedias en las que la célula va adquiriendo algunos de los atributos de una célula cancerosa, reflejándose en la formación de lesiones histopatológicas premalignas que en ocasiones se observan previo al cáncer invasivo [15]. Se ha señalado ampliamente que las mutaciones en el ADN son responsables del inicio, la promoción y la progresión del cáncer [16]; sin embargo, la distorsión del paisaje epigenético también favorece la progresión de esta enfermedad [25, 29, 33]. Dentro de las modificaciones epigenéticas, se observan dos cambios respecto a la metilación en el ADN (ver Figura 1.5) que pueden representar un paso temprano y fundamental en la ruta por la cual el tejido normal experimenta una transformación neoplásica [15]: desmetilación

en varias regiones del genoma, a menudo en regiones repetitivas, y metilación *de novo* de ICG normalmente desmetiladas en promotores de genes seleccionados [24, 26, 28, 30].

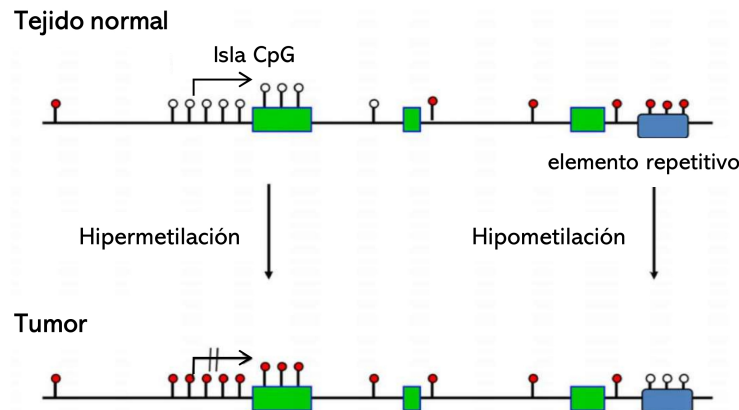


Figura 1.5: Cambios de metilación en el ADN en diversos tipos de cáncer. Estos eventos incluyen la hipermetilación específica de islas CpG, principalmente en los promotores de ciertos genes, conduciéndolos a un estado inactivo. La pérdida de la metilación del ADN (hipometilación) se produce en todo el genoma y, a menudo, se observa en regiones repetitivas. La flecha en ángulo recto indica el sitio de inicio de la transcripción. Los círculos blancos indican sitios CpG no metilados y los círculos rojos muestran sitios CpG metilados. La flecha en ángulo recto con el tache indica la falta permanente de transcripción después de la metilación del ADN. Los cuadros verdes muestran exones y el rectángulo azul marca la posición de un elemento repetitivo. Reproducido de [34]

1.5.1. Hipometilación global del ADN en cáncer

La hipometilación del ADN desempeña un papel significativo en la tumorigénesis. Se ha detectado que el nivel de hipometilación del ADN aumenta conforme la progresión de una lesión, desde una proliferación benigna de células hasta un cáncer invasivo. La pérdida de metilación ocurre en secuencias normalmente metiladas, tales como elementos repetidos de ADN, retrotransposones, promotores pobres en sitios CpG, intrones, desiertos génicos y regiones codificantes de genes tejido-específico y proto-oncogenes. Los principales mecanismos establecidos por los que la hipometilación del ADN pudiera contribuir al desarrollo de cáncer son: generación de inestabilidad genómica que promueve reordenamientos cromosómicos; aumento de la inestabilidad genómica por la activación y translocación de los retrotransposones a otras regiones genómicas, y pérdida de la impronta, como en el caso de

los genes H19 e IGF2, dando como resultado su expresión bialélica patológica [15, 24, 35]. Por otro lado, se han reportado ejemplos esporádicos de proto-oncogenes activados por la desmetilación del promotor que incluyen a: R-Ras en cáncer gástrico, S-100 en cáncer de colon, Hox11 en leucemia o BCL-2 en leucemia linfocítica crónica de células B [36,37]. Estas observaciones demuestran que los proto-oncogenes con expresión tejido-específica o limitada en el desarrollo, es decir, durante el crecimiento temprano, diferenciación o gametogénesis, pueden reexpresarse inapropiadamente en cánceres a través de la desmetilación [37].

1.5.2. Hipermetilación del ADN en cáncer

La hipermetilación focalizada del ADN se observa en la mayoría de los tumores primarios y metastásicos, así como en lesiones premalignas. Cuando esta modificación afecta secuencias reguladoras, tales como regiones potenciadoras o promotoras, generalmente se asocia con una disminución en la expresión o silenciamiento génico. Por otro lado, la hipermetilación de las regiones ricas en sitios CpG en los cuerpos génicos se puede asociar con al menos dos resultados posibles. El primero es el silenciamiento de uno o dos promotores alternativos de un gen, conduciendo a un cambio en la expresión de isoformas específicas. El segundo se asocia con niveles de expresión génica más elevados, donde si este fenómeno ocurre en genes con propiedades oncogénicas puede promover la carcinogénesis mediante su activación. Sin embargo, es más común que la hipermetilación de las ICG ocurra dentro de la región promotora de algunos genes, conduciendo a su silenciamiento [34].

Diferentes líneas de evidencia señalan que la extensa metilación del ADN afecta a muchos GST, favoreciendo la progresión del cáncer [16] puesto que participan en las vías funcionales descritas como “hallmarks” o características del cáncer, como en el control de la proliferación celular, inducción de la apoptosis o la senescencia, en procesos angiogénicos, etc. [24, 34]. Además de la inactivación directa de los GST, la hipermetilación del ADN puede inhibir indirectamente la expresión de ciertos genes mediante el silenciamiento de sus factores de transcripción. Por ejemplo, la hipermetilación en los promotores de los factores de transcripción RUNX3 en cáncer de esófago, así como GATA-4 y GATA-5 en cánceres

colorrectales y gástricos, conduce a la inactivación de sus genes blanco [24].

Dado que la metilación del ADN interviene en la regulación epigenética, resultan de importancia los mecanismos de interacción entre la metilación y la expresión. Aún no está claro si la metilación del ADN es la causa o la consecuencia de la expresión génica alterada, o cómo se interpreta e influye en la regulación del genoma. Hay varias razones plausibles por las que la metilación del ADN podría causar el silenciamiento o regulación a la baja de los genes. Una de ellas estaría relacionada con una directa interferencia en la unión de los factores de transcripción al ADN metilado [38]. Desde hace tiempo, se especulaba que el impedimento estérico causado por el grupo metilo dentro de la secuencia de reconocimiento de un factor de transcripción podría afectar su afinidad de unión. Recientemente, se demostró que la estructura 3D del ADN juega un papel importante en el reconocimiento proteína-ADN, y que la adición o eliminación de grupos metilo en el surco principal influye en la expresión génica. Asimismo, se ha señalado que los patrones de metilación también pueden ser un determinante parcial de la posición del nucleosoma, puesto que los dinucleótidos CpG metilados dan lugar a interacciones electrostáticas más fuertes con las histonas, lo que aumenta la estabilidad del posicionamiento de los nucleosomas [39]. Otra razón sería que la metilación del ADN genera la atracción de proteínas de la familia con dominio de unión a ADN metilado (MBD) [25,29]. Varios miembros de esta familia contienen un dominio de represión transcripcional (TRD) que media las interacciones con varias moléculas co-represoras (p. ej. sin3A) y con desacetilasas de histonas (p. ej. HDAC1) y metilasas de histonas asociadas con la represión. Las proteínas MBD se unen principalmente a los dinucleótidos CpG metilados y actúan como traductores de la metilación del ADN. Esto lo llevan a cabo mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina, lo que ocasiona la desacetilación de histonas y la compactación del ADN, volviéndolo menos accesible y evitando la transcripción activa [15, 40].

Un escenario opuesto implica que la metilación del ADN no es una causa, sino una consecuencia de la represión y sirve para fijar el estado reprimido de la cromatina. Algunas modificaciones en la cromatina reducen la accesibilidad de los factores de transcripción y la

maquinaria transcripcional a los promotores, lo que conduce a la represión génica. En este caso, la metilación de los CpG se acumularía pasivamente como consecuencia de la falta de unión de factores de transcripción, o aparecería como resultado del reclutamiento directo de las DNMT por proteínas represivas de la transcripción, como la proteína EZH2 del grupo Polycomb [38].

1.5.3. Modificaciones de histonas en células cancerosas

Las histonas, además de empaquetar el ADN, son estructuras moleculares clave en la regulación de la expresión génica. Todas las histonas están sujetas a modificaciones covalentes post-transcripcionales, las cuales ocurren en diferentes proteínas, variantes y residuos. Estas modificaciones también involucran diferentes grupos químicos, por ejemplo, metilos, acetilos y fosfatos; así como diferentes grados de metilación (mono-, di- y tri-metilación) [28]. La acetilación y la metilación de las histonas tienen un efecto directo en varios procesos nucleares, incluyendo la transcripción, reparación del ADN, replicación del ADN y la organización de los cromosomas. Generalmente, la acetilación de histonas está asociada a la activación transcripcional, pero el efecto de la metilación depende en qué tipo de aminoácido ocurre y de su posición en la cola de la histona [24]. Además, es la combinación de todas las marcas en un nucleosoma o región y el “crosstalk” entre estas marcas lo que especifica el resultado en la expresión transcripcional [28].

Se ha señalado que la metilación del ADN está íntimamente ligada al silenciamiento transcripcional, a través de modificaciones represivas de histonas. Durante la tumorigénesis, hay una ganancia de metilación en la lisina 20 de la histona H4 (H4K20) y en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), mientras que hay pérdida de metilación en la lisina 4 en la H3 (H3K4). También hay una pérdida global de acetilación de lisinas en las histonas H3 y H4, mediada por las HDAC [15, 19, 24, 28, 29]. Como se mencionó anteriormente, todos los jugadores epigenéticos intervienen para modular la expresión. Un ejemplo es la interacción entre la ADN-metiltransferasa DNMT3L, catalíticamente inactiva, con las colas de histonas H3, induciendo la metilación *de novo* del ADN por medio del reclutamiento de DNMT3A; sin

embargo, esta interacción puede ser fuertemente inhibida por la metilación de H3K4. Por otro lado, varias metilasas de histonas (HMT) dirigen la metilación del ADN mediante el reclutamiento de las DNMT, ayudando a establecer el estado silenciado inducido por las marcas represivas de histonas. Las HMT y desmetilasas de histonas (HDM) también pueden modular la estabilidad de las DNMT, así como la metilación del ADN puede dirigir modificaciones de histonas, por ejemplo, el ADN metilado media la metilación de H3K9 a través del reclutamiento de MeCP2 [28].

Las modificaciones de histonas pueden inhibir la actividad de la transcripción génica bloqueando la interacción entre un factor de transcripción y su sitio de unión, o mediante el reclutamiento de proteínas represoras capaces de leer los cambios de histonas [16]. La presencia de patrones alterados en estas modificaciones, en conjunto con la metilación del ADN, conducen a que la cromatina adquiera una arquitectura cerrada, así como a la exclusión directa de la maquinaria de transcripción del promotor metilado, induciendo el silenciamiento transcripcional de varios GST [15, 19, 28].

Resulta importante señalar que las alteraciones genéticas también pueden repercutir en cambios dentro del escenario epigenético de una célula cancerosa. Ejemplo de ello es la formación de proteínas de fusión aberrantes, a través de translocaciones cromosómicas que involucran genes modificadores de histonas, tales como las HDAC, así como las HMT y las HDM. La focalización equivocada de tales proteínas de fusión perjudiciales contribuye a alteraciones globales en los patrones de acetilación y metilación de histonas en el cáncer [24, 41]. Las acetiltransferasas de histonas (HAT), que funcionan juntamente con las HDAC para mantener los niveles de acetilación de histonas, también se ven alteradas. Aunado a esto, las HDAC a menudo se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer y, por lo tanto, se han convertido en un objetivo principal para la terapia epigenética [24].

1.6. Modificaciones epigenéticas en cáncer cervical

La infección persistente con VPH de alto riesgo no es suficiente para inmortalizar y transformar a la célula huésped epitelial. Por tanto, se necesita considerar alteraciones epigenéticas adicionales (tanto del genoma viral como del huésped) que permiten a la célula adquirir un fenotipo inmortal y progresar hacia un fenotipo claramente maligno e invasivo [42]. En la Tabla 1.1 se enlistan algunas de las principales alteraciones epigenéticas en el CaCU. La acumulación gradual de estas modificaciones se manifiesta en etapas clínicas bien definidas del CaCU [42].

Varios estudios han señalado que el VPH interfiere con la maquinaria de metilación del ADN celular. Respecto al ADN viral, se ha sugerido que su metilación podría servir como parte de su ciclo viral para ocultarse, o como un mecanismo de defensa de la célula huésped [43]. Respecto al ADN del huésped, se ha observado que el nivel de hipometilación global aumenta gradualmente con el grado y etapa de neoplasia cervical. Además, se ha identificado la hipermetilación de los promotores de varios genes supresores de tumor durante las etapas preinvasivas o invasivas del CaCU [42–44].

1.7. Papel de las oncoproteínas E6 y E7 en la regulación del estado de metilación del ADN

En células positivas para el VPH, éste tiene la capacidad de aumentar la metilación de varios genes celulares y reprimir su transcripción [45]. En específico, se han señalado a las oncoproteínas virales E6 y E7 como responsables de causar estos cambios, dado que interactúan y/o modulan la expresión de muchas proteínas implicadas en la regulación epigenética, incluidas las DNMT, las enzimas modificadoras de histonas y las subunidades de los complejos de remodelación de la cromatina, influyendo así en el programa de transcripción de la célula huésped [12] y contribuyendo a la progresión del CaCU [44].

Tabla 1.1: Principales alteraciones epigenéticas en CaCU

Modificación	Efecto
Relacionada con el VPH:	
Metilación de los CpG en los sitios de unión de E2 [42, 44]	Pérdida del efecto inhibitorio de E2 sobre E6 y E7
Metilación de LCR [42]	Regulación a la baja de la actividad transcripcional de estos promotores virales
Interacción de E6 y/o E7 con DNMT [12, 43–45]	Silenciamiento de varios GST
Interacción de E7 con las HDAC [42, 44, 46]	Contribución a la transformación celular
Interacción de E6 con HMT coactivadoras: CARM1, PRMT1 Y SET7 [47]	Interferencia con la actividad transcripcional de p53
Interacción de E6 con p300/CBP e inhibición de la actividad de las HAT [12, 48]	Contribución a la transformación celular, regulación negativa o interferencia con la actividad transcripcional de p53
Relacionada con el huésped:	
Hipermetilación local de promotores [42–45]	Silenciamiento de GST
Hipometilación global del ADN [42–44]	Inestabilidad genómica/sobreexpresión de oncogenes
Pérdida de la impronta en el loci H19/IGF2 [42, 44]	Progresión del tumor
Hiperfosforilación y acetilación de H3 [44]	Progresión de la carcinogénesis

El mecanismo de interacción entre E6 y la DNMT1 implica la degradación de p53, evitando la formación del complejo represor p53/Sp1. Al liberarse Sp1, éste se une a la región promotora de la DNMT1 y regula positivamente su expresión génica. El incremento de esta enzima repercute en el silenciamiento de diversos genes por hipermetilación del ADN [43]. En concordancia, la depleción de E6 en líneas celulares VPH positivas produce una disminución en los niveles proteicos de la DNMT1, de una manera dependiente de p53 [45].

E7 también puede estimular la expresión de la DNMT1. De manera indirecta, E7 puede formar un complejo con pRb, dando como resultado la liberación de E2F. Como E2F está presente en el sitio de inicio de la transcripción de DNMT1, su liberación activa la expresión de esta enzima, provocando consecuentemente represión génica por hipermetilación del ADN. De manera directa, E7 es capaz de unirse a la DNMT1 utilizando su dominio de dedo de zinc CR3 (región conservada 3). La unión provoca que la enzima exponga su sitio

activo, favoreciendo la unión de E7/DNMT1 al ADN. Al momento de formarse el complejo estable DNMT1/ADN, E7 se disocia del complejo y la enzima induce la metilación del ADN [43,45]. Por ejemplo, la interacción E7/DNMT1 es capaz de metilar al promotor de la ciclina A (CCNA1), dificultando su función antitumoral en la regulación de la apoptosis celular [49]. De la misma forma, se ha identificado a CXCL14 como un objetivo de metilación de E7. Debido a que CXCL14 es un fuerte inhibidor de la angiogénesis, la represión de este gen por E7 favorece la neovascularización y el crecimiento tumoral. La interacción E7/DNMT1 también regula a otro factor intermediario (aún desconocido) que conduce al silenciamiento de E-cadherina, la cual se expresa en la membrana de los queratinocitos. La presencia de E-cadherina, junto con otras señales, estimula la movilización de las células de Langerhans a través del epitelio. Estas últimas detectan, procesan y presentan antígenos extraños virales a otros inmunocitos, lo que estimula al sistema inmune del huésped para eliminar al virus del organismo. En células infectadas por VPH, la disminución en la expresión de E-cadherina causa una disminución de la migración de células de Langerhans y, por lo tanto, una menor tasa de eliminación del virus del epitelio [45].

En contraste, hay algunos estudios que han demostrado la disminución de la metilación en loci específicos. Por ejemplo, E7 es capaz de aumentar la expresión del gen de la serina/treonina quinasa 31 (STK31), que ha sido implicado en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células de cáncer de colon. No obstante, el mecanismo exacto mediante el cual E7 causa la hipometilación del promotor aún no se ha dilucidado [45].

1.8. Interacción de E6 y E7 con las enzimas modificadoras de histonas y los complejos de remodelación de la cromatina

E6 y E7 también tienen como proteínas blanco a enzimas modificadoras de histonas HDAC y HAT [12,42,44]. El balance entre las actividades de estas enzimas juega un papel crítico en la regulación de la expresión génica [50]. E7 interactúa indirectamente con las HDAC1/HDAC2, a través de la proteína Mi2 β . Tanto Mi2 β como las HDAC forman parte del complejo de remodelación de la cromatina NuRD, que tiene la capacidad de modificar la estructura de

la cromatina por medio de la desacetilación de histonas y el reposicionamiento de los nucleosomas dependiente de ATP [51]. NuRD, a su vez contiene a MBD2 o MBD3 como subunidades centrales, y preferentemente remodela y desacetila nucleosomas que contienen ADN metilado [46]. Se ha señalado que E7 está involucrada en la represión de la transcripción del gen *IFN- β* , ya que mediante el reclutamiento de algunas HDAC logra interferir con la función de transactivación del factor de transcripción IRF-1. Lo anterior podría estar implicado en la supresión de una respuesta inmune a la infección viral por VPH. Por otro lado, la interacción entre E7 y las HDAC también puede ocasionar la activación de varios promotores celulares. Por ejemplo, E7 induce la disociación de las HDAC de HIF-1 α y potencia su transcripción, con lo cual el VPH podría contribuir a la angiogénesis tumoral [12].

La oncoproteína E6 interactúa con las HMT coactivadoras: CARM1, PRMT1 y SET7 [47]. En promotores responsivos a p53, se reclutan a CARM1 y PRMT1 mediante su interacción con p53. Estas enzimas catalizan la metilación de histonas, lo que conduce a la activación de genes blanco de p53. E6 se une e inhibe la actividad de CARM1 y PRMT1, disminuyendo la metilación activadora de histonas y suprimiendo la unión de p53 a los promotores, independientemente de su degradación mediada por E6. Esta oncoproteína también inhibe a SET7 que cataliza la mono-metilación de la lisina K4 en la histona H3, así como la mono-metilación de p53 en el residuo K372, lo que aumenta su estabilidad y la protege de la degradación inducida por E6, por lo que la inhibición de SET7 reduce la estabilidad de p53 [12, 47]. Como resultado de la inhibición de la actividad de las HMT mediada por E6, se atenúa la función transactivadora de p53 y se suprime la expresión de sus genes río abajo [47]. Además E6 tiene la capacidad de unirse a la HAT CBP/p300, para regular negativamente o interferir con la actividad transcripcional de p53 [48].

1.9. Metabolismo en cáncer

Durante el proceso de la oncogénesis, las células cancerosas adquieren un conjunto de características biológicas funcionales: señales de crecimiento persistente, evasión de la apoptosis, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, potencial ilimitado de replicación, angiogénesis,

invasión y metástasis [24, 34, 52]. Además de estas características, las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor causan alteraciones en múltiples vías de señalización intracelular que afectan el metabolismo central de las células tumorales y lo reprograman para permitir una mayor supervivencia y crecimiento [53]. Dado lo anterior, se ha señalado que los cambios en el metabolismo celular son una constante en las células transformadas, por lo que deben considerarse como otra característica distintiva y crucial del cáncer [54,55]. Estos cambios deben equilibrar los tres requisitos fundamentales de las células tumorales: aumento de la producción de energía, suficiente biosíntesis macromolecular y mantenimiento del equilibrio redox celular apropiado [53].

El fenotipo metabólico mejor caracterizado en las células tumorales es el efecto Warburg, el cual describe que la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria se desplaza a la generación de ATP a través de la glucólisis aeróbica en el citoplasma [53]. Inicialmente, la mayor conversión de piruvato en lactato bajo condiciones normóxicas en células cancerosas se atribuyó a defectos en la mitocondria. Actualmente se reconoce que las firmas metabólicas de estas células no son una respuesta pasiva a mitocondrias dañadas, sino que son el resultado de la reprogramación adaptativa que proporciona a la célula precursores biosintéticos para favorecer el crecimiento anabólico [55,56]. Cabe mencionar que si bien el metabolismo anabólico se considera una característica distintiva del cáncer, muchos de estos cambios metabólicos también ocurren en las células que proliferan normalmente [56].

El aumento del consumo de glutamina es otro cambio metabólico característico de las células que proliferan rápidamente, el cual se utiliza para tareas como: la síntesis del antioxidante glutatión; el mantenimiento de las reservas celulares de NADPH [56], que funciona como un cofactor y proporciona potencia reductora en muchas reacciones enzimáticas que son cruciales para la biosíntesis macromolecular, y también es un antioxidante que forma parte de la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen durante la proliferación rápida [53]; y las reacciones anapleróticas para reponer intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) [56].

Los avances en la comprensión de cómo la reprogramación del metabolismo celular ayuda al inicio y la progresión del cáncer han llevado a desarrollar medicamentos dirigidos a vías relacionadas con estos cambios en diversas clases de cáncer [56]. Las alteraciones en los metabolitos intracelulares y extracelulares que pueden acompañar a la reprogramación metabólica tienen profundos efectos sobre la expresión génica, la diferenciación celular y el microambiente tumoral [57]. Este microambiente anormal (la hipoxia, el bajo pH y las concentraciones bajas de glucosa) también desempeña un papel importante en la determinación del fenotipo metabólico [53]. Aunado a lo anterior, las señales de crecimiento extrínsecas y la disponibilidad de nutrientes están estrechamente relacionadas con la expresión de los transportadores de membrana, con el fin de favorecer la proliferación [56].

1.10. Transportadores de nutrientes en cáncer

Los transportadores son proteínas que median la translocación de sustratos a través de las membranas biológicas. Se expresan ampliamente en todo el cuerpo y están localizados en la membrana plasmática, así como también en membranas que componen varios organelos subcelulares (mitocondria, retículo endoplasmático, etc.), asegurando así la entrega regulada de los sustratos requeridos y, por lo tanto, la homeostasis celular. Muchos transportadores también se expresan de una manera órgano-específica y facilitan la entrada y eliminación de compuestos endógenos y xenobióticos [22, 58]. De hecho, muchos estudios vinculan el control transcripcional y post-traducciona l de los transportadores de nutrientes con la proliferación y el cambio al metabolismo anabólico, destacando su importancia en el crecimiento fisiológico y patológico [56].

Existen dos principales superfamilias de transportadores: los ATP Binding Cassette (ABC) y los Solute Carrier (SLC). Los transportadores ABC aprovechan la energía de la hidrólisis del ATP y funcionan como transportadores de eflujo. Los transportadores SLC están principalmente involucrados en la captación de pequeñas moléculas en las células, tales como metabolitos y drogas. Los transportadores SLC son predominantemente facilitadores o secundario-activos; es decir, requieren un gradiente electroquímico para promover el

movimiento de sustratos a través de las membranas, o gradientes iónicos generados por bombas dependientes de ATP para transportar sustratos contra el gradiente de concentración [58]. Debido a su papel en el cáncer, actualmente los transportadores están recibiendo mayor atención, y mientras que varios transportadores de nutrientes esenciales actúan como promotores tumorales y son regulados positivamente en esta enfermedad, hay algunos que pueden comportarse como supresores de tumor [22], limitando el crecimiento de células neoplásicas.

Durante mucho tiempo, la única clase de transportadores que estaba recibiendo atención, en relación con el cáncer, eran los transportadores de eflujo de fármacos, debido a su papel en el control de la sensibilidad de las células tumorales a agentes quimioterapéuticos. A menudo, las células cancerosas regulan a la alza estos transportadores, lo que induce el desarrollo de resistencia a los fármacos [22].

Como se mencionó en la sección anterior, las células tumorales, altamente proliferativas, requieren un suministro constante de nutrientes para respaldar su crecimiento. Esto se traduce en una mayor demanda de sustratos del espacio extracelular, tales como: glucosa, lípidos, ácidos nucleicos y aminoácidos no esenciales [56]. En los últimos años, las investigaciones sobre el cáncer se han centrado en los transportadores de membrana plasmática, con un enfoque selectivo en la administración de estos nutrientes a las células tumorales [22]. La lógica de este enfoque es que a través de la inducción de proteínas transportadoras, las células logran satisfacer la elevada demanda de macromoléculas [22, 56]. Debido a que el fenómeno Warburg (glucólisis aeróbica) es una característica común entre las células tumorales, inicialmente la mayor parte de la atención fue dirigida a los transportadores de glucosa. Esto dio como resultado el descubrimiento de que GLUT1 (SLC2A1) está regulado positivamente en casi todos los cánceres, promoviendo el aumento de captación de este metabolito. En ciertos tipos de cáncer, los transportadores de glucosa SGLT1 (SLC5A1) y SGLT2 (SLC5A2) acoplados a Na^+ también están regulados positivamente. Dado que estos transportadores proporcionan un nutriente esencial para las células tumorales, son considerados blancos potenciales para la terapia contra el cáncer [22].

Una consecuencia del cambio en los programas metabólicos pro-proliferativos, incluida la glucólisis, es la mayor producción de ácido láctico [22,56]. Varios tumores muestran acumulación de lactato y expresión alterada de sus transportadores, lo que sugiere un papel de este metabolito en el cáncer [59]. Para combatir la disminución en el pH intracelular, las células regulan positivamente a los transportadores MCT1 y MCT4, también conocidos como SLC16A1 y SLC16A3. Éstos funcionan principalmente en el exporte de lactato y de H⁺, a través de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular, estimulando el crecimiento tumoral. En cambio, el transportador SLC5A8, que tiene una mayor afinidad por el importe de lactato, está silenciado en cáncer [22, 56], como se describe más detalladamente en la sección 1.12.

1.11. SLC5A8 y su silenciamiento en cáncer

Recientemente, el silenciamiento del transportador SLC5A8, también llamado SMCT1, se ha convertido en una característica reconocida de diferentes tipos de cáncer como el de colon, tiroides, mama, próstata o pulmón [22]. SLC5A8 pertenece a la familia SLC5 de cotransportadores de nutrientes acoplados a sodio, también conocida como la familia de genes cotransportadores sodio/glucosa [60, 61]. Exhibe una especificidad de sustrato para una amplia variedad de monocarboxilatos, incluidos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), monocarboxilatos sustituidos (lactato, piruvato, derivados de AGCC tales como γ -hidroxibutirato), nicotinato, salicilatos y benzoato [60, 62–65]. La afinidad del transportador por la mayoría de estos monocarboxilatos es bastante alta, con una constante de Michaelis en el rango de 200-400 μ M [59]. El transporte se produce mediante un proceso electrogénico, con una estequiometría variable según el sustrato [59, 64]. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno, el ketoprofeno y el fenoprofeno también interactúan con SLC5A8, aunque estas drogas no son sustratos transportables, sino que actúan como bloqueadores del transportador [65].

Se ha reportado que SLC5A8 se expresa en la mucosa normal del colon, riñón, cerebro, retina,

pulmón, esófago, intestino delgado, estómago, tiroides y útero [61, 63–67]. La secuencia de aminoácidos de Slc5a8 de ratón, que es idéntica en un 95 % al SLC5A8 humano, predice 13 dominios transmembranales, un extremo C-terminal citosólico y un extremo N-terminal exoplasmático. Además tiene dos sitios putativos de N-glicosilación situados entre los dominios transmembranales 12 y 13 [64].

1.12. Rol de SLC5A8 como supresor de tumores

Existe evidencia que identifica el silenciamiento de SLC5A8 como un paso importante en la neoplasia de colon [22]. En un colon normal, se producen cantidades elevadas de AGCC (acetato, propionato y butirato) como resultado de la fermentación bacteriana anaeróbica de los carbohidratos no absorbidos y la fibra dietética [64]. El butirato y el propionato son reconocidos inhibidores de las HDAC, particularmente de las isoformas HDAC1 y HDAC3 [22, 62, 65, 68, 69]. Dependiendo del contexto celular, la entrada de butirato y propionato mediada por SLC5A8 es capaz de inducir selectivamente la diferenciación en células epiteliales de colon normales, o prevenir la proliferación celular y causar apoptosis en células cancerosas [22, 62, 64, 68, 69]. Por lo tanto, se ha reconocido que el transporte de estos AGCC desde el lumen del colon es responsable de los efectos antiproliferativos de SLC5A8 [60], cuya expresión reduce la incidencia de cáncer de colon [64]. De hecho, ha sido reconocido como un gen supresor de tumores en este tipo de cáncer [66]. Más recientemente, se ha documentado que el silenciamiento transcripcional de SLC5A8 es frecuentemente causado por la metilación aberrante del ADN y que la restauración de su expresión conduce a la inhibición de la proliferación celular [66, 68]. Por otro lado, los cambios en la expresión génica inducidos por el transporte de butirato mediante SLC5A8 incluyen la regulación positiva de genes pro-apoptóticos, y la regulación negativa de genes anti-apoptóticos en células de cáncer de colon [68].

No obstante, SLC5A8 se inactiva en cánceres de otros tejidos además del cáncer de colon, en los que el butirato y el propionato no son fisiológicamente significativos [62, 67]. Lo anterior condujo al descubrimiento de que el piruvato, un metabolito ubicuo y sustrato de alta

afinidad de SLC5A8, actúa también como un fuerte inhibidor de las HDAC y un inductor apoptótico de manera específica en células tumorales, con una selectividad comparable a la del butirato. El piruvato está presente en circulación a una concentración aproximada de 100 μM , y es probable que el silenciamiento de la expresión del transportador disminuya la entrada de piruvato a la células cancerosas [70].

El silenciamiento de la expresión de SLC5A8 puede estar relacionado al efecto Warburg [22]. Una característica de este efecto es la elevada producción de lactato, el cual es otro de los sustratos del transportador, considerado como un metabolito promotor de tumores [62, 71, 72] con propiedades angiogénicas, capaz de promover la migración y el crecimiento de las células cancerosas [59], sin actividad como inhibidor de las HDAC [62, 71, 72]. Pero la acumulación de lactato producido en la glucólisis y la acidificación del medio intracelular pueden tener consecuencias perjudiciales para las células cancerosas. Para reducir el estrés causado por la producción acelerada de lactato, los transportadores que dirigen el flujo de salida de este metabolito son regulados positivamente (MCT1, MCT4); al mismo tiempo, la regulación negativa de SLC5A8, el cual media su flujo de entrada, es un mecanismo para contrarrestar el exceso de lactato y acidez en las células cancerosas, y al mismo tiempo evitar el importe activo de los monocarboxilatos inhibidores de las HDAC. Por tanto, resulta evidente por qué este transportador está reprimido en muchos tumores y por qué las células tumorales convierten efectivamente al piruvato en lactato [62, 71, 72]. Aunado a lo anterior, se ha reportado que independientemente de la función transportadora de SLC5A8, éste es capaz de inducir apoptosis a través de un mecanismo que implica una disminución de la proteína anti-apoptótica survivina [70].

1.13. Terapia epigenética contra el cáncer

A diferencia de las mutaciones, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas son reversibles. Por tanto, existe un creciente énfasis en el uso de agentes epigenéticos para reprogramar las células neoplásicas hacia un estado normal, mediante la restauración de la expresión de los genes afectados por estos mecanismos [18]. Dado lo anterior, los genes

supresores de tumor silenciados por hipermetilación del ADN pueden ser reexpresados con fármacos que actúan como agentes desmetilantes del ADN. Por otro lado, los inhibidores de desacetilasas de histonas que promueven un estado relajado de la cromatina, pueden inducir selectivamente diferenciación, arresto del ciclo celular y apoptosis *in vitro*. En pruebas clínicas, los inhibidores de las HDAC están asociados a una menor incidencia de efectos adversos, aunque su eficacia en el tratamiento de tumores es limitada [73]. Los avances en la comprensión de la regulación del epigenoma están llevando al desarrollo y ensayo clínico de varios fármacos, que durante la próxima década serán utilizados como terapia epigenética, en combinación con otras terapias, como una herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer [18].

Justificación

A pesar de que el CaCU se puede prevenir frecuentemente mediante la detección y tratamiento de lesiones premalignas, éste sigue siendo un importante problema de salud pública. Sus tasas de incidencia y mortalidad, principalmente en países en desarrollo, destacan la necesidad de obtener una mejor comprensión de su biología molecular. Aunque la infección con VPH de alto riesgo es una causa necesaria, ésta no es suficiente para el desarrollo del CaCU. Adicionalmente, hay otros factores, como múltiples alteraciones genéticas y una significativa contribución de modificaciones epigenéticas, que facilitan la transformación neoplásica. Por otro lado, se ha incrementado el interés en los transportadores celulares, los cuales, en su mayoría, son regulados positivamente en células transformadas para aumentar la captación de nutrientes y beneficiar su alta tasa replicativa. Ocurre lo contrario con el transportador SLC5A8, el cual en varios tipos de cáncer se ha descrito que se encuentra silenciado y que su regulación negativa podría estar favoreciendo la progresión de esta enfermedad. Dado lo anterior, y tomando en cuenta la naturaleza reversible de las alteraciones epigenéticas y el potencial terapéutico que podrían tener en el CaCU, consideramos importante determinar el comportamiento de la expresión de SLC5A8 en líneas celulares y tejidos neoplásicos de CaCU, así como analizar si intervienen mecanismos epigenéticos en su regulación y establecer su posible rol como gen supresor de tumores.

Hipótesis

La transcripción del gen SLC5A8 es reprimida epigenéticamente por metilación del ADN en cáncer cervicouterino, lo que sugiere que podría jugar un rol como gen supresor de tumores en esta enfermedad.

Objetivos

4.1. Objetivo general

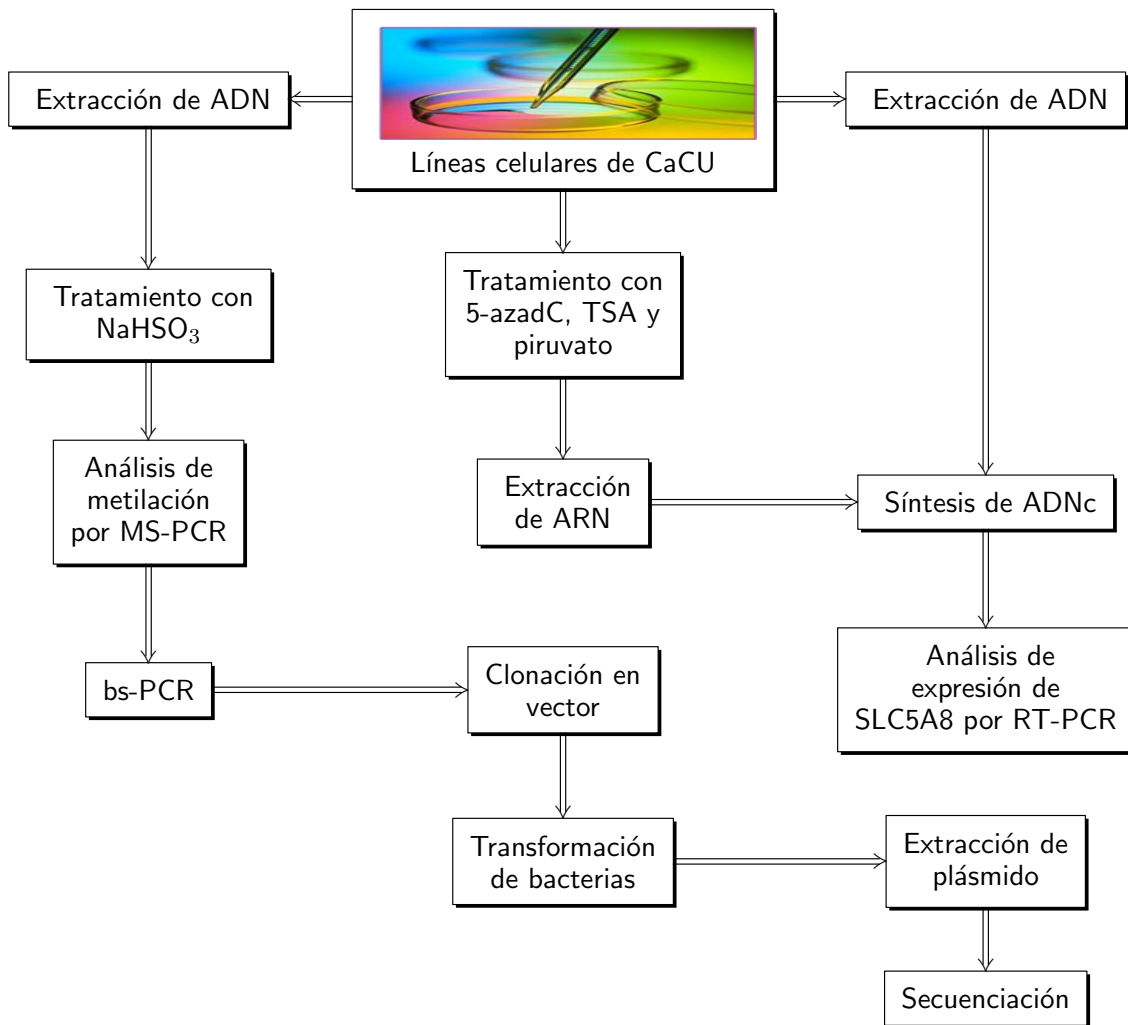
Caracterizar la expresión de SLC5A8 y el estado de metilación de la región promotora de este gen en líneas celulares y tejidos de CaCU, además de analizar su reexpresión mediante fármacos epigenéticos y su posible rol como supresor de tumores.

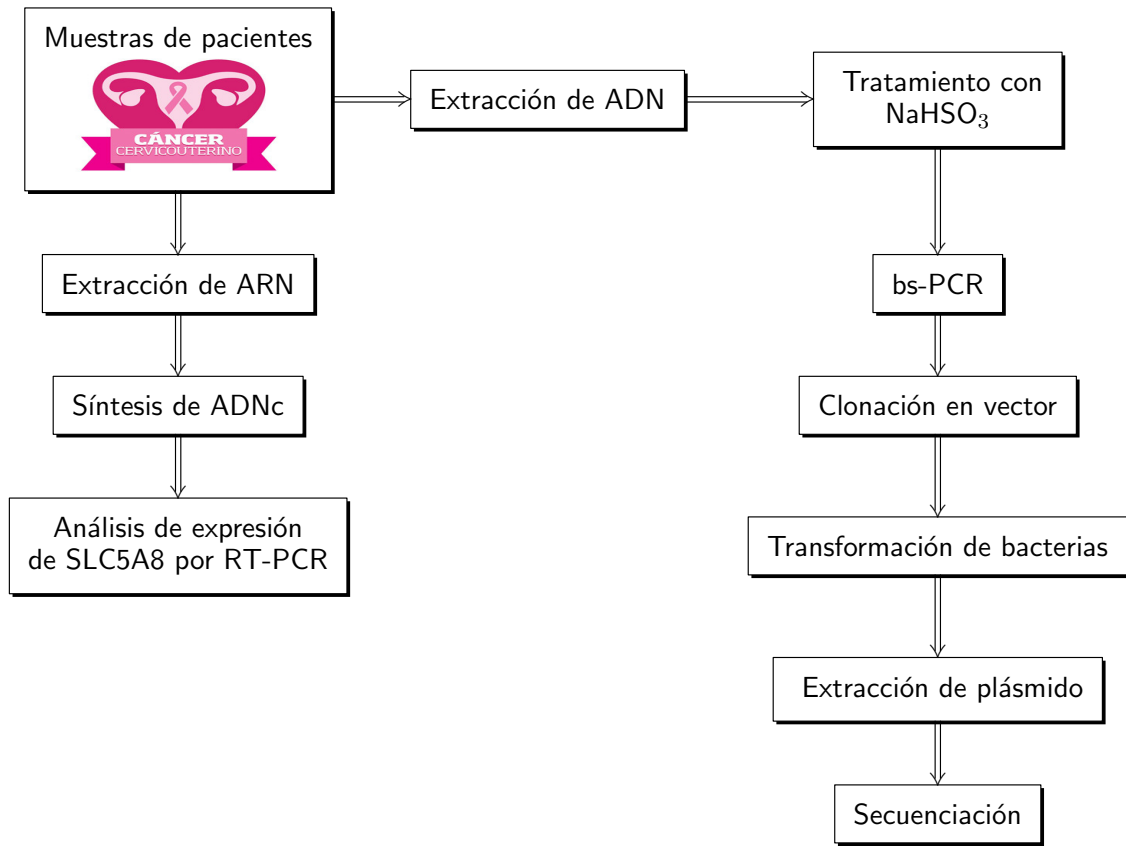
4.2. Objetivos específicos

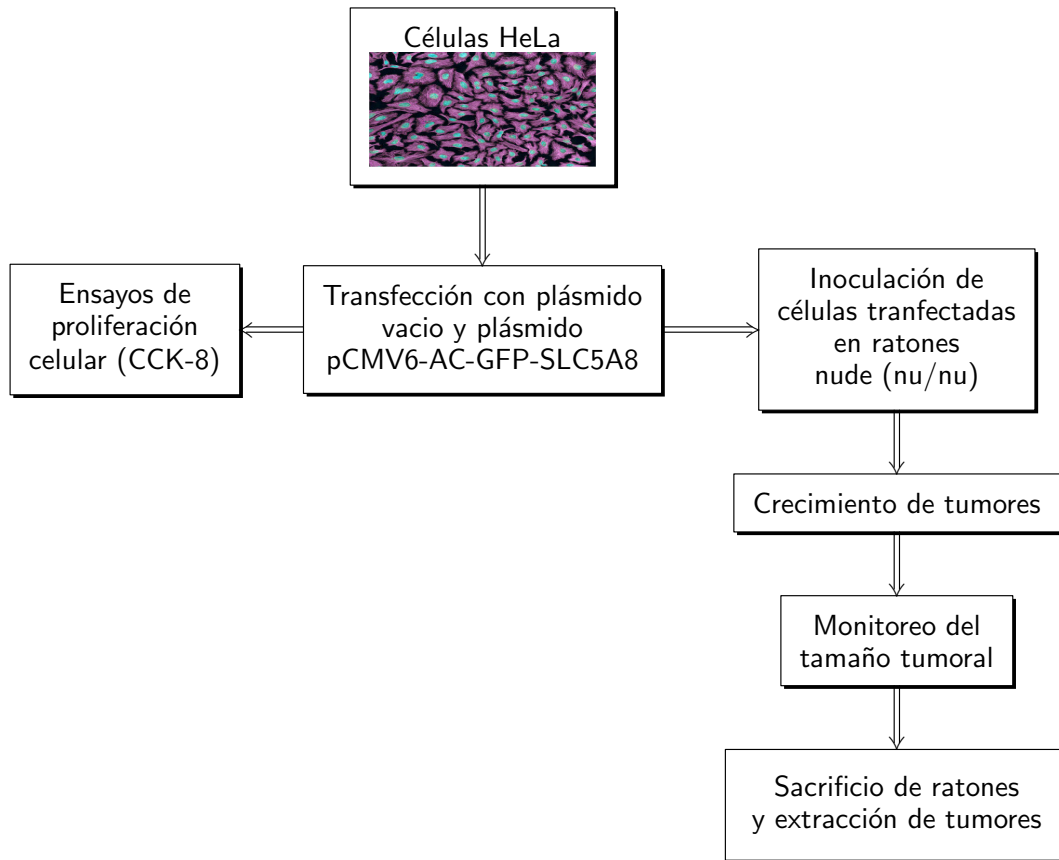
- Determinar la expresión de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU y en tejido normal de cérvix.
- Analizar la presencia de metilación en SLC5A8 en líneas celulares de CaCU y en tejido normal de cérvix, mediante la modificación del ADN con bisulfito y PCR metilo-específica (MS-PCR).
- Establecer el perfil de metilación de la ICG de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU y en tejido cervical, mediante la modificación del ADN con bisulfito y secuenciación alelo-específica.
- Analizar la expresión de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU expuestas a los modificadores epigenéticos 5-aza-2'-desoxicitidina y TSA, por separado o combinados, así como en presencia o ausencia de piruvato en el medio de cultivo.

- Determinar la expresión de SLC5A8 y establecer el perfil de metilación de la ICG de SLC5A8 en muestras de CaCU, mediante la modificación del ADN con bisulfito y secuenciación alelo-específica.
- Analizar el efecto de la expresión de SLC5A8 en la proliferación celular, mediante la transfección estable de células HeLa con el vector pCMV6-AC-GFP que lleva insertado el marco abierto de lectura de SLC5A8; así como el efecto en el crecimiento tumoral mediante xenotrasplantes de estas células en ratones desnudos.

Estrategia experimental







Materiales y Métodos

6.1. Materiales

6.1.1. Líneas celulares

Se usaron cinco líneas celulares de CaCU para los ensayos de expresión de SLC5A8, el análisis de metilación del ADN y el tratamiento con fármacos epigenéticos. De las cinco líneas, cuatro son VPH positivas (HeLa y Calo contienen VPH18, mientras que SiHa y CaSki contienen VPH16) y una es VPH negativa (C-33A). La línea celular derivada de células de riñón de embrión humano, HEK293, se usó como control positivo de expresión de SLC5A8, así como referencia de la secuencia de ADN desmetilada del transportador. La línea celular de cáncer colorrectal HCT116 se utilizó como control negativo de expresión de SLC5A8 y como referencia de la secuencia de ADN altamente metilada del transportador.

6.1.2. Muestras de tejidos cervicales humanos

Se obtuvieron muestras de tejido cervical de pacientes con CaCU (n=29), bajo los protocolos del banco de tumores cervicales (abril de 2010 a agosto de 2012). Las muestras fueron obtenidas bajo la aprobación de los Comités Institucionales de Ética y el Consejo Científico del Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan). Los tejidos provienen de mujeres de entre 20 y 60 años, diagnosticadas con cáncer primario, quienes firmaron y aceptaron un formulario de consentimiento informado. De inicio se realizó la caracterización clínica de

los tejidos, mediante el diagnóstico histológico y la determinación del tipo de VPH presente y estadio de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). Los criterios de elegibilidad de las muestras fueron: pacientes con diagnóstico patológico confirmado de CaCU en estadio IB2-IIIB; biopsias con más del 80 % de células tumorales y casos sin tratamiento oncológico previo. Los tejidos tumorales se obtuvieron a partir de biopsias por perforación (cilindros de 3-5 mm de diámetro). Cada biopsia se dividió en tres secciones: una para confirmación patológica, una para la extracción de ARN y otra para el aislamiento del ADN. Las biopsias de ARN y ADN se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C hasta su posterior procesamiento. Adicionalmente, se obtuvieron muestras de tejidos cervicales no tumorales ($n=6$) como controles.

6.2. Métodos

6.2.1. Cultivo celular

Todas las líneas celulares (HeLa, Calo, SiHa, CaSki, C-33A, HEK293 y HCT116) se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, Grand Rapids, NY, EE. UU.), complementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v) y con antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina) al 1 % (v/v). Las células se mantuvieron en una incubadora de atmósfera húmeda, con un contenido de CO_2 al 5 %, a una temperatura de 37°C . Periódicamente se realizaron resiembras al alcanzar el 80 % de confluencia celular.

6.2.2. Extracción de ARN

El ARN total se extrajo con TRIzol Reagent (Ambion, Austin, TX, EE. UU.), el cual es una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que disuelve los componentes celulares y mantiene la integridad del ARN durante la lisis de las muestras. La extracción se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante, basado en el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) [74]. A cada caja de cultivo p60 se adicionó $1000\ \mu\text{l}$ de TRIzol y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se transfirió el contenido a un tubo de microcentrífuga, se agregó $200\ \mu\text{l}$ de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura

ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C, recuperándose la fase superior en un tubo nuevo. Después se añadió 500 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al término se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se agregó 1000 μ l de EtOH al 75 % (en agua tratada con DEPC) para lavar la pastilla de ARN. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente, el ARN se solubilizó en agua tratada con DEPC (20 μ l). Algunos de los tejidos congelados fueron macerados usando un mortero y pistilo precongelados con nitrógeno. Durante la maceración, el tejido se mantuvo en congelación agregando nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Una vez pulverizado el tejido, se realizó la extracción de ARN con TRIzol, como se describió anteriormente.

Todas las muestras se sometieron al tratamiento con DNAsa I, libre de RNAsas (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) para eliminar el ADN genómico. La concentración y pureza del ARN se determinó por espectrometría, midiendo la absorbancia a 260 nm y las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, con un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). Además, se utilizó 1.5 μ g de ARN para realizar electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, a 80 V durante 30 min. Mediante la resolución de las bandas ribosómicas 28S y 18S se verificó la integridad del ARN. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso posterior.

6.2.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADN complementario se realizó en frío, adicionando en cada tubo de microcentrífuga 0.4-2 μ g de ARN como cadena molde, 0.5 μ l de oligo dT (100 μ M), 0.5 μ l de hexámeros aleatorios (100 μ M) y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen a 12 μ l. La reacción se mezcló suavemente, se centrifugó brevemente y se incubó a 65 °C durante 5 min. Al término, el tubo se regresó al hielo, se centrifugó por corto tiempo a temperatura ambiente y se colocó nuevamente en hielo. Posteriormente se agregaron 4 μ l de buffer 5X, 1 μ l de inhibidor de RNAsas RiboLock (20 U/ μ l), 2 μ l de

mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 μ l de transcriptasa reversa M-MuLV (200 U/ μ l) (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). La reacción se mezcló suavemente, se centrifugó y se incubó a 45 °C durante 60 min. Para finalizar, la reacción se calentó a 70 °C por 5 min. En un tubo extra se preparó un control negativo que consistió en añadir todos los reactivos para la transcripción reversa, excepto la cadena molde de ARN, siguiendo el mismo protocolo de síntesis. Posteriormente, se realizó la amplificación de un gen constitutivo (ver sección 6.2.4) para corroborar la funcionalidad del ADN complementario.

6.2.4. RT-PCR

Se analizó la expresión de los genes β -2 microglobulina (β 2M) y SLC5A8 mediante RT-PCR semicuantitativa en las líneas celulares de CaCU, así como en los tejidos cervicales normales y tumorales, utilizando el termociclador Axygen MaxyGene (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). La secuencia de los primers utilizados se muestra en la Tabla 6.1.

Primero se evaluó la expresión de un fragmento de 100 pb de β 2M como referencia, así como para excluir la degradación del ARN o una ineficaz síntesis de ADN complementario. Una vez confirmada la expresión del gen constitutivo, se valoró la expresión de un fragmento de 229 pb de SLC5A8, abarcando desde la porción terminal del exón 1 y parte del exón 2. Para cada reacción de PCR se agregaron: 100 ng de ADN complementario, 2.5 μ l de buffer de reacción 10X, 0.5 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0.5 μ l de primer forward 10 μ M y 0.5 μ l del primer reverse 10 μ M, 0.1 μ l de ADN polimerasa Platinum Taq (5 U/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y cantidad suficiente de H₂O libre de DNAsas para ajustar el volumen a 25 μ l. En cada experimento se utilizó como control negativo una reacción extra con todos los reactivos, excepto por el ADN complementario. Las condiciones de amplificación se pueden consultar en la Tabla 6.2.

El análisis de RT-PCR para evaluar la expresión de SLC5A8 y β 2M en las muestras de tejido se realizó bajo las mismas condiciones. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % mediante tinción con bromuro de etidio. Las imágenes

nes se adquirieron con el software GeneSnap versión 7.02 (Syngene-Synoptics, Cambridge, Reino Unido) y las intensidades de las bandas se midieron con el software ImageJ (ImageJ 1.46, National Institutes of Health, EE. UU.). Las muestras que no expresaron SLC5A8 se establecieron como referencia negativa. La relación de SLC5A8 / β 2M se determinó para cada muestra, con valores que oscilan entre 0 y 1. La clasificación de la expresión de SLC5A8 se basó en los siguientes valores: 0= nulo, ≤ 0.25 = bajo, ≤ 0.5 = medio y ≤ 1 = alto.

6.2.5. Extracción de ADN de líneas celulares de CaCU

El ADN genómico de líneas celulares se aisló usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI, EE. UU.). De acuerdo con el protocolo del fabricante, las células se cosecharon con PBS, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se disgregaron con 600 μ l de solución fría de lisis nuclear. Cada muestra se incubó con 3 μ l de solución de RNAsas (4 mg/ml), durante 30 min a 37 °C. Después, la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se añadió 200 μ l de solución para precipitación de proteínas y se agitó vigorosamente por 20 s. El tubo se colocó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 16000 \times g durante 4 min, con lo cual se logró que precipitaran las proteínas, manteniéndose el ADN genómico en solución. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con 600 μ l de isopropanol, se mezcló y se centrifugó para precipitar el ADN, formándose una pastilla. El sobrenadante fue removido y la pastilla de ADN se lavó con 600 μ l de etanol al 70 %, después se centrifugó a 16000 \times g por 2 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aproximadamente durante 15 min. Una vez seca la pastilla, se añadió 100 μ l de agua libre de DNAsas y se dejó incubando toda una noche a 4 °C. Finalmente, el ADN se solubilizó mediante pipeteo suave y se almacenó a -20 °C. La concentración e integridad del ADN se evaluaron mediante mediciones de absorbancia y electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, para garantizar la ausencia de impurezas, puesto que éstas podrían inhibir la posterior modificación con bisulfito de sodio (ver sección 6.2.7).

6.2.6. Extracción de ADN de muestras de pacientes y genotipificación de VPH

El ADN de las biopsias de CaCU se obtuvo con el equipo de extracción automatizada de ácidos nucleicos MagNA Pure 96, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La detección y genotipificación de VPH se realizó mediante la prueba Roche Linear Array HPV Genotyping (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), así como mediante una PCR múltiple anidada MY/GP y la subsecuente secuenciación directa del fragmento de PCR [75].

6.2.7. Modificación del ADN con bisulfito de sodio

El ADN genómico fue modificado con bisulfito de sodio para identificar marcas de metilación en una secuencia dada, usando el kit de EZ DNA Methylation (Zymo Research Corporation, Orange, CA, EE. UU.). Esta técnica tiene la finalidad de convertir selectivamente las citosinas no metiladas en uracilo por desaminación, dejando las citosinas metiladas sin modificar. En un tubo de microcentrífuga se mezclaron por pipeteo 100-500 ng de ADN, 5 μ l de buffer de dilución y cantidad suficiente de agua para ajustar el volumen a 50 μ l. La solución se incubó a 37 °C durante 15 min. Después se añadió 100 μ l del reactivo de conversión CT, el cual contiene bisulfito de sodio para desaminar los residuos de citosinas del ADN, y se incubó a 50 °C durante 16 h. Al término, la reacción se incubó en hielo durante 10 min y se vertió en una columna precargada con 400 μ l de buffer de unión para equilibrar la columna, reducir la degradación del ADN y minimizar la pérdida de ADN durante la limpieza. Se centrifugó a 15000 x g durante 1 min. El sobrenadante fue desechado, se añadió 100 μ l de buffer de lavado y se volvió a centrifugar a 15000 x g por 1 min. Luego, se adicionó 200 μ l de buffer de desulfonación para eliminar la fracción de sulfito y generar uracilos; se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y al término se centrifugó a 15000 x g por 1 min. Se agregó 200 μ l de buffer de lavado, se centrifugó a 15000 x g por 1 min y se repitió el lavado. La columna se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 15 μ l de buffer de elución a la matriz de la columna, se incubó por 5 min y se centrifugó a 15000 x g por 1 min. El ADN eluido se mantuvo a -20 °C hasta su uso posterior en los ensayos de PCR específica

de metilación (sección 6.2.8) o ensayos de PCR con ADN modificado por bisulfito (sección 6.2.9) para secuenciación, utilizando las diferencias derivadas de las conversiones C a U, en las que el uracilo se replica como timina [76,77].

6.2.8. PCR metilo-específica (MS-PCR)

Se usó el ensayo de MS-PCR como una estrategia rápida para identificar la presencia de metilación en el gen de SLC5A8. Inicialmente se introdujo la secuencia genómica del transportador en el software Methprimer (www.urogene.org/methprimer) y EMBOSS CpGplot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) para ubicar la ICG. Esta se definió bajo los criterios de una secuencia con un contenido de citosinas y guaninas mayor al 50 %, y una presencia del dinucleótido CpG mayor a 60 %. Con base en estos criterios, el software identificó una ICG en la región del primer exón y arrojó algunas opciones de primers para analizar un fragmento de la isla. Se seleccionaron dos pares de primers específicos para la amplificación de la secuencia metilada (M-SLC5A8) o no metilada (U-SLC5A8) (ver Tabla 6.1). Posteriormente, se realizaron PCR independientes con cada conjunto de primers. Para cada reacción se adicionaron: 50 ng de ADN modificado con bisulfito, 2.5 μ l de buffer de reacción 10X, 0.5 μ l de cada primer 10 μ M, 0.5 μ l de dNTPs 10 mM, 2 mM de $MgCl_2$ y 0.2 μ l de ADN polimerasa Platinum Taq (5 U/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de amplificación se pueden consultar en la Tabla 6.2. Adicionalmente, se incluyeron reacciones con ADN modificado por bisulfito de las líneas celulares HCT116 y HEK293 como referencia de la secuencia de SLC5A8 metilada y desmetilada, respectivamente. Después de la amplificación, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8 %, utilizando para la visualización tinción con bromuro de etidio.

6.2.9. PCR con ADN modificado por bisulfito (bs-PCR)

Se seleccionó una región de 379 pb dentro de la ICG de SLC5A8 para determinar la presencia y densidad de metilación en los 45 sitios CpG de la secuencia interrogada. Mediante una PCR convencional, a partir de ADN modificado por bisulfito (bs-PCR) se amplificó la región de interés denominada como bs-SLC5A8. Los primers utilizados se pueden consultar en la

Tabla **6.1**. Para cada reacción se utilizó 1.5 μl de ADN modificado por bisulfito como cadena molde, 2.5 μl de buffer 10X, 0.5 μl de dNTPs 10 mM, 1 μl de MgCl_2 50 mM, 0.5 μl de primer forward 10 μM y 0.5 μl del primer reverse 10 μM , 0.2 μl de polimerasa Taq (Invitrogen) y 18.3 μl de agua destilada estéril. Como controles negativos se prepararon reacciones extras con los mismos reactivos, pero sin añadir ADN. Las condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla **6.2**. La mitad del volumen de la reacción de bs-PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. El resto del volumen de aquellas reacciones que amplificaron exitosamente el fragmento de 379 pb se purificó con el kit QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), eliminando así los residuos que podrían interferir en la reacción de ligación posterior. Finalmente, el ADN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm.

Esta técnica es el primer paso para poder realizar el mapeo de metilaciones alelo-específicas de la ICG de SLC5A8. Las técnicas descritas en las secciones 6.2.10 a 6.2.14 indican cómo se realizó el proceso hasta llegar a la secuenciación.

6.2.10. Clonación del producto de bs-PCR en el vector pJet1.2

Los productos purificados de la bs-PCR se insertaron en el vector pJet1.2 usando el kit de clonación PCR CloneJET (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). Para la reacción de ligación, en un tubo de microcentrífuga en hielo se añadieron: 10 μl de buffer 2X, 0.15 pmol de producto de PCR purificado, cantidad suficiente de agua para ajustar el volumen a 17 μl y 1 μl de DNA blunting enzyme. Se agitó con vórtex brevemente y se centrifugó por 10 s. Se incubó la reacción a 70 °C durante 5 min y se enfrió en hielo. Luego se agregó 1 μl del vector pJET1.2 (50 ng/ μl) y 1 μl de T4 DNA Ligase (5 U/ μl). Se agitó con vórtex brevemente, se centrifugó por 10 s y se incubó la reacción a temperatura ambiente (22 °C) durante 5 min. La reacción de ligación se utilizó inmediatamente para la transformación en bacterias competentes.

6.2.11. Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α

En un ambiente estéril, frente al mechero, se realizó la transformación de bacterias competentes mediante la adición de 10 μ l de reacción de ligación a 100 μ l de bacterias competentes *E. coli* DH5 α recién descongeladas. La reacción se incubó 45 min en hielo y 5 min a 42 °C, luego se regresó al hielo. Se añadió 650 μ l de medio LB y se incubó a 37 °C, en agitación constante, durante 1 h. Al término se centrifugó a 1500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y el remanente del medio LB se utilizó para resuspender la pastilla de bacterias e inocular una placa de agar LB con ampicilina, como medio de selección. Posteriormente, la placa se incubó a 37 °C toda la noche. Como control negativo se inocularon bacterias competentes sin transformar en una placa de agar LB con ampicilina.

6.2.12. Confirmación de presencia de bs-SLC5A8 en bacterias *E. coli* DH5 α

Varias colonias (por muestra) fueron seleccionadas aleatoriamente y sembradas en placas LB con ampicilina. Con la finalidad de comprobar si éstas contenían el fragmento de interés, se realizó una PCR convencional similar a la descrita en la sección 6.2.4; aunque en este caso, el material genético se obtuvo al añadir una fracción de la colonia seleccionada usando una punta estéril de micropipeta. Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se escogieron aquellas colonias que amplificaron exitosamente la banda de bs-SLC5A8.

6.2.13. Extracción de plásmido

Esta técnica se utilizó para obtener suficiente cantidad de ADN plasmídico para secuenciación. Cada colonia seleccionada fue inoculada en 5 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina. El cultivo se dejó crecer toda una noche a 37 °C. Después se centrifugó el cultivo a 12000 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente, para precipitar las bacterias y eliminar el sobrenadante. Enseguida se extrajeron los plásmidos con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). De acuerdo al protocolo del fabricante, cada pastilla de bacterias se resuspendió en 250 μ l de buffer P1, y luego se transfirió a un tubo de micro-

centrífuga. Se añadió 250 μl de buffer P2 y se mezcló por inversión. Antes de transcurrir más de 5 min, se agregó 350 μl de buffer N3 y se mezcló inmediatamente por inversión. El tubo se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y el sobrenadante se agregó, por decantación, a la columna de centrifugación QIAprep 2.0, colocada dentro de un tubo colector. Se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm, y se desechó el fluido obtenido en el tubo colector. Posteriormente, se lavó la columna agregando 0.75 ml de buffer PE. Se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 1 min, y se desechó el fluido obtenido en el tubo colector. La columna se volvió a centrifugar durante 1 min para remover el buffer de lavado residual y luego se colocó en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml. Para la elución del ADN plasmídico, que hasta este momento se encontraba adsorbido en la columna, se añadió 50 μl de buffer de elución a la matriz de la columna de sílica, se dejó en reposo por 5 min y se centrifugó por 1 min. Para conocer la concentración de cada plásmido, se realizó la cuantificación del ADN mediante la medición de absorbancia por espectrofotometría a 260 nm. Además, se realizó una PCR para confirmar la presencia del inserto bs-SLC5A8 en cada plásmido a secuenciar.

6.2.14. Secuenciación genómica por bisulfito (bs-seq)

El ADN se secuenció usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Se utilizaron los primers proporcionados para la secuenciación del vector pJet1.2. La reacción de PCR consistió en agregar: 10 ng del plásmido extraído de las bacterias, 1.5 μl de primer a una concentración de 3.2 pmol/ μl , 4 μl del premix de reacción, 2 μl de buffer de secuenciación y cantidad suficiente de agua para ajustar el volumen a 20 μl . El primer paso de la PCR consistió en una rápida desnaturalización (1 min a 96 °C). Posteriormente se realizaron 25 ciclos de: desnaturalización (10 s a 96 °C), alineamiento (5 s a 50 °C) y elongación (4 min a 60 °C). Por último, se dejó la muestra 10 min a 4 °C. Posteriormente, el producto de PCR fue purificado. Para ello se agregó 80 μl de isopropanol al 60 %, se incubó 12 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se centrifugó a 13000 rpm durante 12 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla de

ADN fue lavada con etanol al 70 %. Enseguida se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando la pastilla en la obscuridad. El tubo con la pastilla se almacenó protegido de la luz a 4 °C, hasta ser secuenciado. Las muestras fueron analizadas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, utilizando un kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 y un analizador genético ABI PRISM® 310 (ambos Thermo Fisher Scientific, Inc.). El electroferograma y la secuencia fueron analizados con el software FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, WA, EE. UU.). Por último, se utilizó el software BiQ Analyzer [78] para procesar los datos de secuenciación del ADN, confirmar la eficiencia de conversión por bisulfito, y generar los diagramas de metilación de la ICG de SLC5A8.

6.2.15. Medición de la metilación global

Para calcular la metilación global se asignó una puntuación a cada sitio CpG, en términos de la frecuencia de citosinas metiladas y no metiladas en una posición determinada, considerando el número total de alelos analizados para cada muestra. El puntaje se asignó de la siguiente manera: sitio CpG uniformemente metilado = 2, sitio CpG uniformemente desmetilado = 0, sitio CpG semimetilado donde la metilación es más frecuente que la desmetilación = 1.5 y sitio CpG semimetilado donde la desmetilación es más frecuente que la metilación = 0.5. Se sumó el puntaje de cada sitio CpG y se dividió entre 90 (número total de sitios analizados \times puntaje máximo = 45×2), luego el resultado se multiplicó por 100.

6.2.16. Medición de la densidad de sitios CpG metilados

Basándose en el total de clonas secuenciadas, un sitio CpG se consideró metilado (mCpG) cuando el número de alelos que muestran metilación en esa posición es mayor que el número de alelos no metilados. La densidad de los sitios mCpG en la región secuenciada se calculó de la siguiente manera: número de CpG metilados \times 100 / número total de CpG muestreados (45 sitios).

6.2.17. Inhibición de la metilación del ADN y la desacetilación de histonas en las líneas celulares de CaCU

Se prepararon soluciones stock de 5-aza-2'-desoxicitidina 100 mM (5-azadC) y tricostatina A (TSA) 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EE. UU.) solubilizando los reactivos en DMSO. Las células se sembraron (250,000 células por caja 60 mm) y se dejaron recuperar durante toda la noche. Luego, se añadió al medio de cultivo celular un volumen suficiente de 5-azadC para ajustar a una concentración final de 10 μ M (HeLa, SiHa, CaSki) o 20 μ M (Calo y C-33A). Las células utilizadas como controles fueron tratadas con DMSO, utilizando el mismo volumen usado para el inhibidor 5-azadC. Cada 24 h, el medio era reemplazado con medio fresco (con 5-azadC o DMSO) durante 4 días. Las células que fueron tratadas con TSA 0.8 μ M (concentración final), se expusieron al fármaco en el quinto día durante 24 h. Adicionalmente, se utilizaron las mismas condiciones experimentales agregando piruvato 1 mM (Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) al medio de crecimiento. Después de los tratamientos, las células fueron cosechadas y el ARN fue extraído para el análisis de expresión de SLC5A8 por RT-PCR, como se describió anteriormente.

6.2.18. Transfección de células HeLa

Se adquirieron los siguientes plásmidos comerciales (Origene Technologies Inc., Rockville, Maryland, EE. UU.): vector vacío (pCMV6-AC-GFP), que contiene una etiqueta tGFP C-terminal, y el mismo vector que lleva insertado el marco abierto de lectura de SLC5A8 (pCMV6-AC-GFP-SLC5A8). Para confirmar la identidad molecular de los plásmidos se realizó la digestión con la enzima KpnI HF (New England BioLabs). En un tubo de centrifuga se agregó: 1 μ l de ADN plasmídico con una concentración de aproximadamente 1 μ g/ μ l, 1 μ l de la enzima de restricción, 5 μ l de Cut Smart buffer 10X y 43 μ l de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen a 50 μ l. La reacción fue incubada a 37 °C por 2 h. Posteriormente, se realizó un análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % para verificar el patrón de restricción. Asimismo, se realizó una PCR para analizar la amplificación del fragmento de SLC5A8. Por último, se realizó la propagación y extracción de los plásmidos.

Para la transfección de células HeLa, las células se sembraron en medio completo y se dejaron crecer. Después de 24 h se realizó la transfección como se describe a continuación. Se diluyeron 5 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) en 250 μ l de medio DMEM (sin suero y sin antibiótico). De manera paralela se utilizaron 5 μ g de ADN plasmídico, diluidos en 250 μ l de medio DMEM (sin suero y sin antibiótico). En ambos casos se dejó en incubación 5 min a temperatura ambiente. Enseguida, se agregó por goteo la solución de plásmido codificante de SLC5A8 en DMEM al tubo con la lipofectamina, y se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurridos 15 min de este tiempo se retiró el medio de las cajas, se lavó con 1 ml de PBS y se agregó 500 μ l de medio DMEM (sin suero ni antibiótico). Finalmente se agregó, por goteo, la lipofectamina con el plásmido a cada una de las cajas. Éstas se incubaron por 6 h a 37 °C en atmósfera húmeda, con un contenido de CO₂ al 5 %. Pasado este tiempo se retiró el medio, se realizó un lavado con 1 ml de PBS y se adicionó medio DMEM fresco. El mismo procedimiento se realizó para la transfección con el vector vacío pCMV6-AC-GFP como control. La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) se observó 48 h después de la transfección. Las células se mantuvieron en crecimiento con el antibiótico de selección G418 durante aproximadamente 25 días.

6.2.19. Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó utilizando reactivos del kit de conteo celular 8 (CCK-8; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EE. UU.). Para este ensayo se utilizaron células HeLa transfectadas con el vector vacío o el vector con SLC5A8. De acuerdo al protocolo del fabricante, en una placa de 96 pozos, se inoculó 100 μ l / pozo de suspensión celular (500 células viables). Se incubó la placa durante 6 días consecutivos, en una incubadora humidificada a 37 ° C y 5 % de CO₂. Durante 6 días consecutivos, a la misma hora cada día, se agregó 10 μ l de la solución de CCK-8 a cada uno de los pozos correspondientes y se evaluó la absorbancia a 450 nm, utilizando un lector de microplacas.

6.2.20. Modelo de xenoinjertos en ratones desnudos

El estudio se realizó utilizando ratones desnudos macho (BALB/c-nu), de 3 semanas de edad. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se ajustaron a nuestras directrices éticas institucionales para experimentos con animales. Las células HeLa pre-transfectadas con el vector vacío o con SLC5A8 se propagaron y en la etapa exponencial se cosecharon, se cuantificaron y se resuspendieron en PBS. Posteriormente se inyectaron subcutáneamente en los flancos posteriores de los ratones. En el flanco derecho se inyectaron 150 μl (20×10^6 células / ml) de células transfectadas con el vector vacío como control, mientras que en el flanco izquierdo se inyectaron 150 μl (20×10^6 células / ml) de células transfectadas con SLC5A8. Los ratones se alojaron en un ambiente libre de patógenos y el crecimiento del tumor se controló midiendo el tamaño del tumor con un calibrador digital. El volumen del tumor se calculó utilizando la siguiente fórmula: $V = 0.5 \times a \times b^2$, donde a se refiere al diámetro largo y b se refiere al diámetro corto del tumor. Los ratones se sacrificaron al final del experimento (aproximadamente 36 días después de ser inyectados) y los tumores se extrajeron y pesaron.

6.2.21. Análisis estadístico

En los experimentos indicados, el procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism, versión 6.00 (GraphPad, San Diego, California, EE. UU.). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre dos grupos se evaluaron mediante pruebas t de Student no pareadas de dos colas; mientras que la diferencia entre múltiples grupos se analizó mediante la prueba ANOVA de dos vías y el análisis post hoc de Sidak o mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn, según la distribución paramétrica o no paramétrica de los datos.

Tabla 6.1: Secuencias de primers para PCR

Gen	Secuencia de primers
SLC5A8 Forward	5'-TCCGAGGTCTACCGTTTTG-3'
SLC5A8 Reverse	5'-GGGCAGGGGCATAAATAAC-3'
β2M Forward	5'-GGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT-3'
β2M Reverse	5'-ACCTCCATGATGCTGCTTAC-3'
M-SLC5A8 Forward	5'-TTCGGTCGTTATCGGTATTTATTAC-3'
M-SLC5A8 Reverse	5'-CGAACACTACGATCATTCTACGA-3'
U-SLC5A8 Forward	5'-TTTGTTGTTATTGGTATTTATTATGT-3'
U-SLC5A8 Reverse	5'-CCACAAACTACAATCATTCTACAA-3'
bs-SLC5A8 Forward	5'-GAGGTTTTATATTTGGGTTTGAGG-3'
bs-SLC5A8 Reverse	5'-CCCATCAAAAATCCTTAAAAATCTA-3'

Tabla 6.2: Condiciones de PCR

	β2M	SLC5A8	U-SLC5A8	M-SLC5A8	bs-SLC5A8
Condición inicial	95 °C - 5 min	95 °C - 5 min	94 °C - 5 min	94 °C - 5 min	95 °C - 5 min
No. de ciclos	30	30 ó 40	35	35	35-40
Desnaturalización	95 °C - 30 s	95 °C - 30 s	94 °C - 45 s	94 °C - 45 s	95 °C - 45 s
Alineamiento	60 °C - 30 s	56.4 °C - 30 s	56 °C - 45 s	56 °C - 45 s	61 °C - 60 s
Elongación	72 °C - 30 s	72 °C - 30 s	72 °C - 45 s	72 °C - 45 s	72 °C - 45 s
Elongación final	72 °C - 9 min	72 °C - 9 min	72 °C - 10 min	72 °C - 10 min	72 °C - 10 min

Resultados

7.1. Análisis de expresión y metilación de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU

7.1.1. Análisis de expresión de SLC5A8

Para caracterizar la expresión de SLC5A8, cinco líneas celulares de CaCU humano (HeLa, Calo, SiHa, CaSki y C-33A), junto con muestras de tejido epitelial cervical no tumoral, fueron analizadas mediante RT-PCR semicuantitativa. Además, la línea celular de riñón embrionario HEK293 y la línea celular de cáncer de colon HCT116 se usaron como control positivo y negativo de la expresión de SLC5A8, respectivamente. Como referencia se analizó la expresión del gen constitutivo β 2M (100 pb) en cada una de las muestras. Mediante un análisis electroforético en gel de agarosa al 1.8 %, se detectó la presencia del transcrito de SLC5A8 (229 pb) en tejido cervical no tumoral. Por el contrario, no se observó la expresión de SLC5A8 en ninguna de las líneas celulares de CaCU analizadas (Figura 7.1).

7.1.2. Análisis de metilación mediante MS-PCR

Dado que la metilación aberrante ha sido identificada como responsable de la represión de SLC5A8 en diferentes tipos de cáncer, se consideró que este mecanismo epigenético podría participar en su regulación en CaCU. Con el propósito de demostrar esto, inicialmente se realizó un análisis *in silico* para determinar si el gen contenía una o varias ICG, y su localiza-



Figura 7.1: Análisis de expresión de SLC5A8 mediante RT-PCR. El transcrito de SLC5A8 está reprimido en las cinco líneas celulares de CaCU (HeLa, Calo, SiHa, CaSki y C-33A), en comparación con tejido cervical no tumoral (Cérvix). La expresión de β 2M (parte inferior) se usó como control de referencia endógeno. HEK y HCT se utilizaron como control positivo y negativo de la expresión de SLC5A8, respectivamente. MPM, marcador de peso molecular; HEK, HEK293; HCT, HCT116; β 2M, β -2 microglobulina; Neg, reacción de PCR sin ADN complementario como molde.

ción precisa. De acuerdo con el software de EMBOSS CpGplot y Methprimer, y utilizando los criterios de selección de un contenido de CpG $> 50\%$ y una proporción de CpG observados / esperados > 0.6 , SLC5A8 contiene una ICG densa, que abarca una región de 576 pb en el primer exón del gen (Figura 7.2). La isla identificada abarca parte de la región 5' UTR y el comienzo de la región codificante en el exón 1, desde la posición del nucleótido +12 al +587, en relación con el sitio de inicio transcripcional (TSS) anotado en la base de datos Eukaryotic Promoter Database (EPD). Con base en este análisis, se seleccionó una subregión de 100 pb (desde el nucleótido +430 al +530) para el ensayo de MS-PCR. Los resultados de este ensayo supondrían la implicación de la metilación del ADN en la regulación negativa de SLC5A8.

Previo a este ensayo, el ADN genómico fue modificado con bisulfito de sodio, para la conversión selectiva de citosinas en uracilo, sin afectar a las 5-metilcitosinas. Mediante el ensayo de MS-PCR se determinaría la presencia de metilación en siete sitios CpG, ubicados dentro de los sitios de unión de los primers. La línea celular HCT116, en la cual la secuencia de la ICG de SLC5A8 ha sido caracterizada como completamente metilada, se usó como un control positivo de metilación; caso contrario de la línea celular HEK293, la cual se usó como control negativo. De acuerdo a este screening, se detectó la presencia de alelos metilados (M-SLC5A8) y desmetilados (U-SLC5A8) del gen, tanto en las líneas celulares de

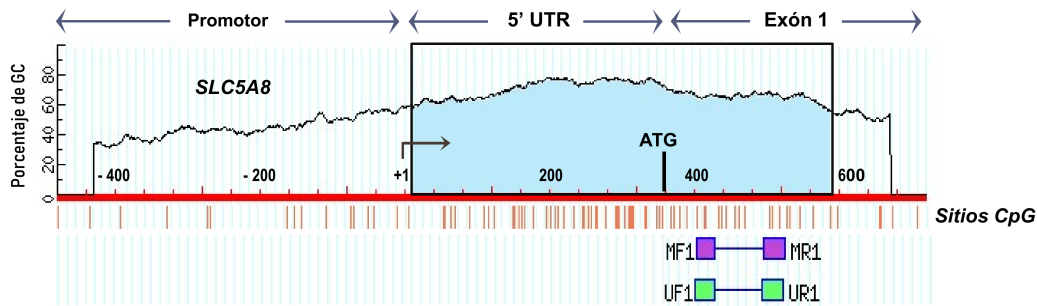


Figura 7.2: Esquema de la localización de la ICG en SLC5A8. En la parte superior se observa la región promotora, 5' UTR y el primer exón. De color azul se identifica la ICG, enmarcada en el recuadro negro. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) está indicado por la flecha en ángulo recto en la posición del nucleótido +1. Las líneas verticales rojas representan la ubicación de cada sitio CpG. Las casillas debajo indican la posición del par de primers seleccionados para el análisis de MS-PCR. MF1, primer para M-SLC5A8 Forward; MR1, primer para M-SLC5A8 Reverse; UF1, primer para U-SLC5A8 Forward; UR1, primer para U-SLC5A8 Reverse.

CaCU, como en el tejido de cérvix no tumoral. Sin embargo, las líneas celulares de CaCU mostraron una amplificación preferencial de M-SLC5A8; y el tejido cervical no tumoral de U-SLC5A8 (Figura 7.3). Conforme a estos resultados, la mayor detección de M-SLC5A8 en las líneas celulares de CaCU podría estar correlacionada con la ausencia de expresión del gen.

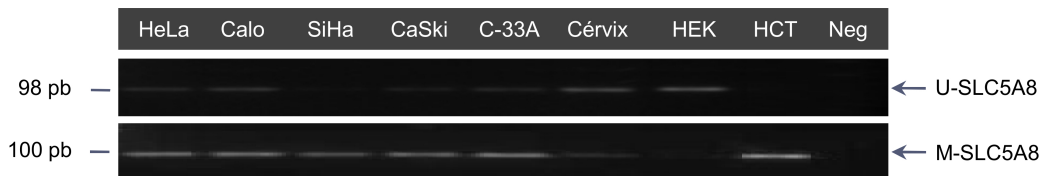


Figura 7.3: MS-PCR de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU. Se realizaron las PCR independientes para amplificar la secuencia desmetilada (U-SLC5A8) y/o la secuencia metilada (M-SLC5A8), utilizando ADN tratado con bisulfito de sodio como cadena molde. A diferencia del tejido cervical no tumoral, las cinco líneas celulares de CaCU amplificaron preferencialmente el alelo M-SLC5A8. HEK y HCT se usaron como controles de metilación y desmetilación en SLC5A8, respectivamente. Cérvix, tejido cervical no tumoral; HEK, HEK293; HCT, HCT116; Neg, reacción de PCR sin ADN.

7.1.3. Análisis de metilación mediante bs-seq

La secuenciación genómica por bisulfito, o bs-seq, se considera el estándar de oro para la detección de la metilación del ADN, permitiendo identificar la presencia de 5-metilcitosinas con una resolución a nivel de pares de bases. Se optó entonces por este análisis para explorar de forma cualitativa y cuantitativa los perfiles de metilación de SLC5A8 en las mismas muestras. Esto permitiría conocer si la metilación en la ICG estaba limitada a unos pocos dinucleótidos CpG, o más bien la mayoría de ellos estaban metilados, así como para calcular el nivel global de metilación de cada muestra. Esta vez se seleccionó una región de 379 pb (del nucleótido +123 al +501) dentro de la ICG para capturar el estado de metilación de 45 sitios CpG. El siguiente paso consistió en amplificar la región de interés mediante bs-PCR. Una vez que se comprobó la presencia del producto esperado (bs-SLC5A8) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (Figura 7.4), éste fue purificado y clonado en el vector pJet1.2, que se utilizó para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α .

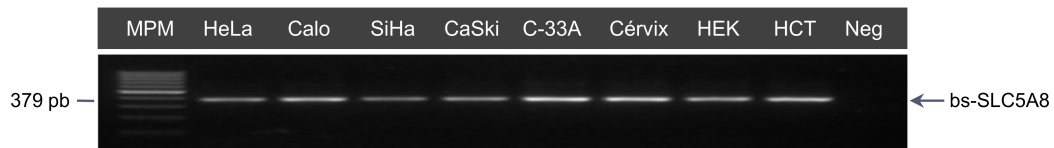


Figura 7.4: Amplificación de bs-SLC5A8 en líneas celulares de CaCU y tejido cervical no tumoral. Mediante bs-PCR, y utilizando ADN tratado con bisulfito como molde, se amplificó una región de 379 pb dentro de la ICG de SLC5A8. MPM, marcador de peso molecular; Cérvix, tejido cervical no tumoral; HEK, HEK293; HCT, HCT116; Neg, reacción de PCR sin ADN.

Las bacterias fueron inoculadas en placas de LB, con ampicilina como medio de selección. Para la futura secuenciación alelo-específica, diferentes colonias fueron escogidas aleatoriamente con el fin de confirmar la presencia del inserto bs-SLC5A8 mediante PCR de colonia. Para ello, se preparó una reacción de PCR convencional, pero en lugar de añadir ADN como cadena molde, se agregó una fracción de la colonia seleccionada usando una punta estéril de micropipeta. Aquellas colonias que resultaron positivas se utilizaron para la producción y extracción de plásmido por miniprep. Posteriormente, los plásmidos fueron secuenciados

y las secuencias obtenidas de bs-SLC5A8 se compararon respecto a la secuencia control (misma secuencia sin modificaciones por bisulfito). Las citosinas metiladas aparecieron como tales, mientras que las desmetiladas fueron sustituidas por timina. Utilizando el software BiQ Analyzer se importaron las secuencias, se alinearon y se generaron los diagramas de metilación (Figura 7.5). Las líneas celulares HCT116 y HEK293 se incluyeron una vez más como controles de metilación y desmetilación en la ICG de SLC5A8, respectivamente. Los perfiles de cada muestra, en conjunto, reflejan el patrón de metilación del gen (epigenotipo). De acuerdo a los resultados de secuenciación, las cinco líneas celulares de CaCU (HeLa, Calo, SiHa, CaSki y C-33A), las cuales no expresan SLC5A8, presentaron perfiles hipermetilados, en un marcado contraste con los perfiles desmetilados de los tejidos cervicales no tumorales. Cabe señalar que, aunque se aprecian diferentes patrones de metilación entre las líneas celulares de CaCU, existe una región común (sitios CpG 13-32) en la cual casi la totalidad de las citosinas se encuentran metiladas.

Adicionalmente se generaron perfiles acumulados de metilación en la ICG de SLC5A8, considerando todas las clonas de cada muestra (Figura 7.6). Estos perfiles se usaron para ponderar la contribución relativa de cada sitio CpG al estado de metilación global y calcular los porcentajes de metilación de las muestras (ver Capítulo 6). Este análisis estimó que, en la región estudiada del gen SLC5A8 (+123 a +501), los tejidos cervicales normales presentan un nivel de metilación inferior al 7 %; seguido de C-33A, negativa para VPH, con un valor de 62.2 %; HeLa y Calo, positivas para VPH18, con valores intermedios de 66.7 % y 74.4 %; y, por último, SiHa y CaSki, positivas para VPH16, con los niveles de metilación más altos de 84.4 % y 87 %. Estos resultados indican una relación entre la expresión de SLC5A8 y el estado de metilación de la región analizada de 379 pb, en la que la metilación aberrante está implicada en el silenciamiento transcripcional de SLC5A8.

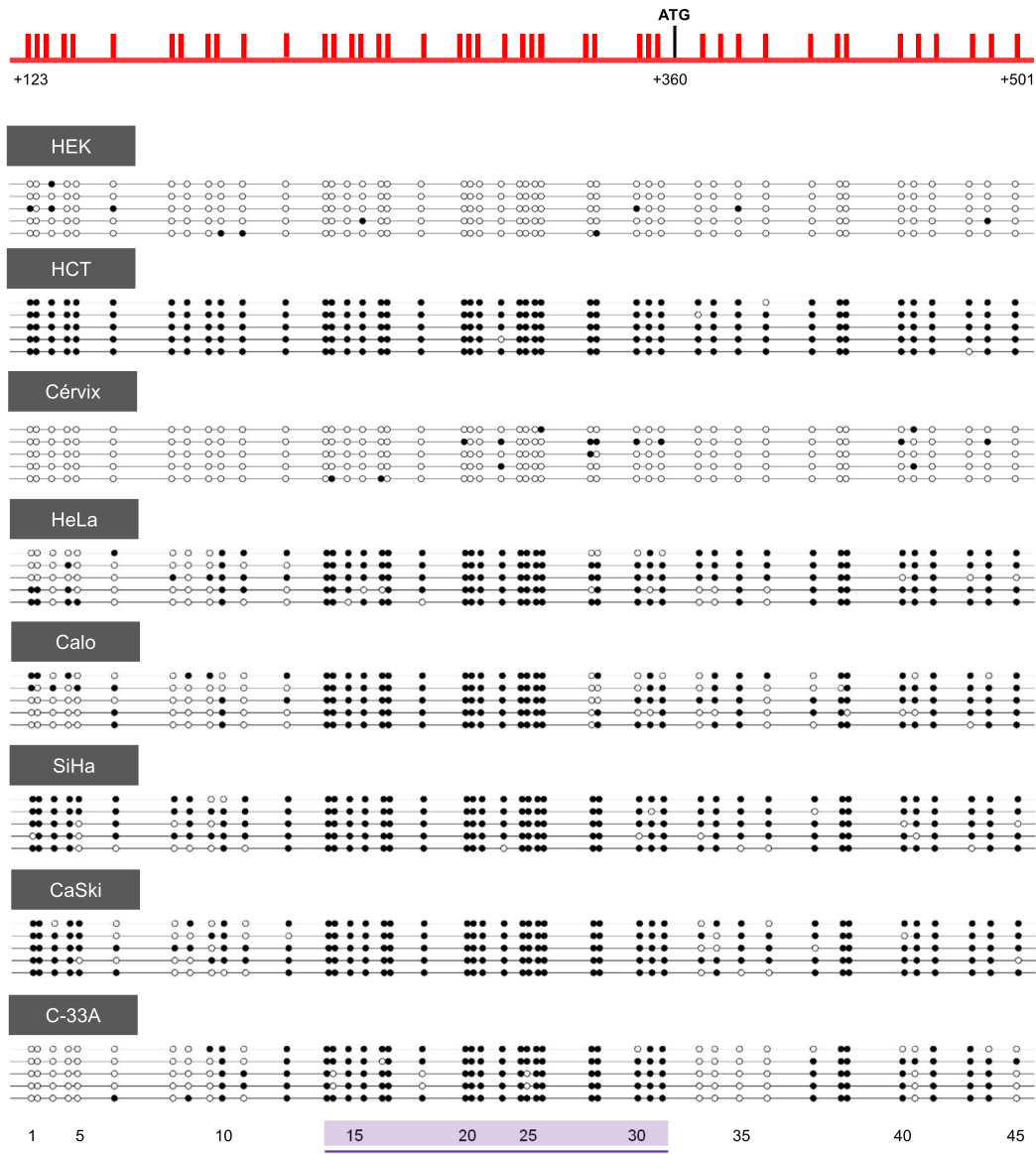


Figura 7.5: Hipermetilación de la ICG de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU. La región seleccionada de 379 pb (posición +123 a +501) abarca el análisis del estado de metilación de 45 sitios CpG. Éste se realizó mediante secuenciación alelo-específica de bs-SLC5A8, a partir de ADN tratado con bisulfito, aislado de líneas celulares de CaCU (HeLa, Calo, SiHa, CaSki y C-33A) y tejidos cervicales no tumorales (Cérvix). HEK293 (HEK) y HCT116 (HCT) se usaron como controles de desmetilación y metilación en SLC5A8, respectivamente. Cada fila representa el perfil de cada alelo secuenciado (cinco por muestra) y cada círculo indica un sitio CpG individual. Un círculo blanco representa un sitio CpG no metilado, mientras que uno negro representa un sitio metilado. Los sitios CpG están numerados en dirección 5' a 3', la distancia que los separa M representa el número relativo de pb entre ellos. La barra horizontal violeta (sitios 13-32) indica el bloque de sitios CpG uniformemente metilados en todas las líneas celulares de CaCU.

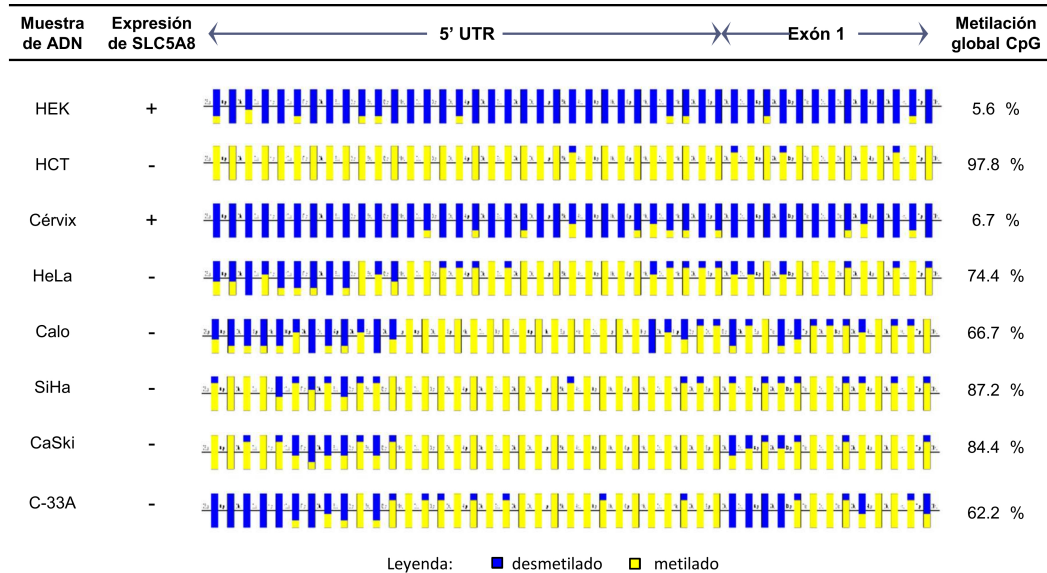


Figura 7.6: Metilación global de la ICG de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU y tejido cervical no tumoral. En el diagrama, cada fila representa el perfil acumulado de metilación (cinco clones por muestra) con el cual se calculó el porcentaje de metilación global. Las casillas representan cada uno de los 45 sitios CpG en la región analizada dentro de la ICG de SLC5A8. HCT116 y HEK293 se usaron como controles de SLC5A8 metilado y desmetilado, respectivamente. Cérvix, tejido cervical no tumoral; HEK, HEK293; HCT, HCT116.

7.2. Efecto de la inhibición de la metilación del ADN y la desacetilación de histonas en la reexpresión de SLC5A8

Dado que el silenciamiento epigenético por metilación del ADN frecuentemente va acompañado de modificaciones represivas de histonas, se investigaron los efectos de bloquear la metilación del ADN y la desacetilación de histonas en la reexpresión de SLC5A8. Para ello, se trataron las líneas celulares de CaCU con 5-azadC, un inhibidor de las DNMT, y/o TSA y piruvato, inhibidores de HDAC. Después de los tratamientos farmacológicos, se realizó RT-PCR para evaluar si había recuperación de la expresión de SLC5A8. En experimentos preliminares se probaron diferentes concentraciones de 5-azadC, para seleccionar el tratamiento que se utilizaría para cada línea celular. Con base en estos experimentos, se determinó utilizar una concentración de 5-azadC 10 μ M para HeLa, SiHa y Caski; y de 5-azadC 20 μ M para Calo y C-33A.

Como se muestra en los paneles de la izquierda de la Figura 7.7, la exposición a 5-azadC sola fue suficiente para restaurar la expresión de SLC5A8 en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki (Figura 7.7 A-C), pero no tuvo efecto sobre la reexpresión de SLC5A8 en Calo y C-33A (Figura 7.7 D y E). En cambio, la exposición a TSA no modificó el estado reprimido del gen en ninguna de las líneas celulares; sin embargo, en HeLa y SiHa, parece mejorar la expresión de SLC5A8 al usarse en combinación con 5-azadC (Figura 7.7 A y B). Aun cuando los tratamientos por separado con 5-azadC o TSA no indujeron la transcripción de SLC5A8 en Calo, la combinación de ambos compuestos tuvo un efecto sinérgico en la reactivación de su expresión (Figura 7.7 D). Por otro lado, ninguno de estos tratamientos tuvo un efecto significativo en la línea celular C-33A (Figura 7.7 E). Los paneles de la derecha muestran resultados similares por la presencia de piruvato, aunque se aprecia un mayor efecto de recuperación de SLC5A8 en todos los casos. La expresión de SLC5A8 se reactivó en las células HeLa, SiHa y CaSki por 5-azadC y en las células CaLo por 5-azadC / TSA (Figura 7.7 F-I). Destaca también que incluso hubo reactivación de SLC5A8 en las células SiHa después de la exposición a TSA (Figura 7.7 G), y en las células C-33A después de la exposición a 5-azadC / TSA (Figura 7.7 J). Estos resultados sugieren que diversos factores epigenéticos contribuyen al silenciamiento del gen SLC5A8 en las líneas celulares de CaCU, ya que aunque en algunos casos esta represión se revierte tras la exposición al inhibidor de la metilación del ADN, su combinación con los inhibidores de la desacetilación de histonas tiene una mayor eficacia en la recuperación de la expresión.

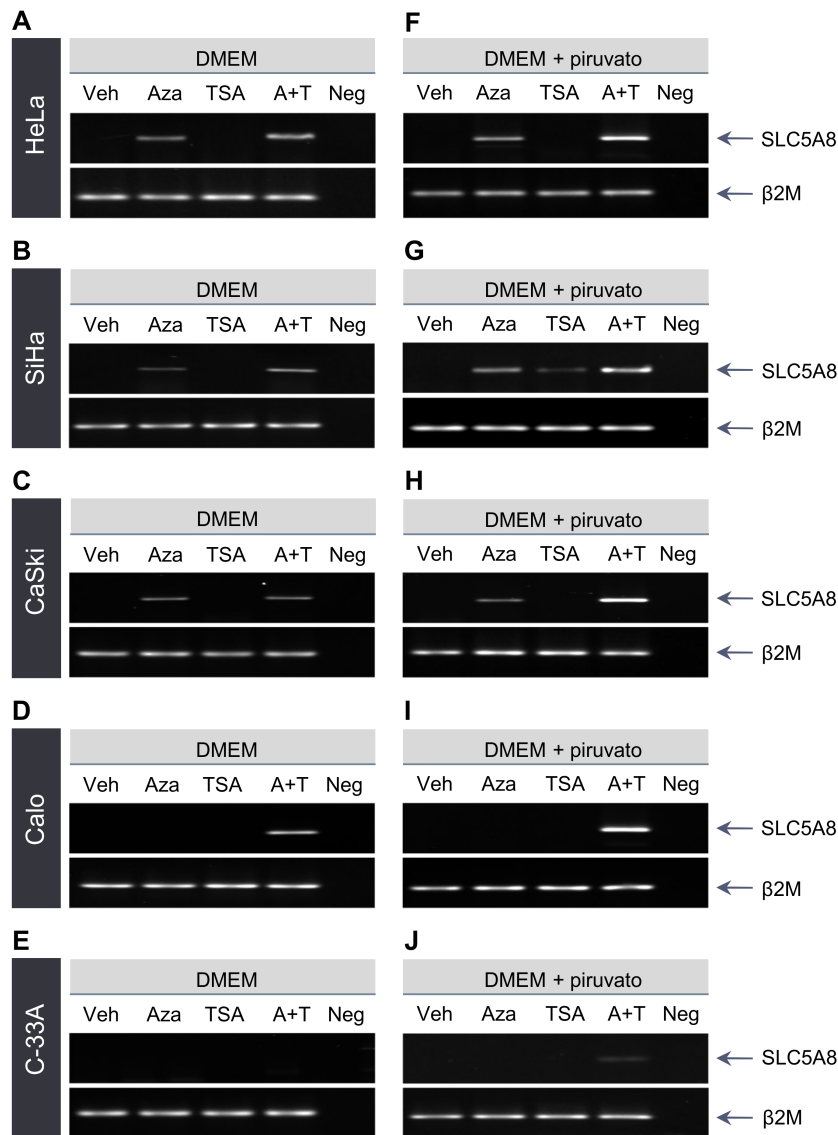


Figura 7.7: Reactivación de la expresión de SLC5A8 en líneas celulares de CaCU. Las células fueron expuestas a fármacos epigenéticos dirigidos a inhibir las DNMT y HDAC. Las imágenes muestran los resultados de RT-PCR para SLC5A8 (arriba) y β 2M (abajo) de las líneas celulares de CaCU tratadas con 5-azadC 10 μ M (A / F: HeLa, B / G: SiHa y C / H: CaSki) o 20 μ M (D / I: Calo y E / J: C-33A) durante 4 días, TSA 0.8 μ M durante 1 día y la combinación de 5-azadC y TSA; ya sea en ausencia o presencia de piruvato 1 mM en el medio de cultivo (DMEM). La expresión de β 2M se usó como un gen de referencia endógeno. Las células tratadas con DMSO (Veh) y una reacción de PCR negativa sin ADNc (Neg) se usaron como controles. Aza, 5-aza-2'-desoxicitidina; TSA, tricostatina A; A + T, 5-aza-2'-desoxicitidina + tricostatina A; β 2M, β -2 microglobulina.

7.3. Análisis de expresión y metilación de SLC5A8 en tejidos tumorales (TT) cervicales

Dado lo observado en las líneas celulares, se procedió a analizar si la represión de SLC5A8 era también un evento frecuente en muestras clínicas de CaCU. Con este propósito, se obtuvieron 30 TT de pacientes con CaCU. Una porción del tumor fue utilizada para realizar la caracterización clínica. En la Tabla 7.1 se enlista el genotipo de VPH de alto riesgo, el estadio de la FIGO y la clasificación histológica de cada muestra. Entre los diferentes genotipos de VPH, los tipos 16 (26.7 %) y 45 (23.3 %) fueron los más prevalentes, seguidos del 59 (16.7 %) y 18 (13.3 %). Además, la prevalencia de coinfección (30 %) fue menor que la monoinfección (60 %) entre las muestras. Por otra parte, la mayoría de las muestras fueron clasificadas como estadio IIB.

Tabla 7.1: Caracterización clínica de tejidos tumorales con CaCU

Código	VPH	Estadio	Clasificación histológica
64	16	IIIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
66	18	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
68	18	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
71	33	IIB	Carcinoma epidermoide poco diferenciado invasor
72	18	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
73	58/52	IIB	Carcinoma epidermoide poco diferenciado invasor
75	58/52	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
77	68	ND*	ND*

78	51	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado
82	59	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado
83	45/59	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor, con permeación linfovascular
84	45	IIB	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasor
85	16	IB2	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor, con permeación linfovascular
86	45/51	IIB	Carcinoma epidermoide poco diferenciado invasor, con permeación linfovascular
87	59	IIIB	Carcinoma epidermoide con crecimiento exofítico
88	45/59	IIIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor, con permeación linfovascular
89	ND*	IIIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
92	45/59	IIB	Carcinoma epidermoide poco diferenciado invasor
93	45	IB2	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
94	16	IIIA	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor, con permeación linfovascular
96	58/52/45	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
97	16	IB2	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
98	18	IIB	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasor
99	16	IIA	Carcinoma epidermoide poco diferenciado

101	16	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado
104	16/31	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado
106	16	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
107	35/42/43	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor, con patrón exofítico
108	ND*	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor
109	ND*	IIB	Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor

*ND= No determinado

Otra porción del tumor fue utilizada para la extracción de ARN total. Se sintetizó el ADN complementario y se realizó RT-PCR para examinar la expresión de SLC5A8. En la Figura 7.8 se puede observar la expresión diferencial del gen de SLC5A8 entre las 29 muestras de TT analizadas, ya que una de las muestras fue descartada. En general, se aprecian dos grupos, donde las muestras que expresaron SLC5A8 fueron significativamente diferentes a las muestras con una expresión reprimida de SLC5A8 ($p < 0.0001$). Específicamente, el 34.5 % de los TT ($n=10$) expresaron SLC5A8 en un rango de medio a alto. El 65.5 % restante ($n=19$) mostró una disminución de su expresión, en el que el 27.6 % ($n=8$) mostró una marcada regulación a la baja de SLC5A8 y el 37.9 % ($n=11$) presentó una completa represión de éste.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis detallado de la metilación del ADN en 27 de las mismas muestras de CaCU. El objetivo era probar si la supresión o regulación a la baja de SLC5A8 estaba relacionada con la metilación aberrante de la misma región analizada en las líneas celulares de CaCU. Adicionalmente, se examinaron cinco tejidos cervicales no tumorales como muestras de referencia. Nuevamente, los extractos de ADN genómico se

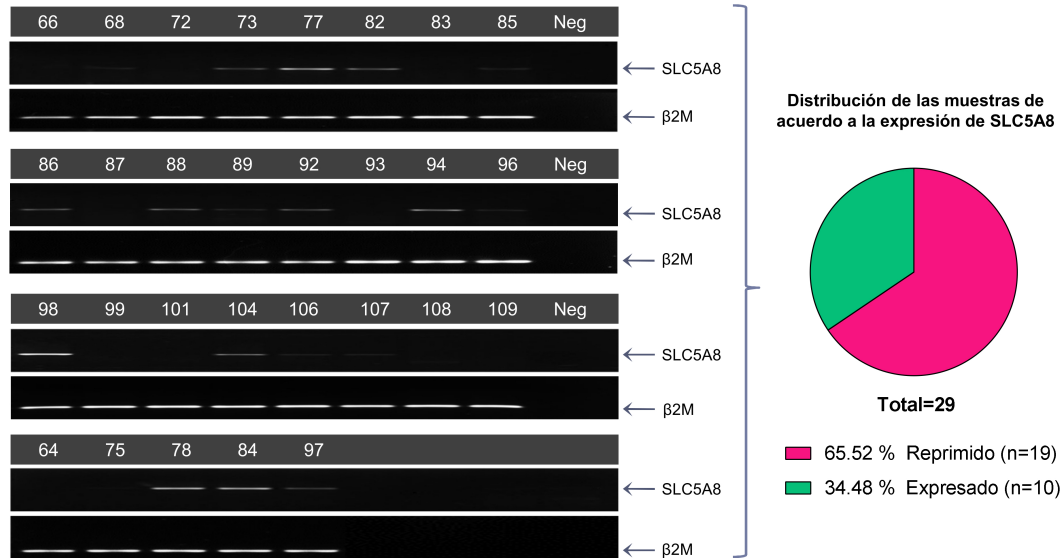


Figura 7.8: Expresión diferencial de SLC5A8 en TT de pacientes con CaCU. Los niveles de expresión de SLC5A8 (arriba) fueron determinados por análisis de RT-PCR, en un panel de 29 muestras de pacientes. La expresión de β 2M se utilizó como control de referencia endógeno (abajo). A la derecha, se muestra la distribución porcentual de las muestras tumorales, de acuerdo a la expresión de SLC5A8. β 2M, β -2 microglobulina; Neg, reacción de PCR sin ADNc.

sometieron a tratamiento con bisulfito. Luego se repitió el procedimiento utilizado en las líneas celulares, desde la bs-PCR hasta la secuenciación de bs-SLC5A8, para generar los diagramas de metilación de los alelos individuales (Figura 7.9). Los TT se agruparon en tres categorías, según el nivel de expresión de SLC5A8: medio / alto (Figura 7.9 A), bajo (Figura 7.9 B) y nulo (Figura 7.9 C). Los tejidos cervicales no tumorales se presentaron en un grupo como referencia (Figura 7.9 D).

Teniendo en cuenta el perfil de secuenciación de cada muestra, se calculó la densidad de los sitios mCpG dentro de la ICG del gen SLC5A8 (Figura 7.10). Los datos derivados demuestran la baja densidad de sitios mCpG en los tejidos cervicales no tumorales analizados. De los 27 TT, doce (44 %) mostraron una densidad de mCpG debajo del 40 %, por lo que se consideraron como tumores no metilados. Los quince TT restantes (56 %) mostraron una mayor densidad de sitios mCpG, considerándose como tumores metilados. Además de lo anterior, se calcularon los valores promedio de densidad para las distintas categorías. Dado

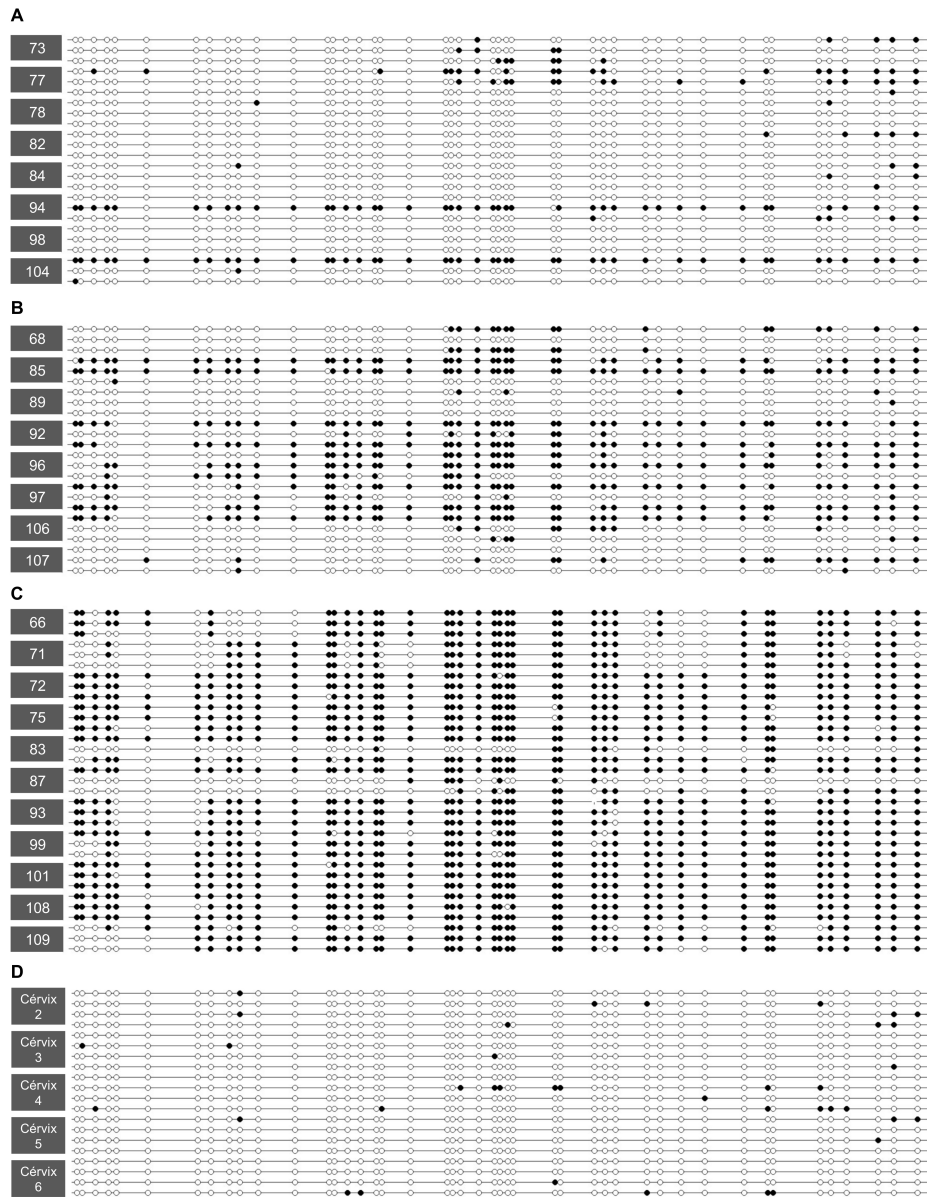


Figura 7.9: Perfiles de metilación de la ICG de SLC5A8 en CaCU. Las muestras tumorales se agruparon en tres categorías, según su nivel de expresión de SLC5A8: alta y media (A), baja (B) y expresión nula (C). Se utilizaron cinco tejidos cervicales no tumorales como control (D). Cada hilera representa un alelo individualmente clonado y secuenciado. Cada círculo en el gráfico representa el estado de metilación de cada CpG, donde un círculo blanco representa un sitio desmetilado y un círculo negro un sitio metilado. En total, se analizaron de tres a cuatro clones por muestra. Cérvix, tejido cervical no tumoral.

que la distribución de los datos fue no paramétrica, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar estos valores. Esta prueba demostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de TT con nula expresión de SLC5A8 y los TT con alta/media expresión de SLC5A8 ($p < 0.01$), así como con los tejidos cervicales no tumorales ($p < 0.001$).

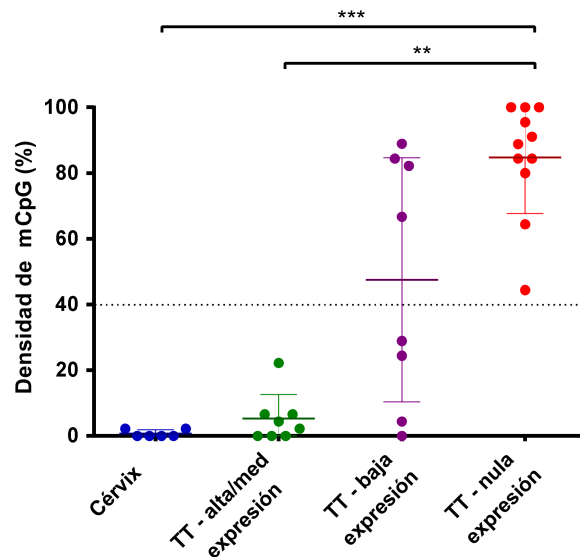


Figura 7.10: Densidad de sitios mCpG dentro de la ICG de SLC5A8 en TT cervicales. La densidad de sitios mCpG se calculó considerando las tres o cuatro clonas secuenciadas para cada muestra, como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Los datos se muestran como un diagrama de dispersión y la asignación de los TT en las distintas categorías se basó en su nivel de expresión de SLC5A8 (expresión alta y media, baja y nula). Adicionalmente, se utilizaron 6 muestras de tejidos cervicales no tumorales (Cérvix) como referencia. Las diferencias significativas entre las categorías se indican como $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

Considerando todas las clonas de cada categoría se generaron los perfiles acumulados de metilación. En éstos se puede apreciar el aumento en la frecuencia de metilación de cada sitio CpG, a medida que la expresión de SLC5A8 disminuye (Figura 7.11). En los tumores con niveles altos y medios de expresión de SLC5A8 se observa un comportamiento similar al de los tejidos cervicales no tumorales, con la mayoría de los CpG casi homogéneamente desmetilados. El nivel de metilación global de estas muestras fue de alrededor del 25 %. En el perfil acumulado de los tumores con baja expresión de SLC5A8 se aprecia un com-

portamiento heterogéneo en cada CpG, por la mezcla de alelos desmetilados y metilados de SLC5A8. Esto contribuyó a que esta categoría obtuviera un valor de metilación global del 37 %. Por otro lado, en el grupo de tumores sin expresión de SLC5A8 se observan varios sitios CpG metilados casi homogéneamente. Por ende, el nivel de metilación global de esta categoría fue el más alto (74 %). En general, estos resultados sugieren que la expresión disminuida de SLC5A8 en el cáncer cervicouterino se asocia con la hipermetilación de su ICG, como se observó previamente en las líneas celulares de CaCU.

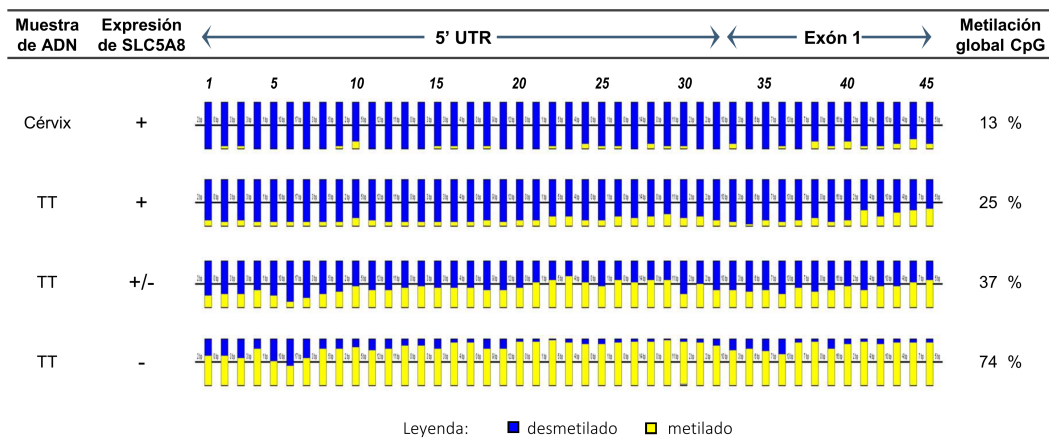


Figura 7.11: Metilación global de la ICG de SLC5A8 en TT cervicales. En el diagrama, cada fila representa los perfiles acumulados de metilación de todas las clonas que conforman las diferentes categorías de TT (+, expresión de SLC5A8 alta y media; +/-, expresión baja; -, expresión no detectable), y de tejidos normales como control. Las casillas representan cada uno de los 45 sitios CpG en la región de 379 pb secuenciada, y la proporción de color corresponde a la frecuencia de sitios metilados y desmetilados en esa posición. Con base en esto se calculó la metilación global, como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Cérvix, tejido cervical no tumoral; TT, tejido tumoral.

7.4. Efecto de la reexpresión de SLC5A8 en la proliferación celular

Debido a que se observó que la inactivación epigenética de SLC5A8 es un evento frecuente en el CaCU, se sugirió que su reexpresión podría tener algún efecto en la proliferación de las células cancerosas. Para evaluar esto, se utilizó la línea celular HeLa, en la que se detectó

que el gen SLC5A8 endógeno está metilado y silenciado. Estas células fueron previamente transfectadas con el vector pCMV6-AC-GFP que codifica para SLC5A8, o con el vector vacío como control. El análisis de proliferación celular se realizó durante 6 días consecutivos, mediante el ensayo colorimétrico con el kit CCK-8, registrando los cambios en la densidad óptica a 450 nm cada 24 h. Se observó que la reconstitución de la expresión de SLC5A8, tras la transfección de esta línea celular, disminuyó significativamente ($p < 0.0001$) la capacidad de proliferación respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Figura 7.12). En cambio, estas últimas no mostraron cambios significativos en la proliferación respecto a las mismas células sin transfectar. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de SLC5A8 confiere una ventaja de crecimiento celular a las células tumorales en las que este gen está inactivado.

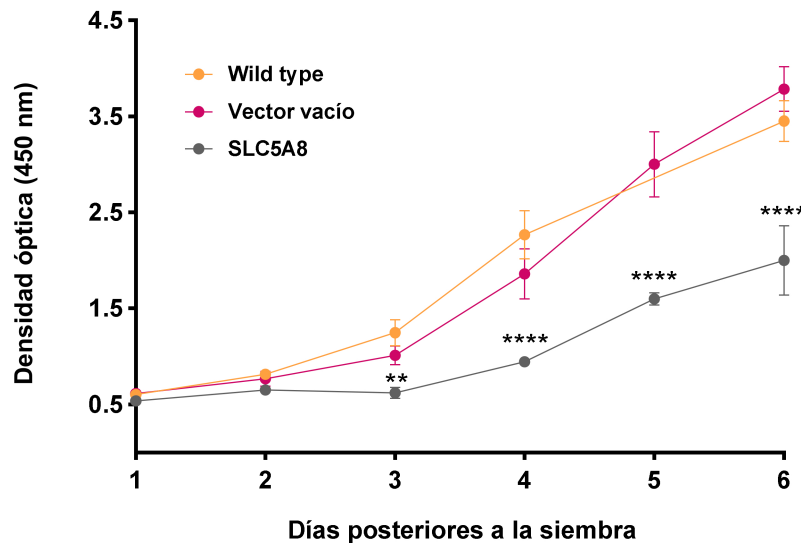


Figura 7.12: Inhibición de la proliferación de células HeLa transfectadas con el vector que codifica para SLC5A8. La proliferación fue determinada mediante el ensayo de CCK-8. Los datos se presentan como la media de 5-6 experimentos. El efecto inhibitorio del crecimiento celular del vector con SLC5A8 fue significativo a partir del día 3, $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (****). Wild type, células sin transfectar; Vector vacío, células transfectadas con pCMV6-AC-GFP; SLC5A8, células transfectadas con pCMV6-AC-GFP-SLC5A8.

7.5. Efecto de la reexpresión de SLC5A8 en el crecimiento de tumores en ratones desnudos

Para determinar el posible rol de SLC5A8 en la disminución del crecimiento tumoral *in vivo*, se utilizó un modelo de ratón desnudo con xenoinjerto. Para ello, se utilizaron células HeLa pre-transfectadas con el vector que contiene el marco de lectura abierto de SLC5A8, o con el vector vacío como control. Las células fueron trasplantadas a los ratones desnudos mediante la inyección subcutánea en los flancos posteriores.

Aunque los dos tipos de células formaron tumores (Figura 7.13 A), aquellos formados por las células transfectadas con el vector que codifica para SLC5A8 crecieron más lentamente (flanco izquierdo), y tuvieron un volumen más pequeño que los de las células usadas como control (flanco derecho) (Figura 7.13 A y B). Después de 20 días, los tumores de células con SLC5A8 tuvieron un volumen significativamente menor al de los tumores de células con el vector vacío ($p < 0.01$); asimismo, pesaron significativamente menos (Figura 7.13 C). Estos hallazgos sugieren que el crecimiento del tumor disminuyó debido a la expresión de SLC5A8.

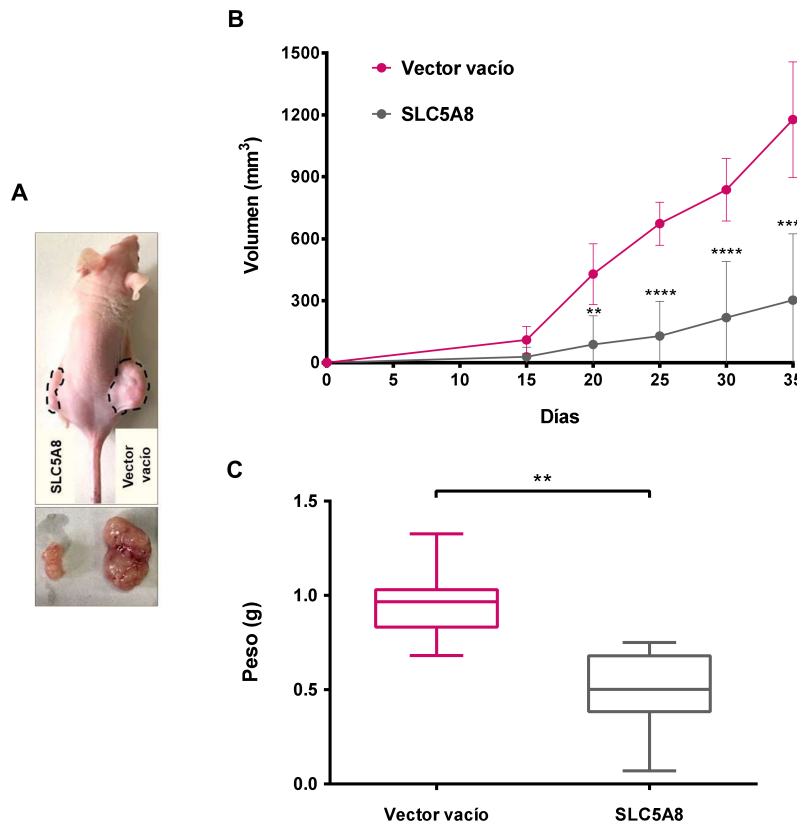


Figura 7.13: Disminución del crecimiento tumoral por expresión de SLC5A8 en el modelo de ratón con xenoinjertos. Células HeLa pre-transfectadas con el vector que codifica para SLC5A8 y con el vector vacío como control se trasplantaron en los flancos izquierdo y derecho, respectivamente, de ratones desnudos. A. Imagen representativa tomada al día 35. B. Curva de crecimiento de los tumores. Los volúmenes tumorales se midieron cada 5 días, a partir del día 15 posterior a la inyección. C. Comparación del peso entre los tumores con SLC5A8 y los tumores control. Los ratones fueron sacrificados, los tumores se diseccionaron y se pesaron. Se emplearon seis ratones para cada experimento, las diferencias significativas se indican como $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (****). Vector vacío, células transfectadas con pCMV6-AC-GFP; SLC5A8, células transfectadas con pCMV6-AC-GFP-SLC5A8.

Discusión

Decidimos investigar la expresión del gen SLC5A8 y su posible silenciamiento epigenético en CaCU, considerando la particular naturaleza de este tipo de cáncer inducido por virus, y el hecho de que es un importante problema de salud pública. Además, la represión de SLC5A8 se ha descrito en varios tipos de tumores, y se ha señalado que su regulación negativa favorece la progresión del cáncer y es necesaria para la reprogramación metabólica en las células transformadas [55, 79].

Según nuestro estudio, la inactivación transcripcional de SLC5A8 es un evento común en el CaCU. Para ello, primero demostramos que SLC5A8 se expresa en tejido cervical no tumoral. Esto correlaciona con lo reportado recientemente en la base de datos de Nextprot <https://www.nextprot.org>, donde se reporta la expresión de SLC5A8 en cérvix. En cambio, encontramos que SLC5A8 está silenciado en el 100 % de las líneas celulares de CaCU analizadas; mientras que se expresa heterogéneamente entre los TT, donde está completamente suprimido o disminuido en 65.5 % de los casos de CaCU analizados. Este porcentaje es más alto en comparación con estudios similares, como los realizados en cáncer de pulmón, en el cual se observa una expresión reducida o completamente suprimida de SLC5A8 en 39 % de los tumores [80], o en cáncer de próstata en el que su expresión está regulada negativamente en el 60 % de los tumores [81].

Las ICG en las regiones promotoras de varios genes, que a menudo se extienden a la región

5' UTR y la región codificante [27], son especialmente susceptibles a la ganancia anormal de metilación en los sitios CpG, conduciendo a su silenciamiento de una manera específica del tipo de cáncer [24, 26, 28, 30, 82]. El análisis por MS-PCR nos permitió detectar que, a diferencia de las muestras de tejidos cervicales normales, las líneas celulares de CaCU amplificaron preferencialmente el alelo metilado de la secuencia analizada, ubicada dentro de la ICG en el primer exón de SLC5A8. La técnica de MS-PCR es altamente recomendable para investigar el estado de metilación de sitios CpG en el ADN, por ser una herramienta rápida y económica [83]. Sin embargo, es necesario considerar que a pesar de su alta sensibilidad (detección de 0.1 % de alelos metilados) y especificidad, únicamente permite la evaluación cualitativa del estado de metilación de un pequeño número de sitios CpG [76, 84], por lo que no puede reflejar con precisión el nivel de metilación del ADN dentro de una región objetivo. Además, existe un riesgo de falsos positivos debido a la unión inespecífica de los primers (mispriming) [76, 83, 84].

Los mapas de alelos individuales de la ICG de SLC5A8, obtenidos por bs-seq, demuestran que los perfiles desmetilados son característicos de los tejidos cervicales normales, contrastando fuertemente con los perfiles metilados de las cinco líneas celulares de CaCU, las cuales presentan epigenotipos similares según el tipo de VPH (18, 16 o negativo). Si bien existen algunas diferencias entre los patrones de metilación, hay un bloque de 20 sitios CpG en la región 5' UTR (sitios 13-32, posición +245 a +356) que destaca por encontrarse casi uniformemente metilado en todas las líneas celulares de CaCU. Por tanto, especulamos que la ausencia de expresión de SLC5A8 está muy influenciada por la densa metilación de esta región. Adicionalmente, se examinó el estado de metilación de una "mini" isla CpG (<200 pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción (datos no mostrados), ya que se localiza dentro de una región descrita por Zhang *et al.* como esencial para la actividad promotora de SLC5A8 [85]. No obstante, en esta región observamos un comportamiento más heterogéneo, sin patrones o sitios CpG uniformemente metilados entre las líneas celulares. En conjunto, estos resultados nos llevan a considerar que la metilación de la ICG en el primer exón tiene un mayor impacto en la regulación transcripcional de SLC5A8, similar a lo reportado para el primer exón del gen del colágeno $\alpha 2(1)$ [86]. De hecho, esto también es consistente con

los hallazgos descritos por Brenet *et al*, quienes describen una correlación más estrecha del silenciamiento transcripcional de los genes con la metilación del ADN río abajo del sitio de inicio de la transcripción, dentro del primer exón, en contraste con la metilación en las regiones promotoras río arriba, donde esta modificación es más variable y menos estricta [87].

El silenciamiento asociado a la hipermetilación del ADN puede ser resultado de la inhibición de unión de ciertos factores de transcripción a sitios CpG específicos, o por la atracción de proteínas que contienen dominios de unión a ADN metilado (MBD) que, a su vez, dificultan el acceso de elementos reguladores al ADN y restringen la transcripción [20, 25, 88–90]. A pesar de que el bloque de los 20 dinucleótidos CpG uniformemente metilados en las líneas celulares de CaCU se encuentra en la región 5' UTR, se ha demostrado que esta zona también puede albergar regiones reguladoras de la transcripción, incluyendo sitios de unión a factores de transcripción [91]. A lo largo de esta zona, la predicción computacional utilizando el software Genomatix (<https://genomatix.de/>) identifica los sitios de unión consenso para los factores de transcripción E2F y CTCF, sensibles a metilación [88, 92]. Bajo esta premisa, la metilación de los CpG en los sitios consenso podría anular la unión de estos factores de transcripción y repercutir en la represión de SLC5A8; pero se requiere la validación experimental del papel de estos factores de transcripción en la regulación de la expresión de SLC5A8.

En el caso de los tejidos tumorales cervicales (mezcla de células cancerosas, células normales adyacentes, estroma y células infiltrantes), hubo una mayor diversidad de perfiles que en las líneas celulares, desde perfiles completamente desmetilados hasta otros densamente metilados. A pesar de detectar algunos alelos metilados, es clara la tendencia de encontrar perfiles no metilados entre los tumores que expresan SLC5A8, similares a los tejidos cervicales normales. Ocurre lo opuesto en los tumores que no expresan SLC5A8, dado que la mayoría de estos perfiles albergan una alta densidad de metilación, similar a las líneas celulares de CaCU, lo que sugiere que la metilación de SLC5A8 es predominantemente bialélica. Respecto a los tumores con bajos niveles de expresión de SLC5A8, éstos mostraron mayores variaciones en sus perfiles. En algunas muestras, esta variabilidad refleja patrones bimodales (alelos hipo

e hipermetilados). Hubo otras muestras con alelos que presentaron sólo algunos sitios CpG metilados a lo largo de la región interrogada. Estos últimos perfiles pueden representar la transición de un estado activo no metilado a un estado metilado inactivo, como se demostró en el desarrollo de la metilación del gen p16 [93], a través del "seeding" (siembra) de metilación en un subconjunto de sitios CpG. Posteriormente habría una expansión gradual de esta marca a los sitios adyacentes [93, 94], impulsada por un ciclo de retroalimentación, hasta alcanzar el nivel de hipermetilación requerido para la estabilidad de la represión transcripcional [93, 95]. Curiosamente no se identificaron secuencias metiladas de ADN del transportador en un pequeño número de tumores cervicales con baja expresión del transcrito de SLC5A8, lo que sugiere mecanismos inhibitorios alternativos aún no identificados, p. ej. miRNAs que degraden post-transcripcionalmente al mensajero de SLC5A8. Aun así, para la mayoría de las muestras de CaCU, una mayor presencia de alelos metilados de SLC5A8 correlaciona con la disminución de su expresión génica, indicando que éste puede ser el mecanismo principal de represión de la expresión de SLC5A8 en CaCU, similar a otros tipos de cáncer [66, 80, 96, 97].

Se considera que los promotores ricos en sitios CpG son más propensos a estar regulados negativamente por la metilación del ADN [32], pero la desacetilación de histonas también tiene una participación crucial en el silenciamiento génico inducido por metilación. Consecuentemente, las líneas celulares fueron expuestas al agente 5-azadC, TSA y/o piruvato. Considerando la efectividad de estos tratamientos, podríamos determinar si la inhibición de la metilación del ADN, de la desacetilación de histonas o de ambos, favorecen la recuperación de la expresión de SLC5A8 en las líneas celulares de CaCU. Esto, a su vez, podría ser indicativo de la jerarquía de ambos mecanismos epigenéticos en la desregulación de este transportador.

El tratamiento con 5-azadC fue suficiente para restaurar la expresión de SLC5A8 en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki, las cuales tienen los perfiles más densamente metilados del transportador. Esta consistencia entre la inhibición de la metilación y la reactivación de la expresión de SLC5A8 apoya la hipótesis de que la metilación del ADN actúa como el principal mecanismo epigenético de silenciamiento de SLC5A8 en estas líneas celulares.

Por el contrario, en la línea celular Calo, la represión de SLC5A8 únicamente fue revertida con la combinación de 5-azadC y los inhibidores de HDAC. Este escenario revela la contribución activa de la desacetilación de histonas en el proceso de silenciamiento de SLC5A8, compensando el menor grado de metilación del ADN en estas células. Sorprendentemente en C-33A, la única línea celular negativa para VPH, que además contiene p53 mutante (R273H), casi no se recuperó la expresión de SLC5A8 después de la exposición a 5-azadC, sola o combinada con TSA o piruvato. De acuerdo con esto, las líneas celulares de CaCU con VPH resultaron más sensibles al tratamiento con 5-azadC que C-33A.

Entonces, ¿qué mecanismos estarían favoreciendo los efectos de 5-azadC en la reactivación de SLC5A8? 5-azadC podría haber promovido la desmetilación de SLC5A8 por interferencia directa con las DNMT, particularmente con la DNMT1, la cual se ha descrito como responsable del silenciamiento epigenético de SLC5A8 en estudios de cáncer de colon y mama [62, 68]. Dado que E6 y E7 inducen la expresión de la DNMT1 [43], conjeturamos que en las líneas celulares de CaCU VPH positivas, los efectos de 5-azadC en la reactivación de SLC5A8 incluyen mecanismos complementarios a la inhibición de las DNMT, relacionados con el bloqueo de la expresión o actividad de los oncogenes virales. Por ejemplo, miR-375, el cual interactúa con los transcritos de E6 y E7, está silenciado por hipermetilación de su promotor en líneas celulares de CaCU con VPH, lesiones CIN3 y CaCU escamoso [98]. Stich *et al.* recientemente demostraron que 5-azadC es capaz de restaurar la expresión de miR-375, correlacionándose con la disminución de E6 y E7 en líneas celulares transformadas por VPH [99]. La baja expresión de E6, a su vez, contribuye a la recuperación de p53 silvestre [99, 100] y a una disminución en los niveles globales de 5'-metilcitosinas, puesto que p53 silvestre se une a SP1 y a proteínas remodeladoras de cromatina, formando un complejo represor del promotor de DNMT1 [45, 101]. En cambio, la mutante p53-R273H en las células de C-33A, no reprime tan fuertemente al promotor de esta enzima [101], teniendo un impacto menor en la desmetilación. Por otra parte, se ha demostrado que SLC5A8 es activado transcripcionalmente por p53 en células de riñón y epitelio mamario [62, 67]. p53 silvestre es capaz de reactivar sus genes blanco, en parte, induciendo la acetilación de histonas en sus promotores y, en consecuencia, promoviendo una estructura de cromatina más

abierta [102]. Sin embargo, la mutación R273H de p53 compromete su unión al ADN y, en consecuencia, la inducción de la acetilación de histonas [103]. Por lo anterior, es plausible considerar que en las líneas celulares VPH positivas, el tratamiento con 5-azadC es particularmente efectivo ya que, en paralelo, puede disminuir la expresión de la DNMT1 y los oncogenes E6 y E7, permitiendo la reactivación de la expresión de SLC5A8; mientras que en la línea celular C-33A, la metilación aberrante del ADN y la presencia de la mutante de p53, de manera independiente pero interrelacionada, podrían estar cooperando para mantener el estado silenciado del gen SLC5A8.

En la mayoría de los casos, el TSA y el piruvato, por separado o combinados, no indujeron la reexpresión de SLC5A8 en las cinco líneas celulares estudiadas; sólo tuvieron cierto impacto en combinación con 5-azadC. Por tanto, estos inhibidores de HDAC podrían requerir un estado parcialmente no metilado de la ICG de SLC5A8 para ejercer un efecto sobre su activación transcripcional. Cabe destacar que el piruvato, en sinergia con 5-azadC y TSA, provocó un aumento en la expresión de SLC5A8 en todas las líneas celulares, incluso en C-33A. Esta sinergia fue confirmada mediante RT-PCR tiempo real en células HeLa (datos no mostrados), lo cual podría atribuirse a la capacidad de obtener una reprogramación epigenética más completa y a que el piruvato es un sustrato de alta afinidad de SLC5A8, por lo que su presencia podría estimular la expresión del transportador. Aunque se necesitará investigar más a fondo su uso potencial como agente terapéutico y quimiopreventivo del cáncer, la entrada de piruvato mediada por SLC5A8 representa una alternativa para revertir el perfil metabólico alterado (efecto Warburg) de las células cancerosas, las cuales mantienen bajos niveles de piruvato a través de su conversión en lactato, con el fin de prevenir la inhibición de HDAC y la inducción de apoptosis [71, 79].

Al igual que en otros tipos de tumores, no hay reportes de que mutaciones somáticas en SLC5A8 sean un evento frecuente en CaCU, mientras que el comportamiento hipermetilado de este gen coincide con lo observado previamente en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de colon, leucemia mieloide aguda, glioma y cáncer de pulmón [66, 80, 96, 97]. Se ha señalado que la reexpresión de SLC5A8, usando inhibidores de la metilación del ADN, podría

aumentar la respuesta a medicamentos contra el cáncer que usan este transportador para entrar en las células tumorales; tal es el caso del dicloroacetato, el cual es capaz de inducir apoptosis selectiva de las células tumorales y, por ende, suprimir su crecimiento [22,104]. Por esta razón, la restauración de la expresión de SLC5A8 podría ayudar en las terapias para el tratamiento del CaCU. Además de esto, algunos de nuestros resultados proporcionan evidencia sobre el posible rol de SLC5A8 como gen supresor de tumores en CaCU, ya que la expresión ectópica de éste en células HeLa disminuyó la proliferación celular *in vitro*; así como los tumores formados por xenotrasplante con estas mismas células (transfectadas con SLC5A8) mostraron un crecimiento más lento y un menor volumen. Esto sugiere que la regulación negativa de SLC5A8 confiere una ventaja proliferativa a estas células tumorales, y que la recuperación de su expresión podría ser favorable en el tratamiento de CaCU; pero aún se necesitan estudios adicionales para validar la implicación de SLC5A8 en el desarrollo de CaCU, como biomarcador o blanco terapéutico en esta malignidad.

Conclusiones

- El mensajero de SLC5A8 se expresa en tejidos cervicales normales.
- Hay una baja o nula expresión de SLC5A8, tanto en líneas celulares como en tejidos tumorales de cáncer cervicouterino.
- Los perfiles de SLC5A8 obtenidos en este estudio demuestran que la hipermetilación en la isla CpG, dentro del primer exón, es una característica asociada a las líneas celulares de CaCU y a los tumores cervicales primarios con baja o nula expresión de este gen.
- En las líneas celulares estudiadas, los fármacos que inhiben la metilación del ADN y la desacetilación de histonas actúan sinérgicamente para restaurar la expresión de SLC5A8. Aunque la contribución de ambos mecanismos al silenciamiento del gen varía según la línea celular, en la mayoría de los casos se requiere la exposición a 5-azadC para regular positivamente su expresión, confirmando la participación clave de la metilación del ADN en la represión epigenética de SLC5A8.
- La expresión ectópica de SLC5A8 en células HeLa disminuye la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*, lo que sugiere que el silenciamiento de SLC5A8 podría conferir una ventaja proliferativa a estas células tumorales.
- La represión o regulación negativa del gen SLC5A8, mediante mecanismos epigenéticos, parece favorecer el desarrollo del CaCU, por lo que se considera un candidato

supresor de tumores y un blanco potencial para el tratamiento de este cáncer.

Perspectivas

Los resultados obtenidos hasta este momento no nos permiten elucidar completamente la forma en que la represión de SLC5A8 favorece la progresión del CaCU. Por tanto, las perspectivas para trabajos futuros se orientan en diferentes direcciones para establecer a SLC5A8 como un supresor de tumores, biomarcador o un blanco terapéutico. En un primer plano estarían los trabajos destinados a confirmar el rol de SLC5A8 como supresor tumoral en CaCU, mediante experimentos de proliferación celular en el resto de las líneas celulares transfectadas con SLC5A8, así como con ensayos de migración e invasividad en estas células, ensayos de cierre de herida o de ciclo celular. Con este enfoque también se podría analizar el mecanismo de cómo es que el silenciamiento de este gen contribuye al fenotipo tumoral, por ejemplo, mediante el estudio de la reexpresión de SLC5A8 a nivel de proteína y su interacción con proteínas anti- y pro-apoptóticas, tanto en células transfectadas como en los tumores de ratón. En un segundo plano estarían los trabajos destinados a ampliar el número de muestras de pacientes para poder establecer una asociación entre el grado de metilación de la ICG de SLC5A8, el tipo de VPH y estadio tumoral, así como también se podría ampliar la caracterización de la regulación epigenética.

Bibliografía

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [2] American Cancer Society, "What Is Cervical Cancer?," tech. rep., 2016.
- [3] ICO, "Human Papillomavirus and Related Diseases Report - MEXICO," Tech. Rep. December, 2018.
- [4] World Health Organization, *Comprehensive Cervical Cancer Control*. 2014.
- [5] L. Bruni, G. Albero, B. Serrano, M. Mena, D. Gómez, J. Muñoz, F. Bosch, and S. de Sanjosé, "Human papilloma virus and related diseases in the world- Summary report," Tech. Rep. January, 2019.
- [6] S. R. Prabhu and D. F. Wilson, "Human papillomavirus and oral disease – emerging evidence : a review," *Aust Den J*, vol. 58, no. 1, pp. 2–10, 2013.
- [7] R. Del Prete, L. Ronga, G. Addati, R. Magrone, D. Di Carlo, and G. Miragliotta, "Prevalence, genotype distribution and temporal dynamics of human papillomavirus infection in a population in Southern Italy," *Infezioni in Medicina*, vol. 25, no. 3, pp. 247–257, 2017.
- [8] E. J. Crosbie, M. H. Einstein, S. Franceschi, and H. C. Kitchener, "Human papillomavirus and cervical cancer," *The Lancet*, vol. 382, no. 9895, pp. 889–899, 2013.

- [9] R. Senapati, N. N. Senapati, and B. Dwibedi, "Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression," *Infectious Agents and Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [10] M. Lizano-Soberón, A. Carrillo-Garcia, and A. Contreras-Paredes, "Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogenesis," *Instituto Nacional de Cancerología*, vol. 4, pp. 205–216, 2009.
- [11] M. Schiffman, P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez, and S. Wacholder, "Human papillomavirus and cervical cancer," *Lancet*, vol. 370, no. 9590, pp. 890–907, 2007.
- [12] J. Durzynska, K. Lesniewicz, and E. Poreba, "Human papillomaviruses in epigenetic regulations," *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, vol. 772, pp. 36–50, 2017.
- [13] I. J. Groves and N. Coleman, "Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease," *Journal of Pathology*, vol. 1, no. January, pp. 527–538, 2015.
- [14] H. Jiménez-Wences, O. Peralta-Zaragoza, and G. Fernández-Tilapa, "Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review)," *Oncology Reports*, vol. 31, no. 6, pp. 2467–2476, 2014.
- [15] S. A. Wajed, P. W. Laird, and T. R. DeMeester, "DNA methylation: an alternative pathway to cancer.," *Annals of surgery*, vol. 234, no. 1, pp. 10–20, 2001.
- [16] F. Perri, F. Longo, M. Giuliano, F. Sabbatino, G. Favia, F. Ionna, R. Addeo, G. D. Vittoria, G. D. Lorenzo, and S. Pisconti, "Epigenetic control of gene expression : Potential implications for cancer treatment," *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, vol. 111, pp. 166–172, 2017.
- [17] S. Venkatesh and J. L. Workman, "Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 16, p. 178, feb 2015.

- [18] N. Ahuja, A. R. Sharma, and S. B. Baylin, "Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer," *Annu Rev Med.*, vol. 67, pp. 73–89, 2016.
- [19] M. A. Dawson and T. Kouzarides, "Cancer epigenetics: From mechanism to therapy," *Cell*, vol. 150, no. 1, pp. 12–27, 2012.
- [20] L. D. Moore, T. Le, and G. Fan, "DNA methylation and its basic function," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23–38, 2013.
- [21] S. Zakhari, "Alcohol metabolism and epigenetics changes.," *Alcohol research : current reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 6–16, 2013.
- [22] Y. D. Bhutia, E. Babu, S. Ramachandran, S. Yang, M. Thangaraju, and V. Ganapathy, "SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms.," *The Biochemical journal*, vol. 473, no. 9, pp. 1113–24, 2016.
- [23] S. Bhat, S. P. Kabekkodu, A. Noronha, and K. Satyamoorthy, "Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer," *Biochimie*, vol. 121, pp. 298–311, 2016.
- [24] S. Sharma, T. K. Kelly, and P. A. Jones, "Epigenetics in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 27–36, 2009.
- [25] A. Deaton and A. Bird, "CpG islands and the regulation of transcription," *Genes & Development*, vol. 25, no. 10, pp. 1010–1022, 2011.
- [26] R. S. Illingworth and A. P. Bird, "CpG islands - 'A rough guide'," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 11, pp. 1713–1720, 2009.
- [27] Y. A. Medvedeva, M. V. Fridman, N. J. Oparina, D. B. Malko, E. O. Ermakova, I. V. Kulakovskiy, A. Heinzl, and V. J. Makeev, "Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, 2010.
- [28] A. Portela and M. Esteller, "Epigenetic modifications and human disease," *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 10, pp. 1057–1068, 2010.

- [29] P. A. Jones and S. B. Baylin, "The Epigenomics of Cancer," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 683–692, 2007.
- [30] S. B. Baylin and P. A. Jones, "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications," *Nature reviews. Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. 726–734, 2011.
- [31] E. Prokhortchouk and P. A. Defossez, "The cell biology of DNA methylation in mammals," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1783, no. 11, pp. 2167–2173, 2008.
- [32] C. Ambrosi, M. Manzo, and T. Baubec, "Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation," *Journal of Molecular Biology*, vol. 429, no. 10, pp. 1459–1475, 2017.
- [33] S. B. Baylin, "Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 12, pp. 331–337, oct 2002.
- [34] G. P. Pfeifer, "Defining driver DNA methylation changes in human cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 4, pp. 1–13, 2018.
- [35] J. K. Stephen, K. M. Chen, S. Havard, G. Harris, and M. J. Worsham, "Cancer Epigenetics," *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*, vol. 863, no. November 1950, pp. 187–206, 2012.
- [36] A. Chatterjee, E. J. Rodger, and M. R. Eccles, "Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 51, no. August 2017, pp. 149–159, 2018.
- [37] I. M. Smith, C. A. Glazer, S. K. Mithani, M. F. Ochs, W. Sun, S. Bhan, A. Vostrov, Z. Abdullaev, V. Lobanenko, A. Gray, C. Liu, S. S. Chang, K. L. Ostrow, W. H. Westra, S. Begum, M. Dhara, and J. Califano, "Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testis antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 3, 2009.

- [38] Y. A. Medvedeva, A. M. Khamis, I. V. Kulakovskiy, W. Ba-Alawi, M. S. I. Bhuyan, H. Kawaji, T. Lassmann, M. Harbers, A. R. Forrest, and V. B. Bajic, "Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites," *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–12, 2014.
- [39] A. Lazarovici, T. Zhou, A. Shafer, A. C. Dantas Machado, T. R. Riley, R. Sandstrom, P. J. Sabo, Y. Lu, R. Rohs, J. A. Stamatoyannopoulos, and H. J. Bussemaker, "Probing DNA shape and methylation state on a genomic scale with DNase I," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 16, pp. 6376–6381, 2013.
- [40] Q. Du, P. L. Luu, C. Stirzaker, and S. J. Clark, "Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome," *Epigenomics*, vol. 7, no. 6, pp. 1051–1073, 2015.
- [41] W. Cho, "An omics perspective on cancer research," *Springer Netherlands*, pp. 1–269, 2010.
- [42] A. Szalmás and J. Kónya, "Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 144–152, 2009.
- [43] P. Sen, P. Ganguly, and N. Ganguly, "Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer," *Oncology Letters*, vol. 15, no. 1, pp. 11–22, 2018.
- [44] A. Dueñas-González, M. Lizano, M. Candelaria, L. Cetina, C. Arce, and E. Cervera, "Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives," *Molecular Cancer*, vol. 24, pp. 1–24, 2005.
- [45] N. S. L. Yeo-Teh, Y. Ito, and S. Jha, "High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 6, p. 1706, 2018.
- [46] P. B. Becker and J. L. Workman, "Nucleosome Remodeling and Epigenetics," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 9, p. a017905, 2013.

- [47] C. H. Hsu, K. L. Peng, H. C. Jhang, C. H. Lin, S. Y. Wu, C. M. Chiang, S. C. Lee, W. C. Yu, and L. J. Juan, "The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription," *Oncogene*, vol. 31, no. 18, pp. 2335–2349, 2012.
- [48] H. Zimmermann, R. Degenkolbe, H.-u. Bernard, and M. J. O. Connor, "The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP / p300," *J Virol.*, vol. 73, no. 8, pp. 6209–6219, 1999.
- [49] B. Yang, S. Miao, L.-n. Zhang, H.-b. Sun, Z.-n. Xu, and C.-s. Han, "Correlation of CCNA1 Promoter Methylation with Malignant Tumors : A Meta-Analysis Introduction," *BioMed Research International*, vol. 2015, 2015.
- [50] S. Ropero and M. Esteller, "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer," *Molecular Oncology*, vol. 1, pp. 19–25, 2007.
- [51] A. Brehm, S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides, "The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth.pdf," *The EMBO Journal*, vol. 18, no. 9, pp. 2449–2458, 1999.
- [52] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [53] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, "Regulation of cancer cell metabolism," *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 85–95, 2011.
- [54] J. R. Cantor and D. M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces," *Cancer Discovery*, vol. 2, no. 10, pp. 881–898, 2012.
- [55] P. S. Ward and C. B. Thompson, "Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 297–308, 2012.

- [56] A. N. McCracken and A. L. Edinger, "Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 1, pp. 1–9, 2013.
- [57] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism," *Cell Metab*, vol. 23, no. 1, pp. 27–47, 2016.
- [58] L. Lin, S. W. Yee, R. B. Kim, and K. M. Giacomini, "SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 14, no. 8, pp. 543–560, 2015.
- [59] V. Pucino, D. Cucchi, and C. Mauro, "Lactate transporters as therapeutic targets in cancer and inflammatory disease," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 22, no. 9, pp. 735–743, 2018.
- [60] M. J. Coady, M.-H. Chang, F. M. Charron, C. Plata, B. Wallendorff, J. F. Sah, S. D. Markowitz, M. F. Romero, and J.-Y. Lapointe, "The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter.," *The Journal of physiology*, vol. 557, no. Pt 3, pp. 719–731, 2004.
- [61] S. Miyauchi, E. Gopal, Y. J. Fei, and V. Ganapathy, "Functional Identification of SLC5A8, a Tumor Suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na⁽⁺⁾-coupled Transporter for Short-chain Fatty Acids," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 14, pp. 13293–13296, 2004.
- [62] S. Elangovan, R. Pathania, S. Ramachandran, S. Ananth, R. N. Padia, S. R. Srinivas, E. Babu, L. Hawthorn, P. V. Schoenlein, T. Boettger, S. B. Smith, P. D. Prasad, V. Ganapathy, and M. Thangaraju, "Molecular Mechanism of SLC5A8 Inactivation in Breast Cancer," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 33, no. 19, pp. 3920–3935, 2013.
- [63] E. Gopal, Y. J. Fei, S. Miyauchi, L. Zhuang, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, "Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by slc5a8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family.," *The Biochemical journal*, vol. 388, no. Pt 1, pp. 309–16, 2005.

- [64] E. Gopal, Y. J. Fei, M. Sugawara, S. Miyauchi, L. Zhuang, P. Martin, S. B. Smith, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, "Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na⁺-coupled transport of lactate," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 43, pp. 44522–44532, 2004.
- [65] V. Ganapathy, M. Thangaraju, E. Gopal, P. M. Martin, S. Itagaki, S. Miyauchi, and P. D. Prasad, "Sodium-coupled Monocarboxylate Transporters in Normal Tissues and in Cancer," *The AAPS Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 193–199, 2008.
- [66] H. Li, L. Myeroff, D. Smiraglia, M. F. Romero, T. P. Pretlow, L. Kasturi, J. Lutterbaugh, R. M. Rerko, G. Casey, J. P. Issa, J. Willis, J. K. Willson, C. Plass, and S. D. Markowitz, "SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 14, pp. 8412–8417, 2003.
- [67] M. Thangaraju, S. Ananth, P. M. Martin, P. Roon, S. B. Smith, E. Sterneck, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, "C/Ebp δ Null Mouse As a Model for the Double Knock-Out of Slc5a8 and Slc5a12 in Kidney," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 37, pp. 26769–26773, 2006.
- [68] M. Thangaraju, G. Cresci, S. Itagaki, J. Mellinger, D. D. Browning, F. G. Berger, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, "Sodium-Coupled Transport of the Short Chain Fatty Acid Butyrate by SLC5A8 and Its Relevance to Colon Cancer," *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 12, no. 10, pp. 1773–1782, 2008.
- [69] J. R. Davie, "Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate," *J. Nutr*, vol. 133, no. Supplement, pp. 2485S–2493S, 2003.
- [70] V. Coothankandaswamy, S. Elangovan, N. Singh, P. D. Prasad, M. Thangaraju, and V. Ganapathy, "The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumor progression through depletion of survivin without involving its transport function," *Biochem J.*, vol. 450, no. 1, pp. 169–178, 2013.

- [71] M. Thangaraju, E. Gopal, P. M. Martin, S. Ananth, S. B. Smith, P. D. Prasad, E. Sterneck, and V. Ganapathy, "SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases," *Cancer Research*, vol. 66, no. 24, pp. 11560–11564, 2006.
- [72] M. Thangaraju, K. N. Carswell, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, "Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3.," *The Biochemical journal*, vol. 417, no. 1, pp. 379–389, 2009.
- [73] M. Esteller, "Epigenetics in Cancer," *N Engl J Med*, vol. 358, no. 11, pp. 1148–1159, 2008.
- [74] P. Chomczynski and N. Sacchi, "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.," *Anal. Biochem.*, vol. 162, pp. 156–159, 1987.
- [75] K. Sotlar, D. Diemer, A. Dethleffs, Y. Hack, A. Stubner, N. Vollmer, S. Menton, M. Menton, K. Dietz, D. Wallwiener, R. Kandolf, and B. Bültmann, "Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR," *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 7, pp. 3176–3184, 2004.
- [76] M. K. Skinner, "Epigenetics: A Reference Manual edited by Jeffrey M. Craig and Nicholas C. Wong," *The Quarterly Review of Biology*, vol. 88, no. 4, pp. 351–352, 2013.
- [77] M. Esteller, "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5427–5440, 2002.
- [78] C. Bock, S. Reither, T. Mikeska, M. Paulsen, and T. Lengauer, "BiQ Analyzer : visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 21, pp. 4067–4068, 2005.

- [79] V. Ganapathy, M. Thangaraju, and P. D. Prasad, "Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 121, no. 1, pp. 29–40, 2009.
- [80] J. Y. Park, D. Kim, M. Yang, H. Y. Park, S. H. Lee, M. Rincon, J. Kneahling, C. Plass, D. J. Smiraglia, M. S. Tockman, and S. J. Kim, "Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 79, no. 3, pp. 198–204, 2013.
- [81] H. Y. Lin, H. Y. Park, S. Radlein, N. P. Mahajan, T. A. Sellers, B. Zachariah, J. Pow-Sang, D. Coppola, V. Ganapathy, and J. Y. Park, "Protein expressions and genetic variations of SLC5A8 in prostate cancer risk and aggressiveness," *Urology*, vol. 78, no. 4, pp. 971.e1–971.e9, 2011.
- [82] H. J. Yang, "Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis," *Chinese Journal of Cancer*, vol. 32, no. 1, pp. 42–48, 2013.
- [83] Z. Huang, C. F. Bassil, and S. K. Murphy, *Methylation-Specific PCR*, pp. 75–82. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
- [84] N. Yamada and S. Yonezawa, "Understanding Epigenetic Status: DNA Methylation and Cancer," *Journal of Cancer Biology & Research*, vol. 1, no. 2, p. 1008, 2013.
- [85] Y. Zhang, Y. L. Bao, Y. Wu, C. L. Yu, Y. Sun, and Y. X. Li, "Identification and characterization of the human SLC5A8 gene promoter," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 196, no. 2, pp. 124–132, 2010.
- [86] P. K. Sengupta and B. D. Smith, "Methylation in the initiation region of the first exon suppresses collagen pro- $\alpha 2(I)$ gene transcription," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1443, pp. 75–89, 1998.
- [87] F. Brenet, M. Moh, P. Funk, E. Feierstein, A. J. Viale, N. D. Socci, and J. M. Scandura, "DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, p. e14524, 2011.

- [88] B. Baron, "Breaking the Silence : The Interplay Between Transcription Factors and DNA Methylation," *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment", book edited by Anica Dricu, ISBN 978-953-51-0881-8, Published: November 28, 2012 under CC BY 3.0 license, pp. 11–13, 2012.
- [89] Y. Kondo, "Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers," *Yonsei Medical Journal*, vol. 50, no. 4, pp. 455–463, 2009.
- [90] G. D. Ginder and D. C. Williams, "Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 184, pp. 98–111, 2018.
- [91] M. Lavallée-Adam, P. Cloutier, B. Coulombe, and M. Blanchette, "Functional 5 UTR motif discovery with LESMoN: Local Enrichment of Sequence Motifs in biological Networks," *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. 18, pp. 10415–10427, 2017.
- [92] Y. Chen, Y. Chen, Y. Chang, C. Wu, Y. Ko, S. Tsao, J. Chen, and S. Lin, "Epstein-Barr Virus Rta-Mediated Accumulation of DNA Methylation Interferes with CTCF Binding in both Host and Viral Genomes," *Journal of Virology*, vol. 91, no. 15, pp. e00736–17, 2017.
- [93] D. J. Wong, S. A. Foster, D. A. Galloway, and B. J. Reid, "Progressive Region-Specific De Novo Methylation of the p16 CpG Island in Primary Human Mammary Epithelial Cell Strains during Escape from M0 Growth Arrest," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 8, pp. 5642–5651, 1999.
- [94] C. Stirzaker, D. S. Millar, C. L. Paul, P. M. Warnecke, J. Harrison, P. C. Vincent, M. Frommer, and S. J. Clark, "Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors," *Cancer Research*, vol. 57, no. 11, pp. 2229–2237, 1997.
- [95] M. S. Turker, "Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation.," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5388–5393, 2002.

- [96] S. P. Whitman, B. Hackanson, S. Liyanarachchi, S. Liu, L. J. Rush, K. Maharry, D. Margeson, R. Davuluri, J. Wen, T. Witte, L. Yu, C. Liu, C. D. Bloomfield, G. Marcucci, C. Plass, and M. A. Caligiuri, "DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication.," *Blood*, vol. 112, no. 5, pp. 2013–6, 2008.
- [97] Z. Jiang, X. Li, J. Hu, D.-r. Lu, W. Zhou, Y.-q. Jiang, and C.-y. Li, "The methylation and mRNA expression of SLC5A8 and TMS1/ASC genes in human glioma," *Zhonghua yi xue za zhi*, vol. 87, pp. 292–297, 2007.
- [98] S. M. Wilting, W. Verlaat, A. Jaspers, N. A. Makazaji, R. Agami, C. J. Meijer, P. J. Snijders, and R. D. Steenbergen, "Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis," *Epigenetics*, vol. 8, no. 2, pp. 220–228, 2013.
- [99] M. Stich, L. Ganss, J. Puschhof, E.-s. Prigge, M. Reuschenbach, A. Guterrez, S. Vinokurova, and M. Von, "5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells," *Oncotarget*, vol. 8, no. 32, pp. 52104–52117, 2017.
- [100] G. D. Chen, D. Y. Qian, Z. G. Li, G. Y. Fan, K. L. You, and Y. L. Wu, "Down-regulation of p16 and MGMT promotes the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of 5-Aza-dC and radiation on cervical cancer cells," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 35, no. 8, pp. 488–496, 2017.
- [101] R.-K. Lin, C.-Y. Wu, J.-W. Chang, L.-J. Juan, H.-S. Hsu, C.-Y. Chen, Y.-Y. Lu, Y.-A. Tang, Y.-C. Yang, P.-C. Yang, and Y.-C. Wang, "Dysregulation of p53 / Sp1 Control Leads to DNA Methyltransferase-1 Overexpression in Lung Cancer," *Cancer Research*, vol. 70, no. 14, pp. 5807–5818, 2010.
- [102] M. M. Oshiro, G. S. Watts, R. J. Wozniak, D. J. Junk, J. L. Munoz-Rodriguez, F. E. Domann, and B. W. Futscher, "Mutant p53 and aberrant cytosine methylation

cooperate to silence gene expression," *Oncogene*, vol. 22, no. 23, pp. 3624–3634, 2003.

- [103] L. Vrba, D. J. Junk, P. Novak, and B. W. Futscher, "p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters," *BMC Genomics*, vol. 9, p. 486, 2008.
- [104] E. D. Michelakis, L. Webster, and J. R. Mackey, "Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 99, no. 7, pp. 989–994, 2008.