



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LABORATORIO DE VIROLOGÍA

**Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las
variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16
en la metilación de genes relacionados con
adhesión, migración e invasión celular**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Q.B.P Huri Haziel Luviano Jaimes

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Oscar Del Moral Hernández

CODIRECTOR: Dr. Daniel Hernández Sotelo

ASESOR EXTERNO: Dr. Alfredo Hidalgo Miranda



Chilpancingo de los Bravo, Gro. Julio de 2021

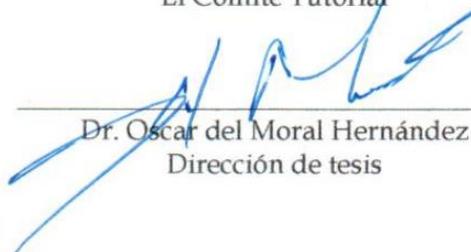


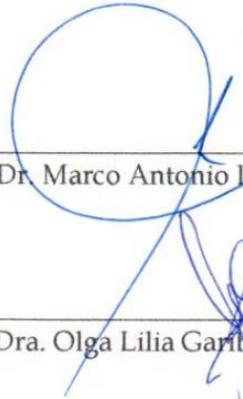
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil veinte, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular", presentada por el alumno Huri Haziel Luviano Jaimes, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Oscar del Moral Hernández
Dirección de tesis


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres


Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Vo. Bo

Vo. Bo



UAGro

FCQB

Maestría en Ciencias Biomédicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021

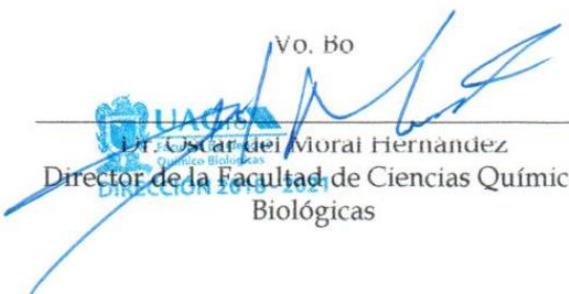

Dr. Oscar del Moral Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

UAGro

FCQB

Maestría en Ciencias Biomédicas

DIRECCIÓN 2018 - 2021


Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología y el Laboratorio de Epigenética del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad autónoma de Guerrero.

Bajo la Dirección de:

Dr. Oscar del Moral Hernández

La Codirección de:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

La asesoría de:

Dra. Luz Del Carmen Alarcón Romero

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Huri Haziél Luviano Jaimes, percibió el apoyo para la formación de recursos humanos, por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU: 922954.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Oscar por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza, paciencia, y motivación para concluir este proyecto. Pero sobre todo por su sincera amistad y por todos esos momentos compartidos con mis hermanos académicos dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias.

Al Dr. Daniel Hernández Sotelo, mi codirector. Gracias por su amistad, su apoyo y orientación en la realización de este proyecto.

Quiero agradecer a mi comité tutorial:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero.

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres.

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez.

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda.

Por su amistad, su tiempo, sus aportaciones y consejos para la culminación de este trabajo, que fueron de gran ayuda.

Al Dr. Fredy Omar Beltrán Anaya, por apoyarme en los análisis de metilación. Por resolver mis dudas cuando lo solicite, sobre todo por tu amistad, muchas gracias.

A la C. Dra. Jaqueline Loeza Lozano, por orientarme y ayudarme durante la realización de las PCR-SM.

Al Laboratorio de Biomoléculas por permitirme trabajar en el cuarto de cultivo celular, donde se realizó parte del trabajo.

Al Laboratorio de Biomedicina y Epigenética del Cáncer por su apoyo, asesoría técnica y por permitirme trabajar un tiempo con ustedes.

A mis amigos, por todo su apoyo emocional, cuando la frustración llegaba. Por todas las vivencias compartidas, por estar siempre ahí cuando los necesite. Muchas gracias a todos ustedes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme formar parte del programa nacional de becas

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA E6
DE LAS VARIANTES AA-a, E-G350 Y E-A176/G350 DEL
VPH-16 EN LA METILACIÓN DE GENES RELACIONADOS
CON ADHESIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR**

Índice

Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	3
3. Resultados	6
4. Discusión	16
5. Conclusión	21
6. Perspectivas	22
7. Referencias	23
Anexos	28

Resumen

Diversos estudios han demostrado que la hipermetilación del DNA es una de las principales alteraciones que ocurren con mayor frecuencia en el establecimiento del carcinoma cervical. Ya se ha demostrado que la oncoproteína E6 del VPH promueve la expresión de las DNA metiltransferasas vía dependiente de p53. Además, se ha informado que la presencia de variaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican a la oncoproteína E6 del VPH, les podría conferir distinto potencial oncogénico; por lo tanto, las distintas variantes de E6 podrían tener un efecto diferente en la regulación de la actividad de las DNA metiltransferasas y con ello en la regulación de la expresión vía metilación. En nuestro estudio evaluamos el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH-16 en la expresión y metilación de genes regulados negativamente en procesos celulares característicos del cáncer. Para determinar este efecto, analizamos el estado de metilación de los promotores de los genes mediante PCR-SM con previa modificación del DNA con bisulfito de sodio y determinamos el nivel de expresión de los genes antes y posterior a un agente demetilante (5-AzaDC). Nuestros resultados muestran, que la expresión de la oncoproteína E6 puede modular la expresión de los genes TNFRFS10A, PCDHB3, CLND11 y CDH13 mediante la alteración en los patrones de metilación de sus promotores. En conjunto nuestros datos sugieren que las variantes de la oncoproteína E6 tienen diferente capacidad para regular la metilación y expresión de estos genes.

Palabras clave: Metilación del DNA, Oncoproteína E6, Variantes, VPH-16.

Abstract

Several studies have shown that DNA hypermethylation is one of the main alterations that occur with greater frequency in the establishment of cervical carcinoma. The VPH E6 oncoprotein has already been shown to promote the expression of DNA methyltransferases via the p53-dependent pathway. Furthermore, it has been reported that the presence of variations in the nucleotide sequence encoding the VPH E6 oncoprotein could confer different oncogenic potential; therefore, the different E6 variants could have a different effect on the regulation of DNA methyltransferase activity and thus on the regulation of expression via methylation. In our study, we evaluated the effect of the expression of the E6 oncoprotein variants of VPH-16 on the expression and methylation of negatively regulated genes in cellular processes characteristic of cancer. To determine this effect, we analyzed the methylation status of the promoters of the PCR-SM genes with previous modification of the DNA with sodium bisulfite and we determined the expression level of the genes before and after a demethylating agent (5-AzaDC). Our results show that the expression of the E6 oncoprotein can modulate the expression of the TNRF510A, PCDHB3, CLDN11 and CDH13 genes by altering the methylation patterns of their promoters. Taken together, our data suggest that the E6 oncoprotein variants have different capacities for regular methylation and expression of these genes.

Keywords: DNA methylation, E6 oncoprotein, Variants, VPH-16.

1. Introducción

El carcinoma cervical (CC) es el cuarto tipo de cáncer más común que afecta a las mujeres alrededor del mundo; con 339,022 muertes de acuerdo a la última actualización del Globocan en 2020. Ya se ha demostrado que el principal factor de riesgo que contribuye al desarrollo de esta patología es la infección persistente con genotipos virales de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano (VPH-AR) como el VPH-16 y el VPH-18 [1,2]. El mecanismo de oncogenicidad de los VPH-AR se debe a la acción de las oncoproteínas virales E6 y E7 [3,4]; en conjunto alteran diversas vías de señalización que contribuyen al desarrollo del cáncer, como la diferenciación celular, la respuesta inmune, el ciclo celular, la apoptosis, la migración y la adhesión celular [5-8].

Una de las principales alteraciones que ocurren frecuentemente en el establecimiento y progresión de CC es la hipometilación global de oncogenes y de elementos transponibles; así como la hipermetilación localizada de islas CpG asociadas a la región promotora de genes supresores de tumor (TSG) y de los genes involucrados en los procesos de regulación de la proliferación celular, apoptosis, adhesión célula-célula, angiogénesis, invasión, metástasis y la reparación del DNA [9,10]. La metilación del DNA constituye uno de los principales mecanismos epigenéticos que participan en la regulación de la expresión de genes [11]. El proceso de metilación del DNA es catalizado por las DNA metiltransferasas (DNMT's), una familia de enzimas conformado por DNMT1, DNMT3a y DNMT3b que transfieren un grupo metilo (-CH₃) de la S-adenil metionina (SAM) al carbono 5 de las citosinas en dinucleótidos CpG para formar 5-metilcitosina (5mC) [12, 13]. Por lo que alteraciones en el funcionamiento y en la regulación de las DNMT's conducen a su actividad aberrante [14].

La hipermetilación del DNA promueve la formación de complejos represores de la transcripción como MeCP1y MeCP2, el reclutamiento de proteínas con dominio de unión a los CpG metilados (MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4), deacetilasas de histonas (HDAC1 y HDAC2) e histonas metiltransferasas (SETDB1) [15-17]. La formación de estos complejos de proteínas induce la remodelación de la cromatina y la formación

de obstáculos alostéricos, que evitan la unión de los factores de transcripción a sus promotores diana evitando así la expresión [18].

Numerosos estudios han sugerido que las variaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican el gen E6 podrían influir en el potencial oncogénico del virus, al modificar la afinidad de unión a proteínas celulares blanco y de esta manera contribuir de manera distinta al riesgo a desarrollar CC [19-21]. Se ha reportado que la infección por variantes asiático-americanas de VPH-16 incrementa el riesgo de desarrollar CC de manera temprana, promoviendo un alto grado de hiperplasia con células altamente proliferativas en comparación con las variantes europeas [22, 23]. Así mismo, otro estudio reveló que la variante E-G350 promueve la inmortalización y la regulación negativa de E-Cadherina en mayor proporción que las variantes E-Prototipo y AA-a en un modelo de queratinocitos transducidos [24]. En el sur de México se reportó que las variantes de la oncoproteína E6 del VPH-16 más prevalentes en esta región geográfica (E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 y E-A176/G350) son capaces de modificar los perfiles de expresión de genes codificantes involucrados en eventos clave para el desarrollo tumoral, siendo las variantes E-G350 y AA-c las que tuvieron mayor efecto [25]. También se ha reportado, que la oncoproteína E6 del VPH-16 es capaz de regular positivamente la expresión de las DNMT's a través de la degradación de p53 vía proteasoma [26]. Se ha demostrado que p53 regula negativamente la expresión DNMT's al formar un complejo represor con el factor de transcripción Sp1 y otras proteínas modificadoras de la cromatina en la región promotora de las DNMTs; por lo que E6 al promover la degradación de p53 libera a la proteína Sp1 y propicia el aumento en la transcripción de las DNMT's conllevando a la metilación aberrante del DNA [27, 28].

En estudios realizados previamente en el laboratorio, se encontró que células transfectadas con las variantes AA-a, E-G350 y E-Prototipo desregulan en mayor proporción mecanismos celulares que favorecen el desarrollo tumoral en comparación con las demás variantes. Sin embargo, se desconoce la vía molecular por la cual es afectada la expresión de genes relacionados. También se encontró que las variantes E-G350, AA-a y E-A176/G350 de E6 del VPH-16 incrementan la expresión de las

DNMT's en comparación a las demás variantes. A la fecha no existen estudios que evalúen el efecto de las variantes de E6 del VPH-16 en el perfil de metilación de genes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la expresión de las variantes de la oncoproteína E6 del VPH-16 en la expresión y metilación de genes regulados negativamente en procesos celulares característicos del cáncer.

2. Materiales y métodos

2.1 Recopilación de datos y Análisis de los niveles de expresión de genes en las variantes

Los datos crudos de expresión, se recuperaron del repositorio de datos genómicos GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE73761; este conjunto de datos incluye datos de 16 cultivos celulares con las siguientes condiciones experimentales: Células C33-A no transfectada (WT) y C33-A transfectadas con: 1) Mock, 2) Variantes de E6 del VPH16: E-Prototipo, E-G350, E-A176/G350, E-C188/G350, AA-a y AA-c por duplicado. Las intensidades de señal de matriz descargadas (.CEL) se normalizaron utilizando *robust multiarray analysis* (RMA) para corregir las señales de fondo. Para definir los niveles de expresión diferencial entre las variantes y C33-A/Mock los datos normalizados se procesaron utilizando la consola de análisis de transcriptoma (TAC.4.0.1) de *Afflymetrix*. Los genes con un Fold Change ≥ 1.5 o ≤ -1.5 y con un valor de $p \leq 0.05$ se consideraron significativamente alterados entre las condiciones. Para eliminar el posible sesgo asociado a la transfección fueron eliminados aquellos genes que se alteraron entre C33-A/WT Vs C33-A/Mock. Los genes se reanotaron utilizando BioMart. Para identificar los procesos biológicos donde participan los genes subexpresados por las variantes de E6 utilizamos el *software* DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Se consideró significativo cualquier proceso con una puntuación de enriquecimiento superior a 0.5.

2.2 Cultivo celular

Las células C33-A transfectadas establemente con el gen E6 del VPH-16 de las variantes AA-a, E-A176/G350 y E-G350 fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) (*Corning Subsidiary Manassas, USA, Cat.*

No. 50-003-PBR), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB) (*Byproductos*, México), 1% de estreptomina/penicilina (*CAISSON LABORATORIES Inc.*, USA, Cat. No. PSL01) y 1% de geneticina G418 (*EMD Millipore corp.*, USA, Cat. No. 345812). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

2.3 Cuantificación del mRNA por RT-qPCR

El RNA fue extraído de las células transfectadas usando el reactivo TRizol® LS Reagent (*Ambion® by Life Technologies™*, Cat. No. 10296028, USA). El cDNA se obtuvo por transcripción reversa utilizando 500 ng de RNA, enzima SuperScript™ III (200 U/μl), DTT (4μl) (*INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific*, Cat. No 18080-044, USA) y oligo dT (0.5 μg/μl) (*Thermo Scientific*, Cat. No. MAN0013109, USA). Para llevar a cabo la amplificación y cuantificación de los genes se realizó qRT-PCR empleando SYBR®Green (*Thermo Scientific*, Cat. No. K0222, USA.), y el sistema *QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems* de *Applied Biosystem* utilizando los *primers* descritos en la tabla suplementaria 1. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta ct}$, ajustados a la expresión del gen endógeno Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

2.4 PCR sensible a metilación

Para determinar el estado de metilación de los genes TNRF510A, CDH13, CLDN11 y PCDHB3 se realizó PCR-SM. En resumen, se modificaron 2 μg de DNA genómico con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (*Zymo Research*; Irvine, CA, USA). La SM-PCR se realizó utilizando Amplitaq Gold Master Mix (*Applied Biosystems*; Foster City, CA, EE. UU.) De acuerdo con el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización, 95°C durante 10 min; para los genes TNRF510A y CLDN11 la TM fue de 63°C, para CDH13 60°C y PCDHB3 58°C con una extensión final de 72°C durante 5 min a 38, 37, 40 y 35 ciclos respectivamente. Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la tabla suplementaria 2. Los productos de la PCR-SM fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico se realizó con el *software* Image Studio Lite Ver 5.2

2.5 Tratamiento con 5-aza

Las células bajo las condiciones de cultivo descritas en el punto 2.2 fueron sometidas a tratamiento con 10 μ M/mL de 5-azaDC (*Sigma-Aldrich*, Cat. No. A3656-10MG, USA) durante 72 horas, cambiando el medio cada 24 horas, se utilizó el vehículo correspondiente como control.

2.6 Análisis de datos de metilación de genes de las variantes.

A partir de los datos de metilación normalizados obtenidos del arreglo Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, Inc) de cada una de las variantes en estudio. Seleccionamos los valores β de cada una de los sitios CpGs correspondientes a los 11 genes subexpresados. Los datos de la localización genómica de cada sitio CpG se obtuvo del portal de Illumina (<https://www.illumina.com/>). Para determinar los perfiles de metilación de cada uno de los genes, los sitios CpGs se ordenaron de acuerdo a su distribución y se grafico el nivel de metilación.

2.7 Análisis de datos de metilación y expresión del TCGA

Los datos de expresión y metilación normalizados de muestras de CC positivas a VPH se recuperaron del proyecto TCGA-CESC contenidos en el repositorio de datos del TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Fueron seleccionados únicamente los datos pertenecientes a las muestras positivas a VPH-16, las cuales fueron subclasificadas de acuerdo al linaje europeo o asiático-americano correspondiente.

2.8 Análisis estadístico

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de ANOVA en STATA V.13, mediante un análisis utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunnette y mediante la prueba t-student considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo.

3. Resultados

Las células C33-A/E-G350 y C33-A/E-A176/G350 modulan diferencialmente el transcriptoma de C33A por efecto de la expresión de E6

Para evaluar el perfil de expresión de genes codificantes en células C33-A inducidos por la expresión de E6 del VPH-16, se realizó un análisis exploratorio de los datos de expresión contenidos en el repositorio de datos genómicos GEO con número de acceso GSE7376; se seleccionaron únicamente los datos de expresión correspondientes a las variantes E-G350, E-A176/G350 y AA-a debido a que previamente se encontró que las células que expresan estas variantes contenían altos niveles de expresión de las DNA Metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B (Datos no mostrados). Al realizar la comparación de los perfiles de expresión encontramos que las variantes del linaje europeo alteraron la expresión de un mayor número de genes; la variante E-G350 alteró la expresión de 3,054 genes de los cuales 1,852 se encuentran sobreexpresados y 1,202 subexpresados; la variante E-A176/G350 alteró 2,519 genes (1,411 genes sobreexpresados y 1,108 genes subexpresados), por su parte la variante AA-a únicamente alteró la expresión de 1,491 genes encontrándose 843 y 648 genes sub y sobreexpresados (Fig.1A). Así mismo, para analizar que efecto tiene la expresión de E6 sobre la disminución en la expresión de genes, fueron seleccionados los genes subexpresados por las variantes en estudio, se encontró que la expresión de E6 de las variantes E-G350, E-A176/G350 y AA-a promueven la disminución en la expresión de 348, 190 y 82 genes respectivamente y 434 genes compartidos como se muestra en el diagrama de Veen (Fig.1B).

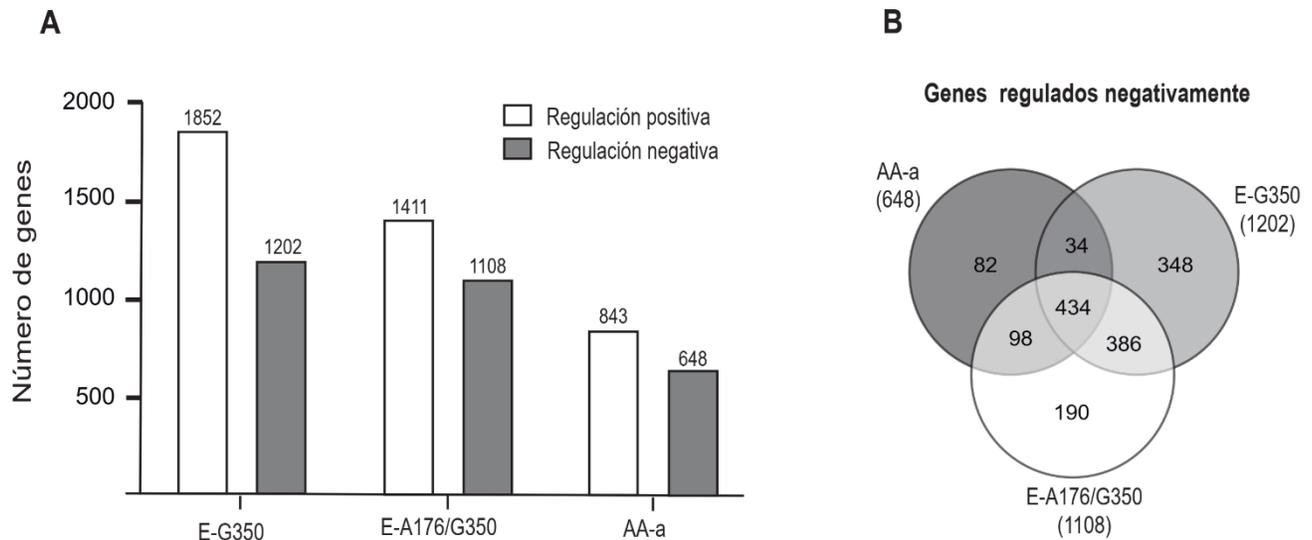


Figura 1: Perfil de expresión global de genes codificantes inducido por las variantes de la oncoproteína E6 del VPH-16 frente a Mock. (A) Las oncoproteínas E6 de las variantes difieren en su capacidad para aumentar o disminuir la expresión de genes en células C33-A. Las variantes E-G350 y E-A176/G350 alteran la mayor cantidad de genes (1852 Vs. 1202 y 1411 Vs. 1108 respectivamente). **(B)** Las variantes de oncoproteína VPH16 E6 disminuyen diferencialmente la expresión de genes en células C33-A contra Mock. Los diagramas de Veen muestran el numero de genes unicos y compartidos que disminuyen su expresión entre las células que expresan las variantes de oncoproteína E6 y Mock.

Los genes subexpresados por el efecto de la expresión de E6 de variantes del VPH-16 están involucrados en procesos relacionados con el cáncer

Con el propósito de dilucidar cuales son los procesos biológicos relevantes asociados a los genes subexpresados por el efecto de la expresión de E6, realizamos un análisis de enriquecimiento utilizando la base de datos DAVID. El análisis de enriquecimiento mostró que los genes subexpresados por las variantes se encuentran involucrados en diferentes procesos relacionados con el desarrollo tumoral como la vía de señalización Wnt, la regulación positiva de la actividad de las GTPasas, la transducción de señales, la regulación de la migración y motilidad celular, la regulación de adhesiones focales y adhesión célula-célula. (Fig. 2).

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

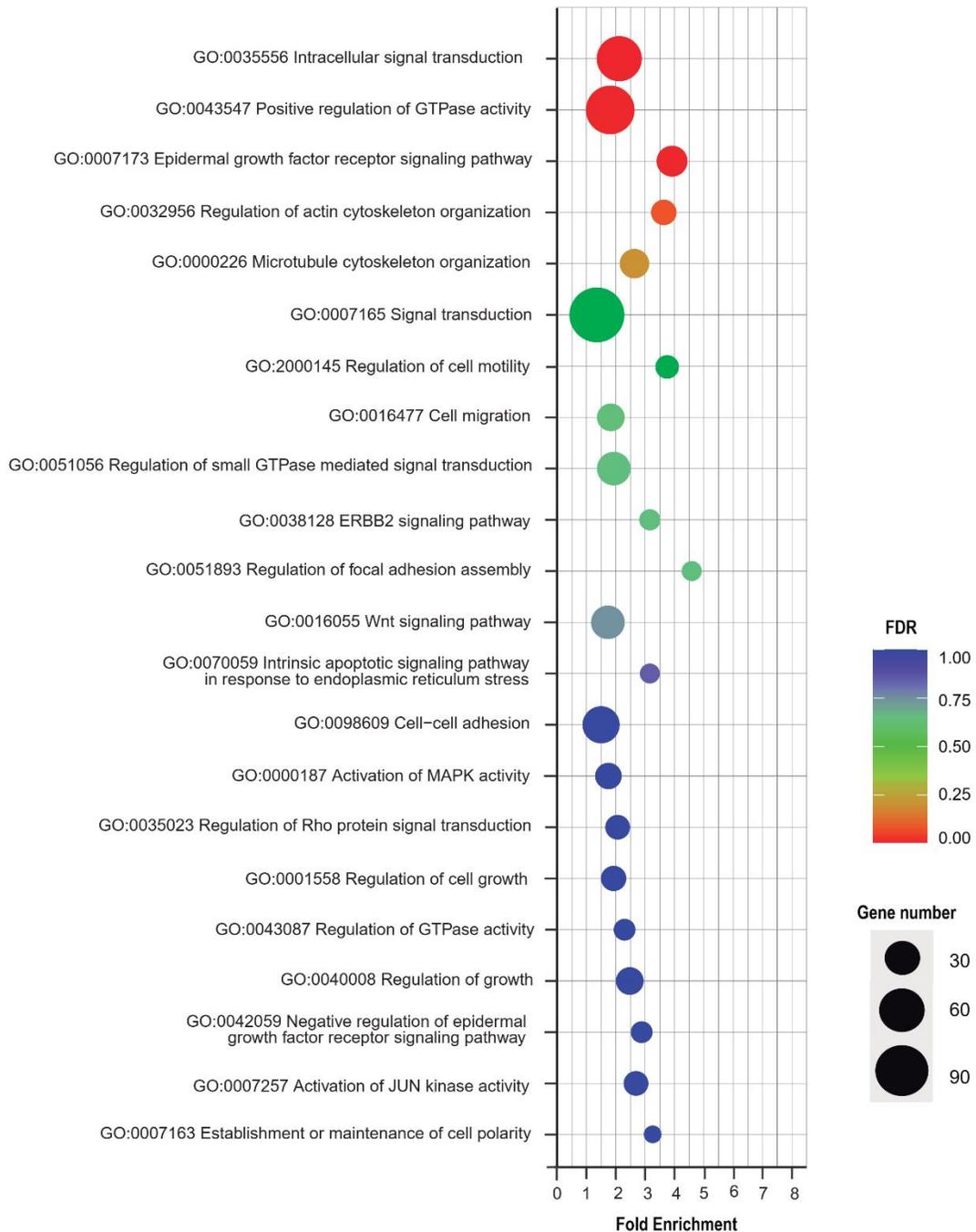


Figura 2: Enriquecimiento de los procesos biológicos de los genes subexpresados por las variantes de E6 del VPH-16. El análisis de enriquecimiento de vías, revela la participación de los genes subexpresados en vías de señalización y procesos celulares frecuentemente desregulados en el desarrollo del cáncer. Los genes se agruparon de acuerdo al proceso biológico en el cual participan. El gráfico muestra en el eje X las tasas de cambio en el enriquecimiento de procesos biológicos. El tamaño del círculo representa el número de genes involucrados y el color indica la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Todos los procesos biológicos representados en el gráfico presentarán un valor de $p \leq 0.05$.

La oncoproteína E6 de variantes del VPH-16 promueve el silenciamiento de genes involucrados en adhesión, migración e invasión celular, vía metilación de sus promotores

Para validar los datos obtenidos en el análisis exploratorio de expresión, seleccionamos un grupo de 20 genes involucrados en los procesos celulares de adhesión, migración e invasión celular para su evaluación mediante PCR en Tiempo Real. Encontramos que la expresión de la oncoproteína E6 de las tres variantes en estudio promovió disminución en la expresión de 11 genes de los 20 genes seleccionados (ANXA2, TNFRSF10A, TKT, FAT1, SFRP2, FOXA1, CDH13, CLDN11, DOCK1, THBS1 y PCDHB3) con respecto a la línea control Mock; de los cuales E6 de la variante AA-a fue la única que disminuyó la expresión de los genes SFRP2, CDH13 y CLDN11. Por otro lado, E6 de la variante E-G350 disminuyó exclusivamente al gen DOCK1 mientras que E6 de la variante E-A176/G350 lo hizo con THBS1 y PCDHB3 (**Fig. Suplementarias 1-3**).

Con la finalidad de comprender si el mecanismo molecular responsable de la disminución en la expresión de los 11 genes es debido a un proceso de metilación aberrante por la desregulación de la actividad de las DNA Metiltransferasas, analizamos los perfiles de metilación de la región promotora de cada uno de los 11 genes utilizando los datos obtenidos a partir del microarreglo de metilación *Infinium Methylation EPIC Bread Chip*. Encontramos que de los 11 genes subexpresados, únicamente TNFRSF10A, PCDHB3, CDH13 y CLDN11 mostraron cambios evidentes en los niveles de metilación en su región promotora, en comparación con el control (**Fig. Suplementarias 4-14**).

Para corroborar si las variaciones observadas en los perfiles de metilación influyen en el nivel de transcripción; determinamos los niveles de metilación y expresión en cada una de las líneas celulares transfectadas con las variantes en estudio. Encontramos que la oncoproteína E6 independientemente de la variante propicia el aumento en la metilación del promotor de TNFRSF10A (Fig.3A) y la disminución de su expresión (Fig. 3B). También observamos, que las variantes AA-a y E-A176/G350 promovieron el aumento de la metilación del promotor de CLDN11 (Fig. 3C); interesantemente, la

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

metilación inducida por la variante E-A176/G350 promovió la transcripción de CLDN11, mientras que en las células C33-A/AA-a no se pudo detectar su expresión (Fig. 3D). Con respecto a los promotores de los genes PCDHB3 y CDH13 encontramos disminución en sus niveles de metilación y una elevada transcripción de sus RNAs mensajeros, a excepción de la variante E-A176/G350 donde no encontramos cambios en comparación con el control. (Fig. 3E-3H).

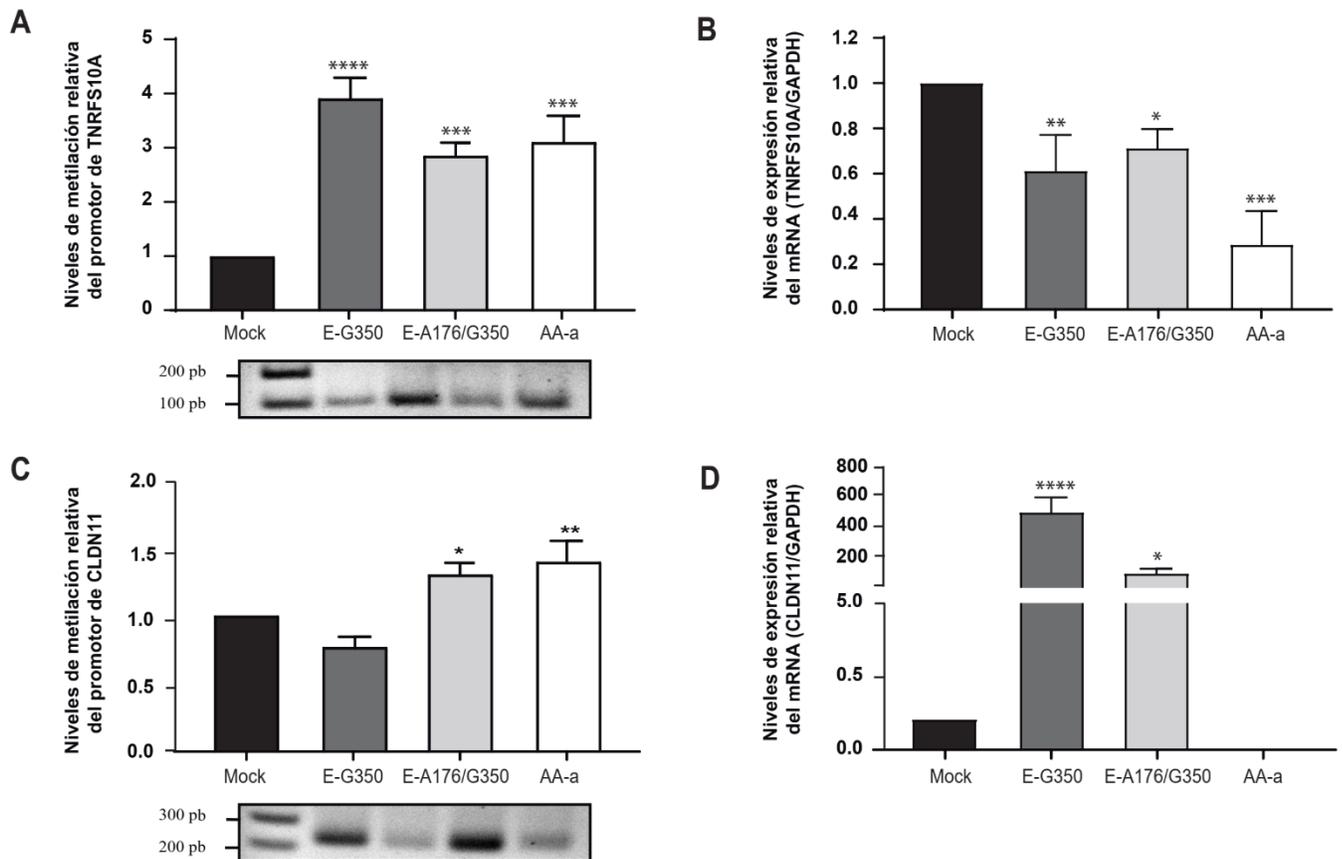


Figura 3: Niveles de metilación y expresión de los genes TNRF510A, PCDHB3, CLDN11 y CDH13 establecidos por las variantes de E6 del VPH-16. (A, B) TNRF510A. (C, D) CLDN11. (E, F) PCDHB3 (D) CDH13. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. El nivel de metilación fue determinado por densitometría de los productos generados a partir de las PCR-SM de cada uno de los genes, los productos fueron revelados en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los datos de expresión y metilación se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias fue ANOVA de una vía y la comparación múltiple de Dunnett $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.025$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$)

Continúa en la siguiente página la figura 3...

...Continuación figura 3.

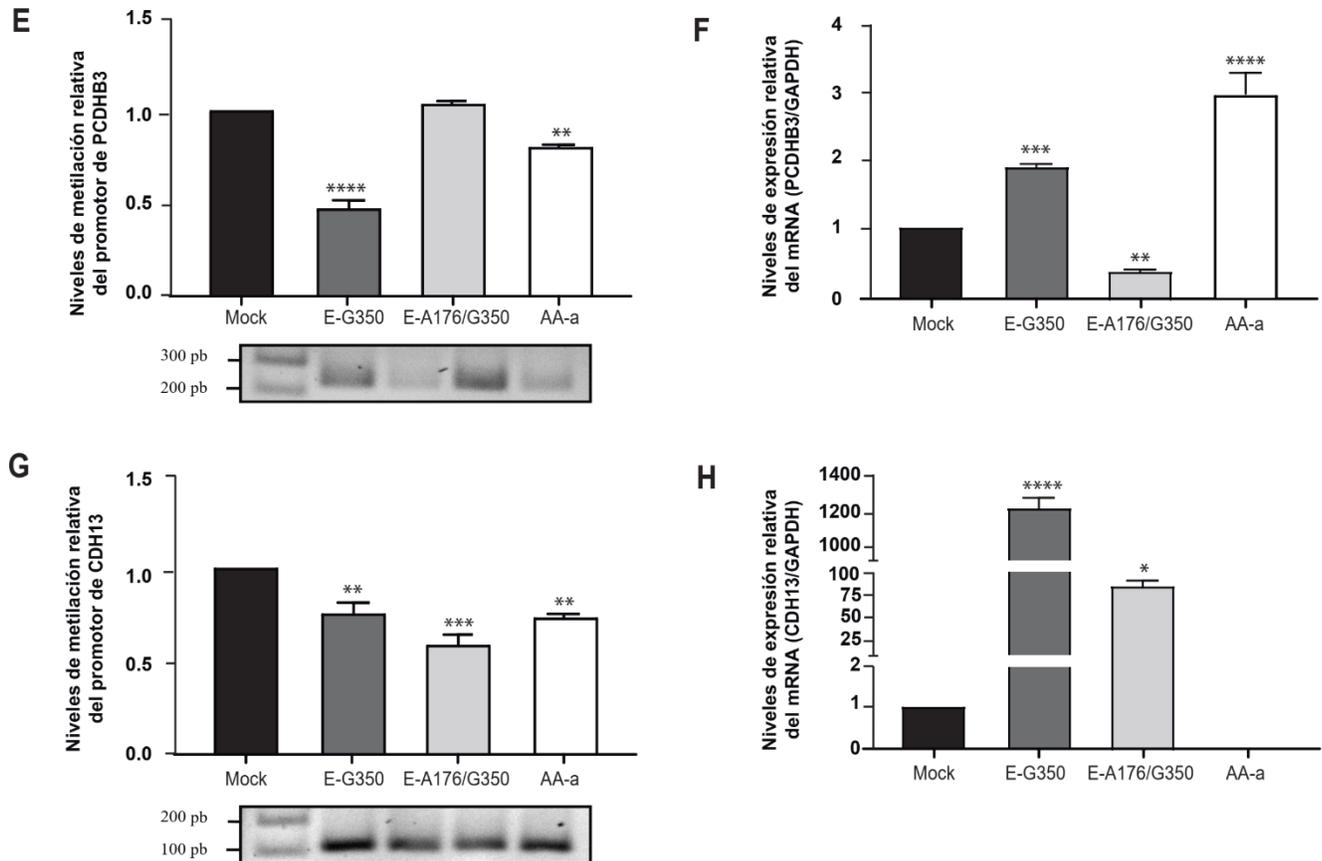


Figura 3: Niveles de metilación y expresión de los genes TNRF510A, PCDHB3, CLDN11 y CDH13 establecidos por las variantes de E6 del VPH-16. (A,B) TNRF510A. (C, D) CLDN11. (E, F) PCDHB3 (D) CDH13. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. El nivel de metilación fue determinado por densitometría de los productos generados a partir de las PCR-SM de cada uno de los genes, los productos fueron revelados en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los datos de expresión y metilación se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias fue ANOVA de una vía y la comparación múltiple de Dunette $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.025$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$)

El tratamiento con 5-Azacytidine revierte la regulación negativa de la transcripción causada por la metilación inducida por las variantes de E6 del VPH-16

Con el fin de comprobar si la metilación de la region promotora inducida por la expresion de las variantes de E6 es responsable de regular la actividad transcripcional de los genes TNFRFS10A, CLDN11, PCDHB3 y CDH13; se trataron a las celulas en cultivo con 5-Azacytidine (5-AzaDC) y se midio la actividad transcripcional antes y despues de las 72 horas de tratamiento. Encontramos que despues del tratamiento con la 5-AzaDC, la expresion de los genes TNFRFS10A y PCDHB3 aumento su expresi3n en todas las celulas transfectadas con E6 (Fig. 4A y 4C).

Interesantemente el tratamiento demetilante condujo a la p3rdida de la expresi3n de los genes CLDN11 y CDH13 en las celulas con a las variantes E-G350 y E-A176/G350; por el contrario, las celulas con la variante AA-a aumentaron los niveles de expresion de ambos genes tras el tratamiento (Fig. 4B y 4D).

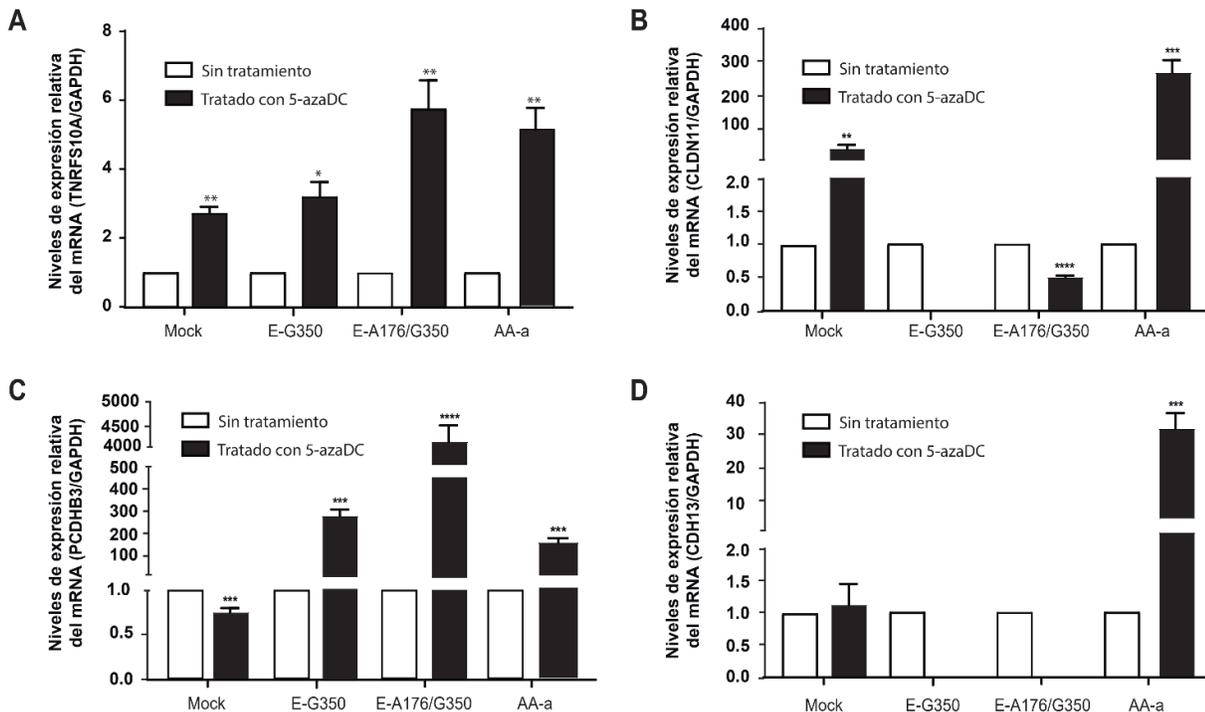


Figura 4: Expresi3n de los genes TNFRFS10A, PCDHB3, CLDN11 y CDH13 post-tratamiento con 5-AzaDC. Las celulas transfectadas con las variantes de E6 se trataron con 10 μ M/ml de 5-AzaDC durante 72 horas. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos de expresi3n se reportaron con media y error est3ndar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparaci3n de medias fue t-student $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.025$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$).

El promotor de los genes TNFRFS10A, PCDHB3, CLDN11 y CDH13 se encuentra metilado y se correlaciona con la disminución en su expresión en muestras de cancer cervical

Con el proposito de validar nuestros resultados, se analizaron datos de muestras de CC pertenecientes al proyecto TCGA-CESC, analizamos los datos de expresión y metilación. Unicamente comparamos los datos correspondientes a las muestras positivas a VPH-16 (n=99) las cuales, se clasificaron en variantes europeas (n=89) y variantes asiático-americanas (n=10). En las muestras positivas a las variantes asiático-americanas encontramos un mayor nivel de metilación en la región promotora y menor expresión de los genes TNFRFS10A (Fig. 5A), PCDHB3 (Fig. 5B) y CDH13 (Fig. 5C) en comparación con las variantes europeas. Por el contrario, la metilación del promotor del gen CLDN11 es mayor en las muestras positivas a las variantes europeas, mientras que el nivel de expresion es menor que en las variantes asiatico-americanas (Fig. 5D).

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

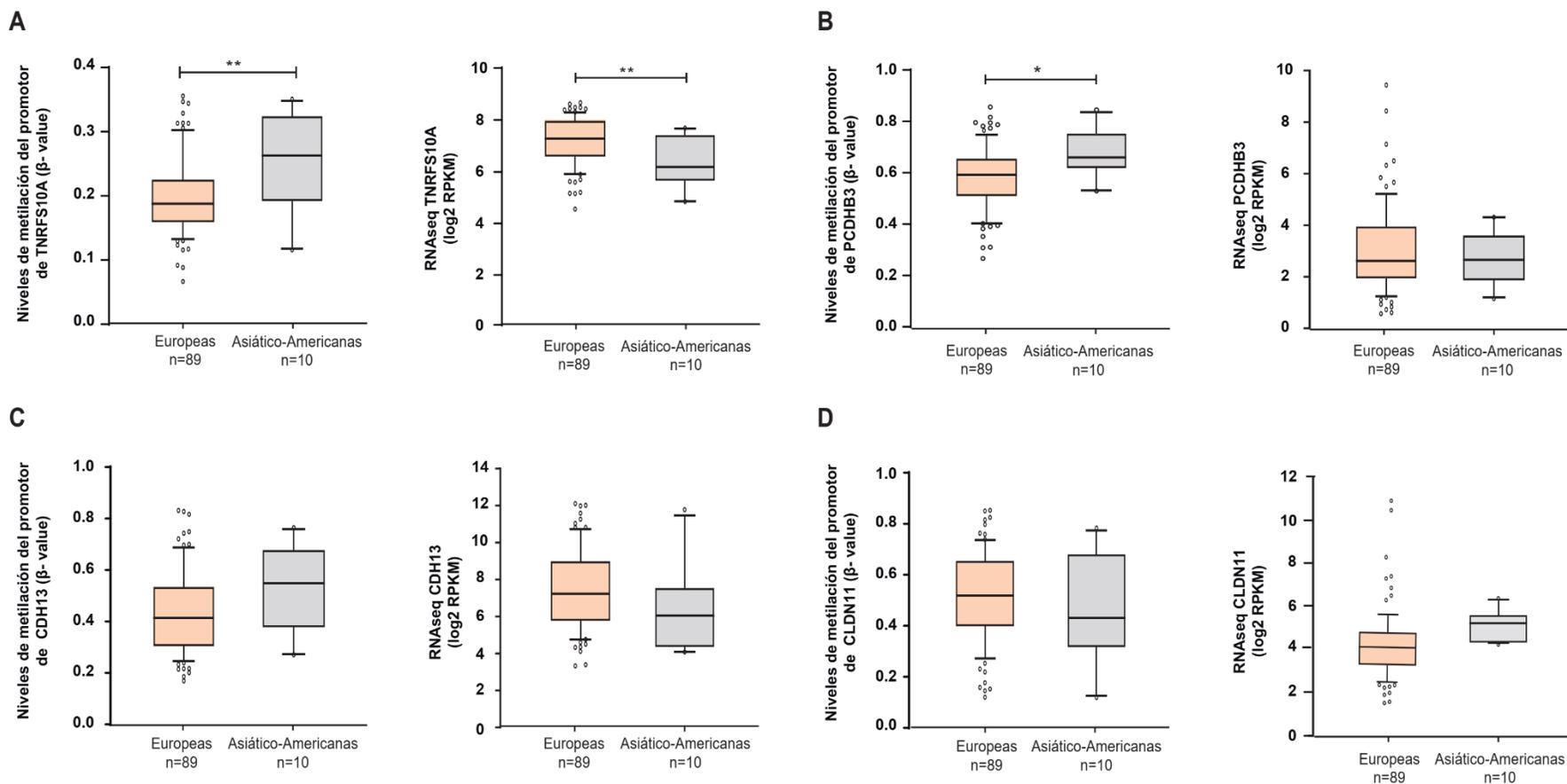


Figura 5: Niveles de metilación y de expresión entre variantes Europeas Vs. Asiático-americanas en muestras del TCGA-CESC positivas a VPH-16. El nivel de metilación se expresa como valores beta, y los niveles de expresión como \log_2 RPKM. La prueba estadística utilizada para la comparación de medianas fue t-student considerando un valor de $p \leq 0.05$ como significativo.

Así mismo, con el objetivo de investigar el efecto que ejerce la metilación sobre la expresión de los genes, hicimos un análisis de correlación. Encontramos que en todos los genes la metilación ejerce una regulación negativa sobre la transcripción debido a que conforme aumentan los niveles de metilación, la expresión disminuye (Fig. 6).

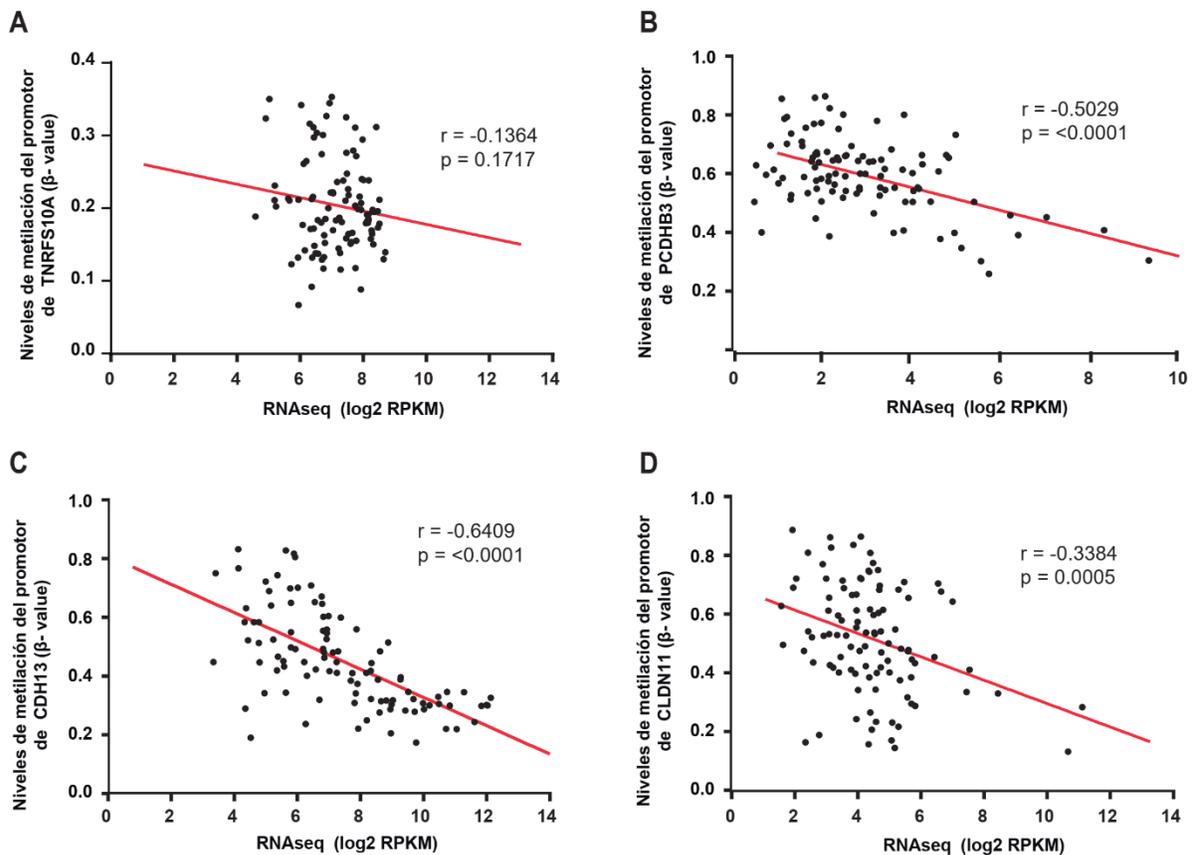


Figura 6: Correlación de la metilación del DNA con la expresión de genes. Se graficaron los datos de metilación y de expresión de las muestras de tejido de CC del TCGA-CESC de cada uno de los genes evaluados (A) TNRFS10A. (B) PCDHB3. (C) CDH13. (D) CLDN11. Se representa en el eje de las "Y" el nivel de metilación de la región promotora como valores β . En el eje de las "X" se representa el nivel de expresión como el logaritmo de las lecturas por kilobase de transcritos por millones de lectura mapeadas en el RNAseq (Log2 RPKM). La prueba estadística utilizada fue el coeficiente de correlación de Pearson considerando un valor de $p \leq 0.05$ como significativo.

4. Discusión

A pesar de que se conoce que el principal factor de riesgo para el desarrollo de la CC es la infección persistente de genotipos virales de alto riesgo del VPH; y que la alteración de las vías de señalización que contribuyen al desarrollo del cáncer es por la acción conjunta de las oncoproteínas virales E6 y E7 [29,30]; aún se desconoce en su totalidad los mecanismos moleculares empleados por los VPH-AR para modular estas alteraciones.

Nuestros resultados muestran que las variantes E-G350 y E-A176/G350 promueven la alteración de la expresión de un mayor número de genes en comparación a la variante AA-a. Ya se ha reportado que la oncoproteína E6 pueden regular diferencialmente la expresión de genes reguladores del ciclo celular, así como de GST, a través de diversas vías de señalización que integran tanto la promoción de la degradación del mRNA, la inhibición de la transcripción y la traducción, contribuyendo así al desarrollo de la CC [31-33]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la expresión de las variantes de oncoproteína E6 modulan diferencialmente la transcripción de genes codificantes.

Diversos estudios han evaluado el papel de la oncoproteína E6 en el aumento en la expresión de genes [34-36]; por el contrario, pocos estudios han evaluado su papel con respecto a los genes subexpresados [37]. Recientemente se reportó que la oncoproteína E6 es capaz de regular la expresión de las DNMT's a través de una vía dependiente de p53 [38,39]. Sugiriendo que uno de los posibles mecanismos por los que E6 pueda estar modulando la expresión de genes es a través de la regulación de los cambios en los patrones de metilación. Interesantemente en un análisis realizado en el laboratorio, se encontró que las variantes en estudio promueven el aumento en la expresión de las DNA metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Con base en estos antecedentes, se decidió analizar el estado de metilación de los genes subexpresados por efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y la E-A176/G350 del VPH-16.

En primer lugar, investigamos cuáles son los procesos celulares relacionados con los genes que disminuyeron su expresión. El análisis de enriquecimiento reveló que los genes subexpresados por las variantes estaban implicados en la regulación de procesos celulares que con frecuencia se encuentran alterados en cáncer tales como: a) la vía de señalización Wnt, b) la migración y motilidad celular, c) la regulación de adhesiones focales, d) las adhesiones célula-célula, e) la regulación de la actividad de las GTPasas entre otros. Diversos estudios han demostrado que los procesos celulares descritos anteriormente son los principales mecanismos moleculares que se ven alterados de forma temprana en el desarrollo y progresión de la carcinogénesis cervical, así como en otros tipos de cáncer [40-44].

Para validar los datos obtenidos en el análisis exploratorio, seleccionamos 20 genes subexpresados por E6 implicados principalmente en los procesos de adhesión, migración y motilidad celular con el fin de determinar sus niveles de expresión. De los 20 genes seleccionados únicamente encontramos que disminuyeron su expresión 11 genes (ANXA2, TNFRSF10A, TKT, FAT1, SFRP2, FOXA1, CDH13, CLDN11, DOCK1, THBS1 y PCDHB3) independientemente de la variante de E6 del VPH-16 respecto al control.

Debido a que la metilación en la región promotora se ha relacionado estrechamente con el silenciamiento y la disminución en la expresión de genes [45,46]; fue de nuestro interés evaluar si las variantes del VPH-16 estaban promoviendo la subexpresión de los genes a través de la metilación. Por lo tanto, analizamos los diferentes patrones de metilación en cada uno de los promotores de estos 11 genes. Encontramos que únicamente en los genes TNFRSF10A, CLDN11, PCDHB3 y CDH13 hubo cambios evidentes. Diversos reportes en diferentes tipos de cáncer han demostrado que la expresión de estos 4 genes se encuentra regulada vía metilación en su región promotora dentro de los que se incluyen el cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, esófago y cáncer hepatocelular [47-49].

Con el fin de comprobar si las variaciones observadas en los perfiles de metilación influyen en la transcripción de los genes medimos los niveles de metilación, así como

de expresión antes y posterior al tratamiento con un agente demetilante de cada uno de los 4 genes. Encontramos que el promotor del gen TNRFS10A que codifica al receptor de muerte 4 (DR4), involucrado en la vía extrínseca de la apoptosis [50], se encuentra metilado en todas las condiciones independientemente de la variante de VPH-16; además, de que la metilación tiene como consecuencia la disminución en su expresión. Ya se ha reportado previamente en medulomas, glioblastomas y en carcinoma gástrico que el promotor de TNRFS10A se encuentra metilado y al igual que en nuestro modelo de estudio, tiene como consecuencia la disminución de su expresión; además, el incremento en los niveles de metilación se ha relacionado con la progresión de la enfermedad a un estado más agresivo [51-53]. Debido a que se ha demostrado ampliamente la participación del gen TNRFS10A en la promoción de la apoptosis vía extrínseca tras un estímulo de muerte [54], los resultados obtenidos sugieren fuertemente que las variantes del VPH-16 inducen la disminución de su expresión vía metilación y posterior al tratamiento con 5-azaDC aumenta. Este mecanismo pudiera estar generando un estado de resistencia a la muerte tras estímulos extrínsecos [55,56]. Sin embargo, a pesar de la evidencia señalada no hay estudios suficientes que demuestren los mecanismos de regulación en la expresión de este gen, por lo que es necesario la realización de más estudios para llegar a conclusiones más específicas.

Al analizar los resultados con el gen CLDN11, los resultados sugieren que las variantes E-A176/G350 y AA-a promueven el aumento en la metilación de su promotor; interesantemente, al medir los niveles de expresión, únicamente la variante AA-a logró disminuir la cantidad de su RNA mensajero. Esto pudiera deberse a que el ligero aumento en el nivel de metilación promovido por la variante E-A176/G350 no fue suficiente para ejercer un efecto negativo sobre la expresión; sin embargo, no podemos descartar otros posibles mecanismos de regulación que pudiesen estarse llevando a cabo por la acción de E6. En estudios con cáncer colorrectal se ha observado que la metilación de CLDN11 se ha asociado a la metástasis y escasa supervivencia de los pacientes [57]. Así mismo, en cáncer gástrico la metilación de CLDN11 se ha relacionado con la disminución en su expresión [58]. CLDN11

pertenece a la familia de las claudinas, una agrupación de proteínas transmembrana que forman parte importante de las uniones estrechas [59]; por lo que al estar metilado y disminuida la expresión por la variante AA-a, pudiera indicarnos que esta variante podría tener una mayor capacidad de migrar e invadir; sin embargo, aún faltan realizar más estudios para demostrarlo.

Con respecto al gene CDH13; se encontró que únicamente variantes europeas mostraron un aumento en la expresión del gen al disminuir la metilación del promotor; por el contrario, en las células C33-A/AA-a no se detectó el mensajero (a pesar de mostrar también disminución en la metilación). Interesantemente, al realizar el tratamiento con la 5-AzaDC, la expresión de CDH13 se restauró en las células con la variante AA-a; por el contrario, en las células transfectadas con las variantes europeas el mensajero de CDH13 no fue detectado. Estos resultados discordantes entre las variantes pudieran sugerir que para el gen CDH13 la regulación de la expresión vía metilación es dependiente de la variante. También es posible que para que se exprese el gen sean necesarios otros factores, además de cierto grado de metilación. Ya se ha reportado que la metilación aberrante en el promotor de CDH13 en el carcinoma primario de pulmón de células no pequeñas tiene como consecuencia la regulación negativa de su expresión y se encuentra asociada con la progresión tumoral [60]. Así mismo, también se ha reportado que la disminución en la expresión de CDH13 se correlaciona negativamente con la hipermetilación en su promotor encontrándose esta relación con mayor frecuencia en los adenomas hipofisarios invasivos en comparación a los no invasivos [61]. También se ha reportado que en tejidos de cáncer colorrectal la metilación del promotor CDH13 es mayor que en los tejidos premalignos, normales y adyacentes al tumor [62]. Con respecto al CC únicamente se ha reportado que la hipermetilación de CDH13 en muestras de suero podría ser empleado como un marcador predictivo para seleccionar a los pacientes con CC con alto riesgo de recaída tras un periodo de remisión [63,64].

En el caso del gen PCDHB3, posterior al tratamiento con la 5-AzaDC observamos un incremento en la expresión del gen en las células transfectadas con las variantes del VPH-16. Este resultado sugiere que la regulación de la expresión de PCDHB3 es

dependiente de la metilación. Ya se ha reportado en líneas celulares de cáncer de hígado, de pulmón, endometrio, de cáncer de cabeza y cuello, así como de CC, que el promotor de PCDHB3 se encuentra metilado y tras el tratamiento con la 5-AzaDC se restauran los niveles de expresión [65]. Sin embargo, al analizar el estado de metilación y expresión por variante, encontramos que la variante E-A176/G350 propicio un ligero aumento en la metilación de su promotor que fue suficiente para inducir la disminución en su expresión. Estos datos sugieren que sutiles variaciones en los niveles de metilación podrían ser suficientes para generar un efecto negativo en la expresión de genes.

Finalmente, mediante el uso de los datos de metilación y expresión contenidos en el repositorio del TCGA, realizamos un análisis de correlación. Seleccionamos únicamente las muestras correspondientes al proyecto TCGA-CESC positivo a VPH-16. Encontramos que, para los genes TNFRFS10A, CLDN11, PCDHB3 y CDH13 los niveles de expresión se correlacionan negativamente con los niveles de metilación. Estos resultados sugieren que en CC la expresión de los genes se encuentran regulados vía metilación de su promotor.

5. Conclusión

Estos resultados muestran que la oncoproteína E6 de las variantes del VPH-16 altera la expresión de genes a través de la regulación del estado de metilación; afectando de esta forma diferentes vías involucradas en la carcinogénesis y el mantenimiento de la estabilidad celular por lo que es muy probable que el papel de E6 en la progresión de CC sea mediado en parte por la metilación de estos genes.

6. Perspectivas

- Determinar la expresión de los genes analizados a nivel proteína.
- Evaluar mediante ensayos de luciferasa el efecto de la metilación en el promotor de estos genes.
- Analizar el efecto de la metilación en la unión de factores de transcripción y complejos remodeladores de la cromatina en este sistema de transfectantes.
- Evaluar el efecto de la metilación de estos genes en un modelo de xenoinjertos.

7. Referencias

1. Cuschieri, K. S.; Cubie, H.A.; Whitley, M.W.; Gilkison, G.; Arends, M. J.; Graham, C.; McGoogan, E. (2005). Persistent high risk VPH infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 58, 946–950.
2. Moscicki, A. B.; Schiffman, M.; Kjaer, S.; Villa, L.L. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of VPH and anogenital cancer. *Vaccine.* 24, S42-S51.
3. Thomas, M.; Pim, D.; Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of VPH. *Oncogene.* 18, 7690–7700.
4. Howie, H. L.; Katzenellenbogen, R. A.; Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology.*, 384, 324-334.
5. Giarrè, M.; Caldeira, S.; Malanchi, I.; Ciccolini, F.; João Leão, M. and Tommasino, M. (2001). Induction of pRb Degradation by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Is Essential To Efficiently Overcome p16INK4a-Imposed G1 Cell Cycle Arrest. *J Virol.* 75, 4705–4712.
6. Garnett, T. O.; Duerksen-Hughes, P. J. (2006). Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (VPH) Oncoproteins. *Arch Virol.* 151, 2321–2335.
7. Shimada, M.; Yamashita, A.; Saito, M.; Ichino, M.; Kinjo, T.; Mizuki, N.; Klinman, D. M.; Okuda, K. (2020). The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation. *Sci Rep.* Article number: 14195.
8. Westrich, J. A.; Warren, C. J.; Pyeon, D. (2017). Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Research.* 231, 21-23.
9. Yang, H. J. (2013). Aberrant DNA methylation in cervical Carcinogenesis. *Chin J Cancer.* 32, 42–48.
10. Sen, P.; Ganguly, P.; Ganguly, N. (2018). Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncol Lett.* 15, 11–22.
11. Kulis, M. and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 70:27-56.
12. Moore, L. D.; Le, T.; Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology.* 38, 23–38.
13. Laisné, M.; Gupta, N.; Kirsh, O.; Pradhan, S.; Defossez, P. A. (2018). Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals. *Genes.* 9, 617.
14. Zhang, J.; Yang, C.; Wu, C.; Cui, W.; Wang, L. (2020). DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers (Basel).* 12, 2123.
15. Łuczak, M.W.; Jagodzinski, P.P. (2006). The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 44, 143-154.
16. Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 21, 5427-5440.
17. Meehan, R. R.; Stancheva, L. (2001). DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development. *Essays in Biochemistry.* 37, 59-70.

18. Jeltsch, A.; Jurkowska, R. Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* 44, 8556-8575.
19. Xi, L. F.; Koutsky, L. A.; Hildesheim, A.; Galloway, D.A.; Wheeler, C.M.; Winer, R.L.; Ho, J.; Kiviat, N. B. (2007). Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16, 4-10.
20. Hang, D.; Yina, Y.; Han, J.; Jiang, J.; Ma, H.; Xie, S.; Feng, X.; Zhang, K.; Hu, Z.; Shen, H.; Clifford, G. M.; Dai, M.; Li, N. (2016). Analysis of human papillomavirus 16 variants and risk for cervical cancer in Chinese population. *Virology.* 488, 156-161.
21. Zehbe, I.; Tachezy, R.; Mytilineos, J.; Voglino, G.; Mikyškova, I.; Delius, H.; Marongiu, A.; Gissmann, L.; Wilander, E.; Tommasino, M. (2001). Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int. J. Cancer.* 94, 711–716.
22. Jackson, R.; Togtema, M.; Lambert, P. F.; Zehbe, I. (2014). Tumourigenesis Driven by the Human Papillomavirus Type 16 Asian-American E6 Variant in a Three-Dimensional Keratinocyte Model. *PLoS ONE.* 9.
23. Berumen, J.; Ordoñez, R. M.; Lazcano, E.; Salmeron, J.; Galvan, S. C.; Estrada, R. A.; Yunes, E.; Garcia-Carranca, A.; Gonzalez-Lira, G.; Madrigal-de la Campa, A. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 93, 1325-1330.
24. Togtema, M.; Jackson, R.; Richard, C.; Niccoli, S.; Ingeborg, Z. (2015). The human papillomavirus 16 European-T350G E6 variant can immortalize but not transform keratinocytes in the absence of E7. *Virology.* 485, 274-282.
25. Zacapala-Gómez, A. E.; Del Moral-Hernández, O.; Villegas-Sepúlveda, N.; Hidalgo-Miranda, A.; Romero-Córdoba, S. L.; Beltrán-Anaya, F. O.; Leyva-Vázquez, M. A.; Alarcón-Romero, L. C.; Illades-Aguiar, B. (2016). Changes in global gene expression profiles induced by VPH 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology.* 488, 187-195.
26. Mantovani, F.; Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 20, 7874–7887.
27. Lin, R. K.; Wang, Y. C. (2014). Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci.* 4: 46.
28. Tang, Y. A.; Tsai, Y.T.; Lin, R. K.; Hsu, H. S.; Chen, C. Y.; Wang, Y. C. (2014). Dereglulation of p53 and RB Transcriptional Control Leads to Overexpression of DNA Methyltransferases in Lung Cancer. *J. Cancer Res. Pract.* 1, 14-27.
29. Pal, A. and Kundu, R. (2019) Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol.* 10:3116.
30. Eun-Kyoung, Y. and Jong-Sup, P. (2005). The Role of VPH E6 and E7 Oncoproteins in VPH-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 37(6): 319–324.
31. Shai, A.; Brake, T.; Somoza, C. and Lambert, P.F. (2007). The Human Papillomavirus E6 Oncogene Dysregulates the Cell Cycle and Contributes to

- Cervical Carcinogenesis through Two Independent Activities. *Cancer Res.* 67:1626-1635. 10.1158/0008-5472.CAN-06-3344
32. Thomas, M.; Narayan, N.; Pim, D.; Tomaić, V.; Massimi, P.; Nagasaka, K.; Kranjec, C.; Gammoh, N. and Banks, L. (2008). Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene.* 27:7018-7030.
 33. Thomas, M.C. and Cheng-Ming, C. (2005). E6 Oncoprotein Represses p53-Dependent Gene Activation via Inhibition of Protein Acetylation Independently of Inducing p53 Degradation. *Molecular Cell.* 17(2): 251-264. DOI
 34. McMurray, H. R.; McCance, D. J. (2003). Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol.* 77(18):9852-9861.
 35. Hsu, C.H.; Peng, K, L.; Jhang, H.C. et al. The VPH E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. (2012). *Oncogene.* 31:2335-2349.
 36. Sa, D. K; Sreejata, C.; Samina, A.; Anna, C. S.; Janice, M; Sjoerd H. van der Burg and Craig, M. (2018). The Effect of Productive VPH16 Infection on Global Gene Expression of Cervical Epithelium. *Journal of Virology.* 92(20): e01261-18
 37. Reiser, J.; Hurst, J. Voges, M.; Krauss, P.; Münch, P.; Iftner, T. and Stubenrauch, F. (2011). High-Risk Human Papillomaviruses Repress Constitutive Kappa Interferon Transcription via E6 To Prevent Pathogen Recognition Receptor and Antiviral-Genes Expression. *Journal of Virology.* 85 (21).
 38. Au Yeung, C. L.; Tsang, W. P.; Tsang, T. Y.; Co, N. N.; Yau, P. L.; and Kwok, T. T. (2010). VPH-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncology reports.* 24(6):1599-1604.
 39. Lin, R.K. and Yi-Ching, W. (2014). Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer. *Cell Biosci.* 19 (4):46.
 40. Balasubramaniam, S. D.; Balakrishnan, V.; Oon, C. E. and Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas).* 55(7): 384.
 41. Cheng, J.; Lu, X.; Wang, J.; Zhang, H.; Duan, P. and Li, C. (2017). Interactome analysis of gene expression profiles of cervical cancer reveals dysregulated mitotic gene clusters. *American journal of translational research.* 9(6), 3048-3059.
 42. Park, T.W.; Fujiwara, H. and Wright, T.C. (1995). Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer.* 176(10):1902-1913.
 43. Ramos-Solano, M.; Álvarez-Zavala, M.; García-Castro, B.; Jave-Suárez, L. F. and Aguilar-Lemarroy, A. (2015). Wnt signalling pathway and cervical cancer. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 53 Suppl 2, S218-S224.
 44. Pérez-Plasencia, C.; Vázquez-Ortiz, G.; López-Romero, R. (2007). Genome wide expression analysis in VPH16 Cervical Cancer: identification of altered metabolic pathways. *Infect Agents Cancer.* 2:16.
 45. Phillips, T. (2008) The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1):116.
 46. Spainhour, J.; Lim, H.S.; Yi, S.V. and Qiu, P. (2019). Correlation Patterns Between DNA Methylation and Gene Expression in The Cancer Genome Atlas. *Research Article.* 18:1-11.
 47. Chen, F.; Huang, T.; Ren, Y. et al. (2016). Clinical significance of CDH13 promoter methylation as a biomarker for bladder cancer: a meta-analysis. *BMC Urol.* 16, 52.

48. Lee, K. H.; Lim, S. W.; Kim, H. G.; Kim, D. Y.; Ryu, S. Y.; Joo, J. K. and Lee, J. H. (2009). Lack of death receptor 4 (DR4) expression through gene promoter methylation in gastric carcinoma. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 394(4), 661–667.
49. Singh, N.P.; and Vinod, P.K. (2020). Integrative analysis of DNA methylation and gene expression in papillary renal cell carcinoma. *Mol Genet Genomics*. 295:807-824.
50. Jan, R. and Chaudhry, G.S. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 9(2): 205-218.
51. Lee, K.H.; Lim, S.W.; Kim, H.G.; Kim, D.Y.; Ryu, S.Y.; Joo, J.K.; et al. (2009). Lack of death receptor 4 (DR4) expression through gene promoter methylation in gastric carcinoma. *Langenbecks Arch Sur*. 394: 661-670.
52. Bae, S.I.; Cheriyaath, V., Jacobs, B.S.; Reu, F.J. and Borden, E.C. (2008). Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene*. 27: 490-498.
53. Elias, A.; Siegelin, M.D.; Steinmüller, A.; Von Deimling, A.; Lass, U.; Korn, B. and Mueller, W. (2009). Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin Cancer Res*. 15: 5457-5465.
54. Wang, W.; Qi, X. and Wu, M. (2015). Effect of DR4 promoter methylation on the TRAIL-induced apoptosis in lung squamous carcinoma cell. *Oncology reports*. 34(4): 2115-2125.
55. Watanabe, A.; Miyake, K.; Akahane, K.; Goi, K.; Kagami, K.; Yagita, H.; Inukai, T. (2021). Epigenetic Modification of Death Receptor Genes for TRAIL and TRAIL Resistance in Childhood B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes*. 12(6):864.
56. Horak, P.; Pils, D.; Haller, G.; Pribill, I.; Roessler, M.; Tomek, S.; Horvat, R.; Zeillinger, R.; Zielinski, C.; & Krainer, M. (2005). Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Molecular cancer research: MCR*. 3(6), 335-343.
57. Li, J.; Zhou, C.; Ni, S.; Wang, S.; Ni, C.; Yang, P. and Ye, M. (2017). Methylated claudin-11 associated with metastasis and poor survival of colorectal cancer. *Oncotarget*. 8(56): 96249-96262.
58. Agarwal, R.; Mori, Y.; Cheng, Y.; Jin, Z.; Oлару, A.V.; Hamilton, J.P.; David, S.; Selaru, F.M.; Yang, J.; Abraham, J.M.; et al. (2009). Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. *PLoS One*. 4: e8002.
59. Günzel, D. and Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 93(2), 525–569.
60. Kim, J.; Han, J.; Shim, Y.; Park, J. and Kim, D. H. (2005). Aberrant methylation of H-Cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 104. 1825-1833.

61. Qian, Z.; Sano, T.; Yoshimoto, K. et al. (2007). Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol.* 20:1269-1277.
62. Ye, M.; Huang, T.; Li, J.; Zhou, C.; Yang, P.; Ni, C. and Chen, S. (2017). Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression, and prognosis of colorectal cancer: A systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine.* 96(4): e5956.
63. Abudukadeer, A.; Bakry, R.; Goebel, G.; Mutz-Dehbalaie, I.; Widschwendter, A.; Bonn, G.K. and Fiegl, H. (2012). Clinical relevance of CDH1 and CDH13 DNA-methylation in serum of cervical cancer patients. *International journal of molecular sciences*, 13(7): 8353-8363.
64. Widschwendter, A.; Ivarsson, L.; Blassnig, A.; Müller, H. M.; Fiegl, H.; Wiedemair, A.; Müller-Holzner, E.; Goebel, G.; Marth, C. and Widschwendter, M. (2004). CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *International journal of cancer.*109(2):163–166.
65. Kai-Hung, W.; Cuei-Jyuan, L.; Chou-Jen, L.; Dai-Wei, L.; Rui-Lan, H.; Dah-Ching, D.; Ching-Feng, W. and Tang-Yuan, C. (2015). Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to VPH. *Cancer Medicine.* 4(1): 43-55.

Anexos

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR

Genes	Secuencia de los primers	TM	Tamaño del amplificado
CDH13	Foward: 5'-CTCGAGCCCATACTTCAAGG-3'	60 °C	159 pb
	Reverse: 5'-AAGGAGCCCTGGATGTCTTT-3'		
ANXA2	Foward: 5'-GTGGTGGAGATGACTGAAGCC-3'	61 °C	110 pb
	Reverse: 5'-CCACGGGGACTGTTATTCG-3'		
CDH22	Foward: 5'-TTTCCCGCAGAAGATGTACC-3'	60 °C	193 pb
	Reverse: 5'-GATGATGGCCTCCTGAGTGT-3'		
PCDH17	Foward: 5'-CAGGCTGACAGTGACCAAGA-3'	60 °C	164 pb
	Reverse: 5'-TCAGAATGACCAAGCACTCG-3'		
SFRP1	Foward: 5'-CCAGTTTGCATTTGGATGTG-3'	60 °C	187 pb
	Reverse: 5'-GGTCAGAACGGCCAGTATGT-3'		
SFRP2	Foward: 5'-GCCTCGATGACCTAGACGAG-3'	60 °C	152 pb
	Reverse: 5'-GATGCAAAGGTCGTTGTCCT-3'		
PCDH8	Foward: 5'-CAACCACATGCAGAGTGGAC-3'	60 °C	159 pb
	Reverse: 5'-GGCAGTGACGTGCTCTTACA-3'		
FAT1	Foward: 5'-TAACATGGCTGGTTGTCCA-3'	60 °C	158 pb
	Reverse: 5'-CCAGTGGGACATTCCTGTCT-3'		
FOXA1	Foward: 5'-GCAATACTCGCCTTACGGCT-3'	58 °C	120 pb
	Reverse: 5'-TACACACCTTGGTAGTACGCC-3'		
EDNRB	Foward: 5'-CCTTCTGGAGCAGGTAGCAG-3'	60 °C	176 pb
	Reverse: 5'-GTCTTAGTGGGTGGCGTCAT-3'		
CLDN11	Foward: 5'-TGGGAGCCTCATAAAGATGG-3'	60 °C	160 pb
	Reverse: 5'-CCTGGCCCTCAACTTACAAA-3'		
TNFRSF10A	Foward: 5'-AGAGAGAAGTCCCTGCACCA-3'	60 °C	154 pb
	Reverse: 5'-GTCACTCCAGGGCGTACAAT-3'		
THBS4	Foward: 5'-GCAGAAACCCAGAGCTGAAC-3'	60 °C	164 pb
	Reverse: 5'-AGAGCATGGCAGTTCTTCGT-3'		
TKT	Foward: 5'-CATCTCCGAGAGCAACATCA-3'	60 °C	182 pb
	Reverse: 5'-TTGTATTGGCGGCTAGTTCC-3'		
ROBO2	Foward: 5'-TATTCTTCTTGCGCATCGTG-3'	60 °C	174 pb
	Reverse: 5'-CTCCAGCTGCCACTACAACA-3'		
DOCK1	Foward: 5'-AATCCGGAAGGGAGAGAAAA-3'	60 °C	188 pb
	Reverse: 5'-TGATCTTGTCGTTTCGTCAGC-3'		
FEZF2	Foward: 5'-CTTCCTTCCCTCCCTGTACC-3'	60 °C	152 pb
	Reverse: 5'-GCCAGTCATCGAGGAAACAT-3'		
ANXA3	Foward: 5'-CTCAAGGCAAAGGTGGGATA-3'	60 °C	179 pb
	Reverse: 5'-GCTGTGCATTTGACCTCTCA-3'		
GAPDH	Foward: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3'	58 °C	449 pb
	Reverse: 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'		

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la PCR-SM

Genes	Secuencia de los primers	TM	Tamaño del amplificado
TNRFS10A	Foward: 5'-TTGGAGCGTAATGGTTTTATTC- 3'	63 °C	102 pb
	Reverse: 5'-AATACCTATAATCCCAACCACTCG-3'		
CLDN11	Foward: 5'-TAGTTTGTTATAATTTTGGGTCGTC-3'	63 °C	130 pb
	Reverse: 5'-TCTCAATCTCTAAATATCCATTCCG-3'		
PCDHB3	Foward: 5'-ATTTTATTAGGAAGAATCGTTGTTC-3'	58 °C	228 pb
	Reverse: 5'-CACAATACCTATAATTTAATTCGCC-3'		
CDH13	Foward: 5'-TATTTGTTATGTAAAACGAGGGAGC-3'	60 °C	112 pb
	Reverse: 5'-AAATAAATCAACAACAACATCACGA-3'		

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

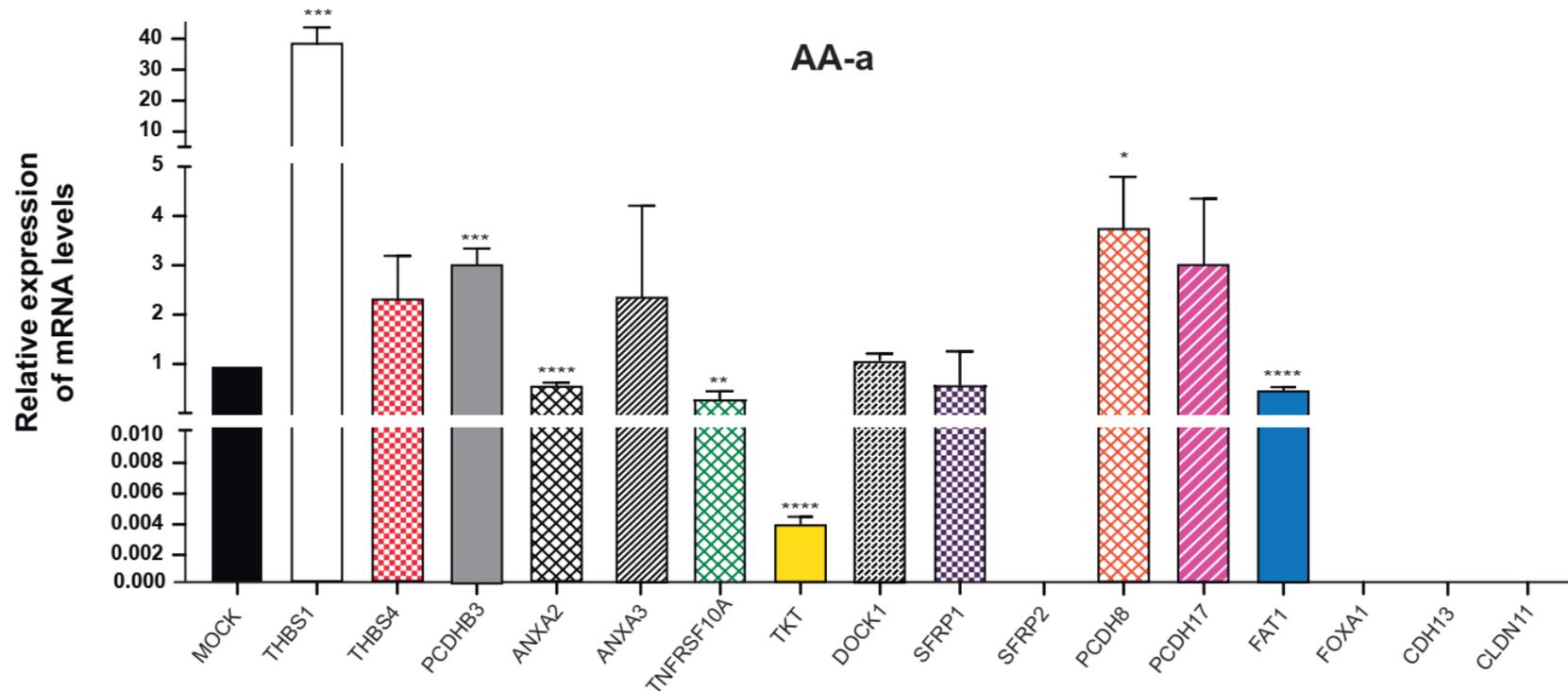


Figura suplementaria 1. Niveles de expresión relativa del mRNA de los genes subexpresados por la variante AA-a de la oncoproteína E6 de VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión, migración e invasión celular en las células C33-A con Mock y la variante AA-a. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias fue t-student. $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.25$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$).

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

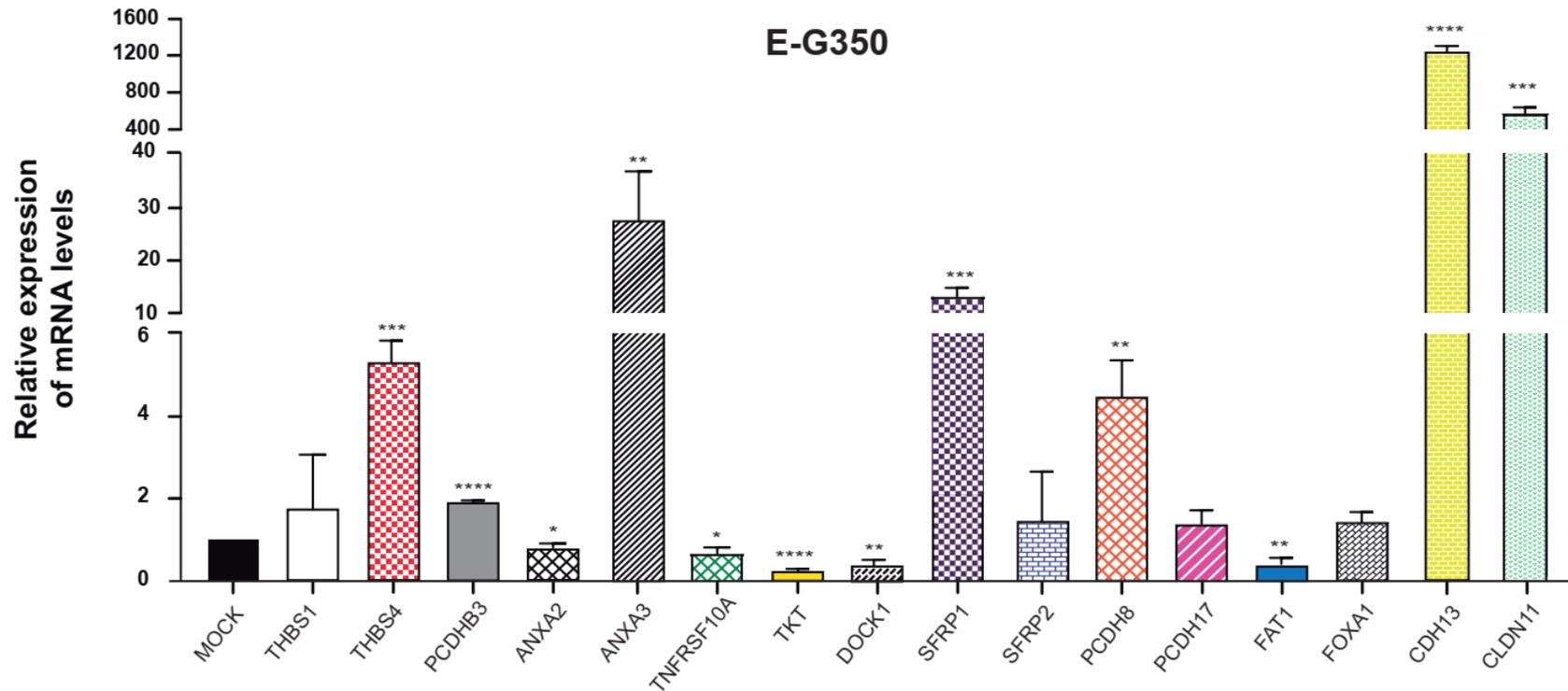


Figura suplementaria 2. Niveles de expresión relativa del mRNA de los genes subexpresados por la variante E-G350 de la oncoproteína E6 de VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión, migración e invasión celular en las células C33-A con Mock y la variante AA-a. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias fue t-student. $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

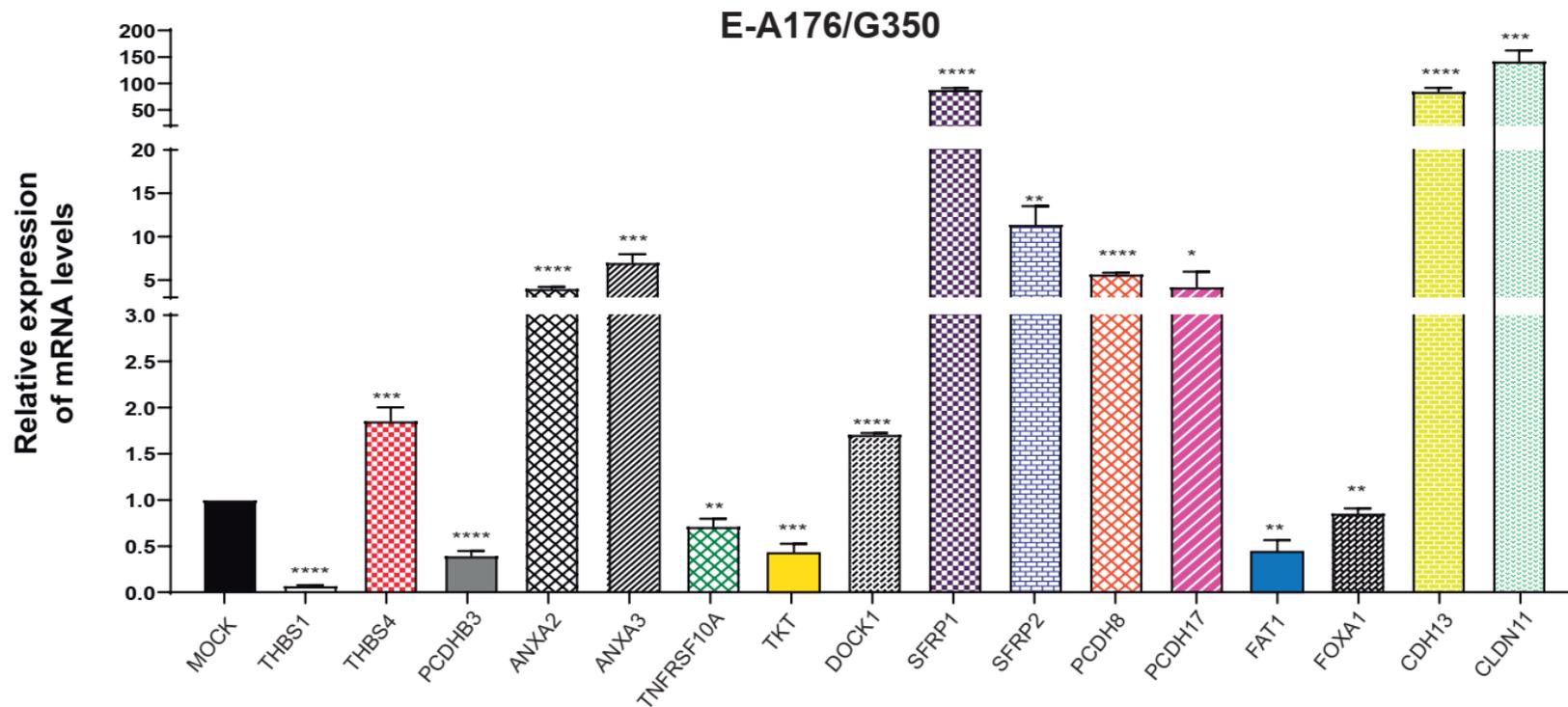


Figura suplementaria 3. Niveles de expresión relativa del mRNA de los genes subexpresados por la variante E-A176/G350 de la oncoproteína E6 de VPH 16. Se muestra la expresión relativa del mRNA de los genes de adhesión, migración e invasión celular en las células C33-A con Mock y la variante AA-a. Los niveles de mRNA fueron determinados por RT-qPCR y normalizados con el gen GAPDH. Los datos se reportaron con media y error estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La prueba estadística utilizada para la comparación de medias fue t-student. $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.25$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$).

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

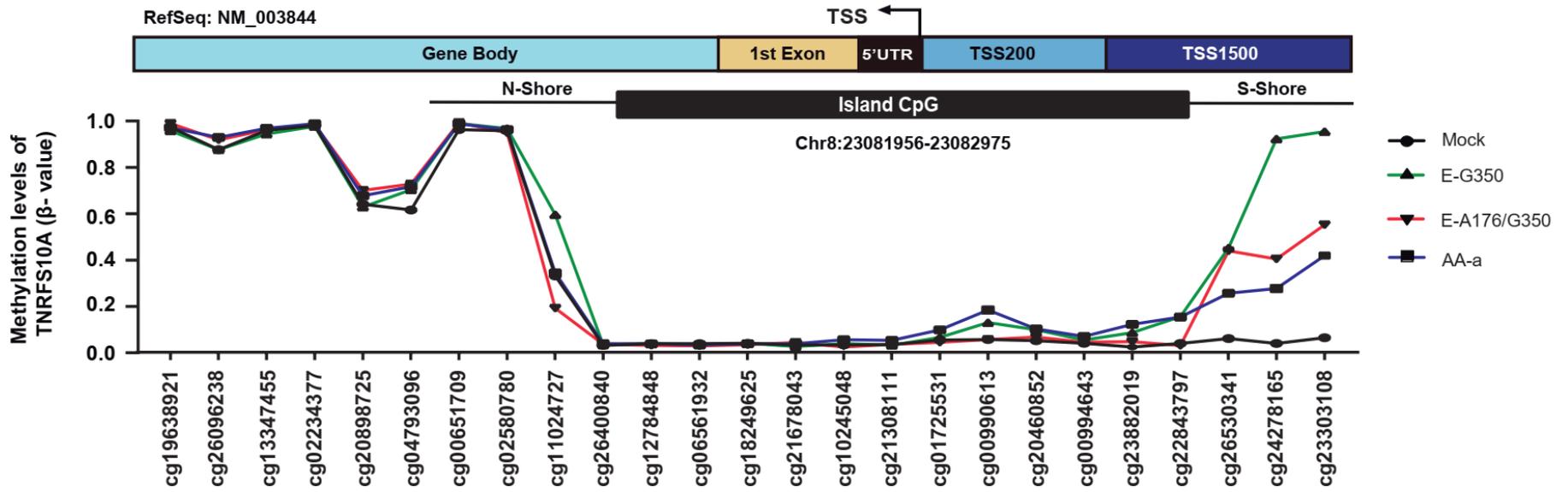


Figura suplementaria 4. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen TNRF510A. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen TNRF510A. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

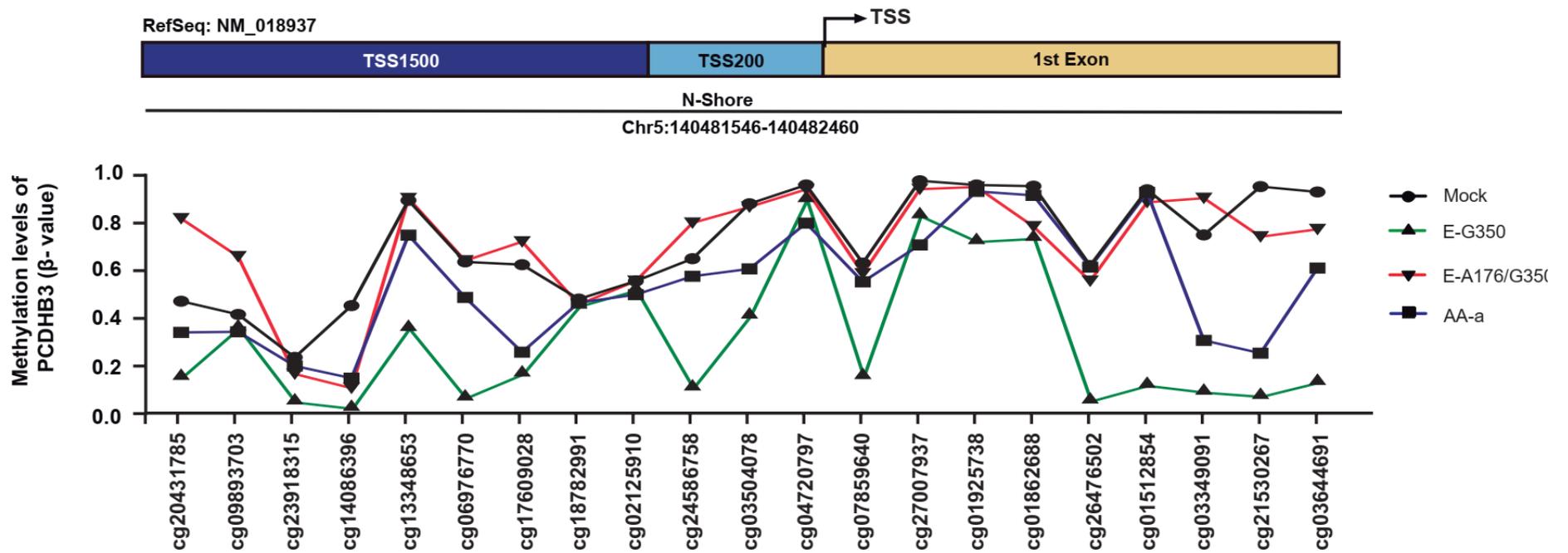


Figura suplementaria 5. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen PCDHB3. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen PCDHB3. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

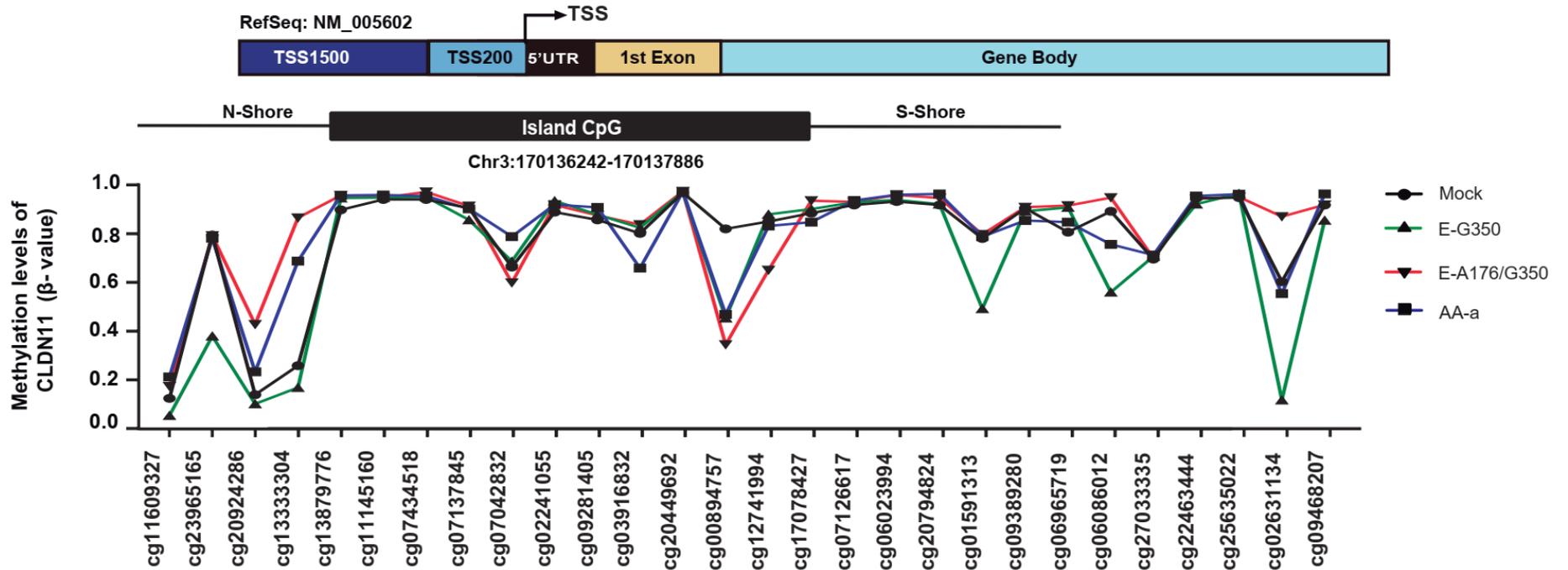


Figura suplementaria 6. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen CLDN11. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen CLDN11. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

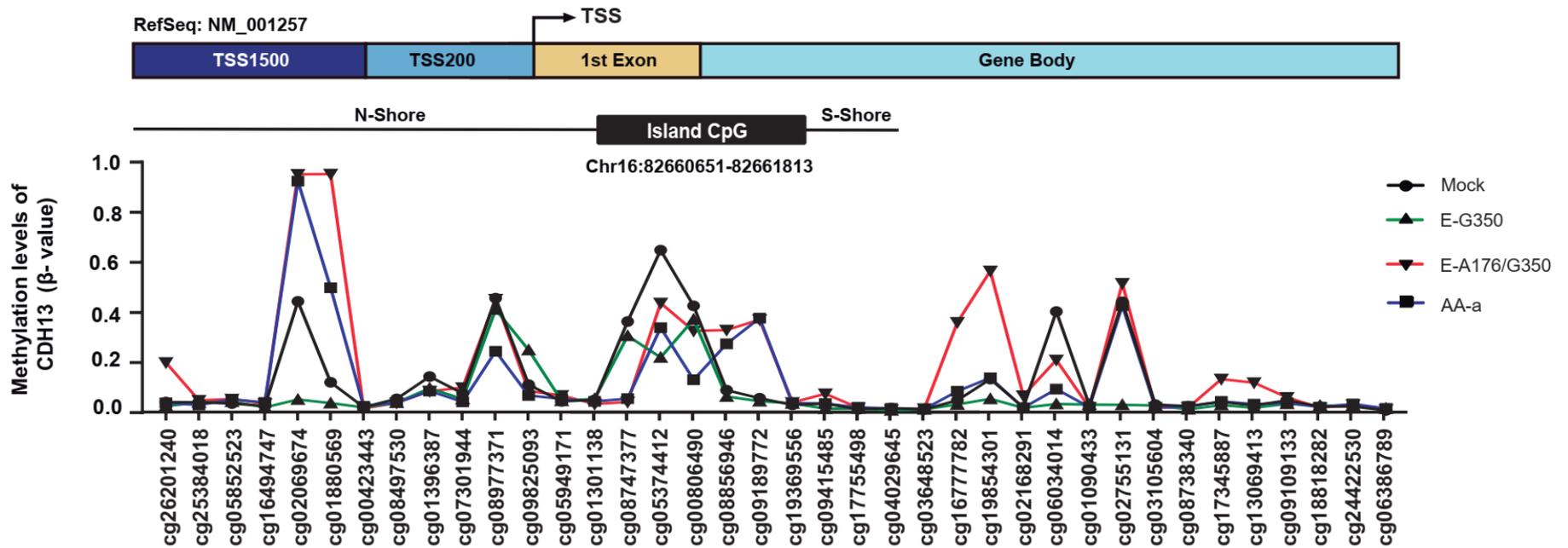


Figura suplementaria 7. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen CDH13. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen CDH13. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

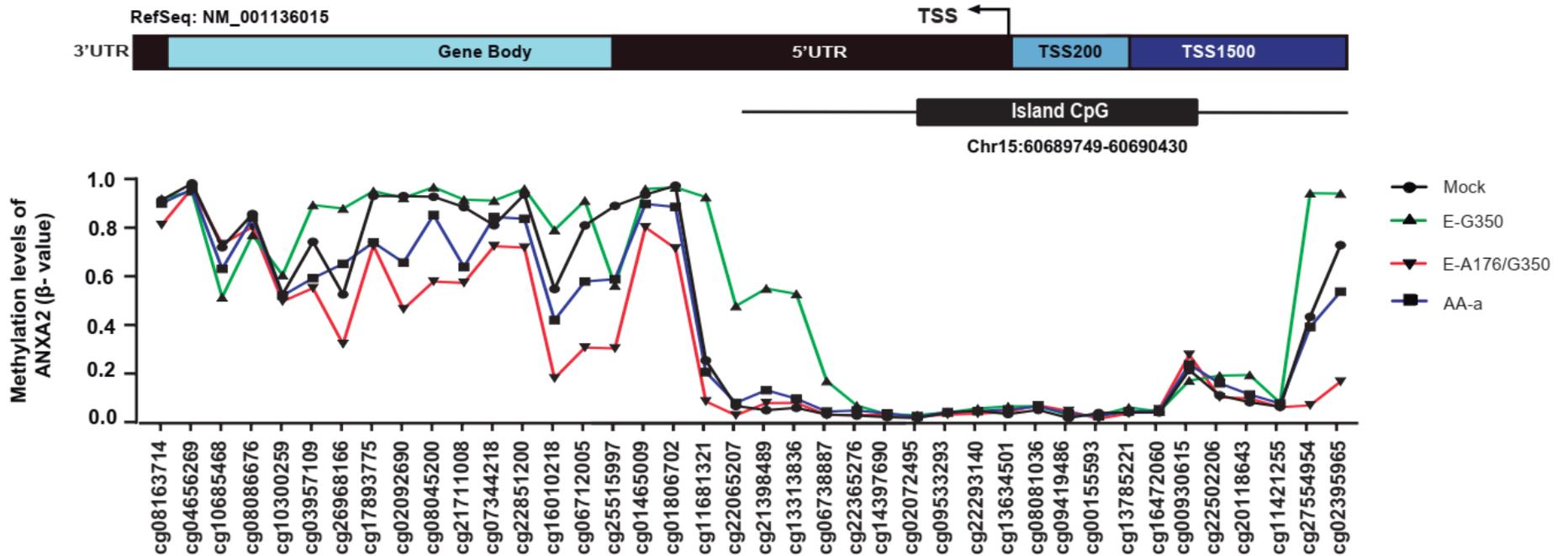


Figura suplementaria 8. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen ANXA2. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen ANXA2. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

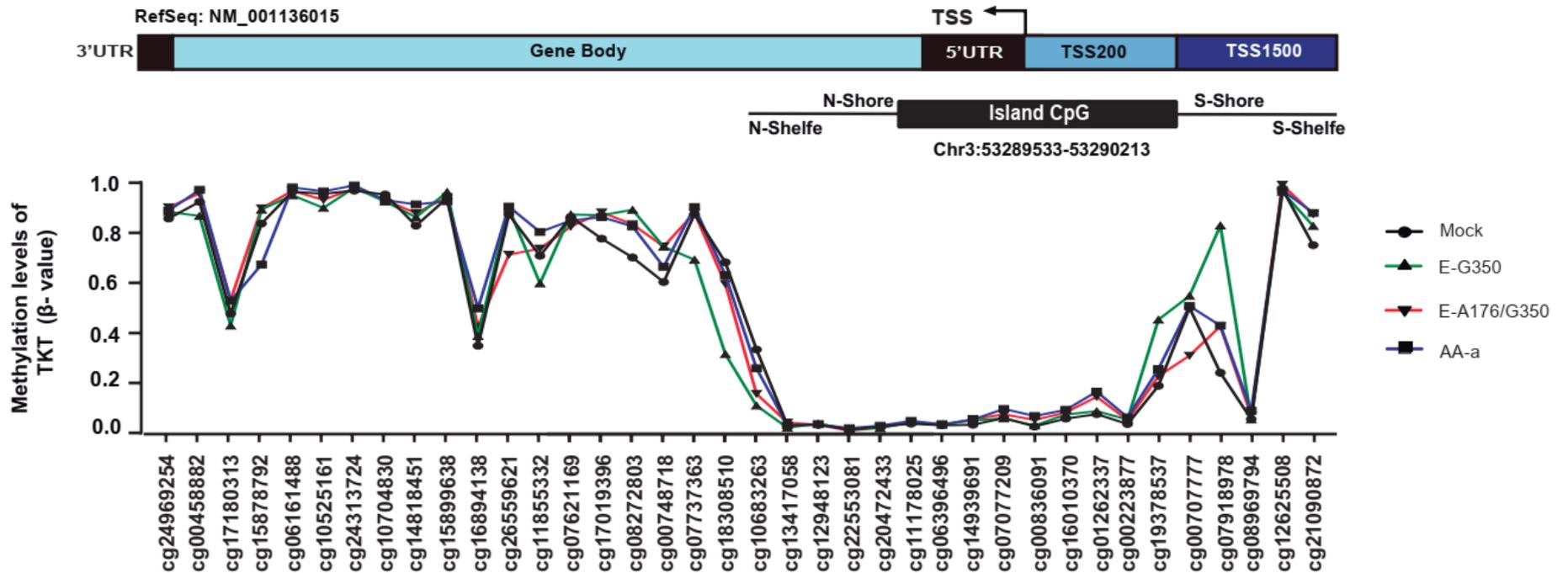


Figura suplementaria 9. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen TKT. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen TKT. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

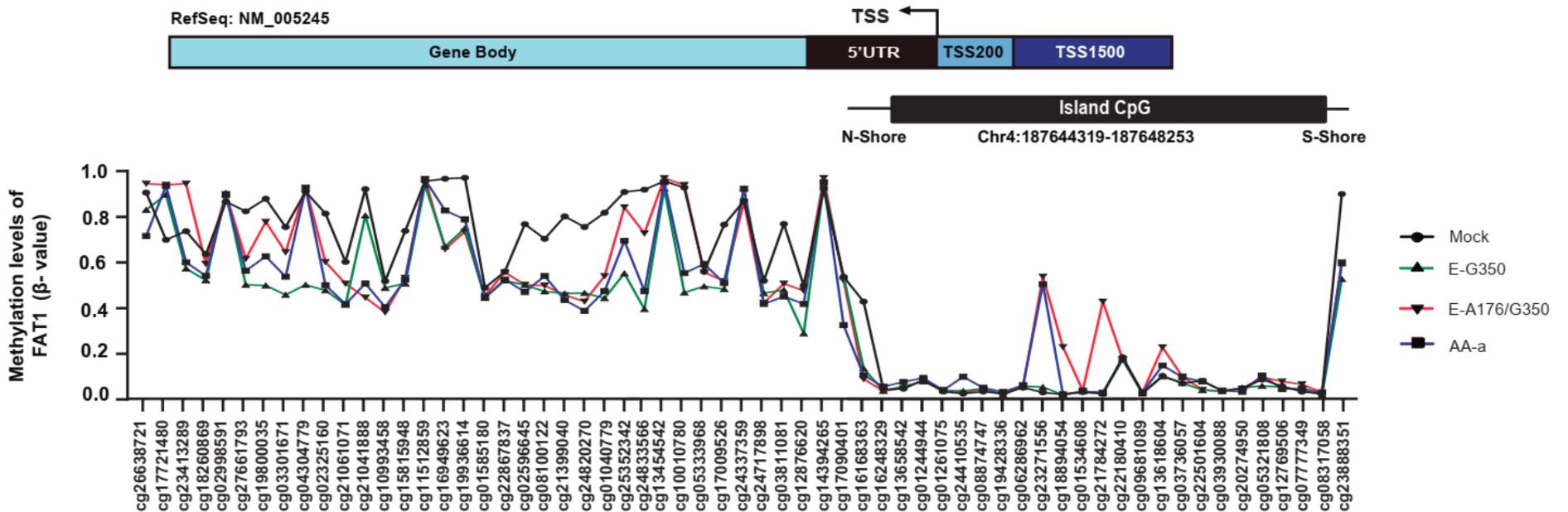


Figura suplementaria 10. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen FAT1. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen FAT1. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

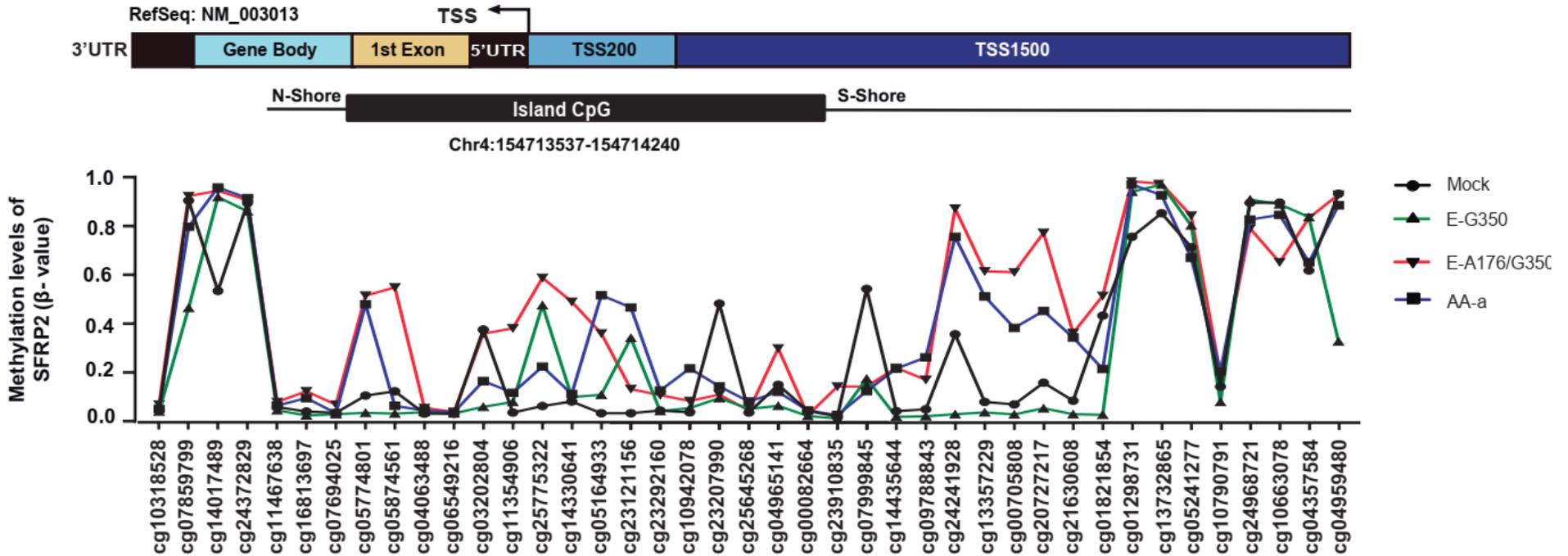


Figura suplementaria 11. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen SFRP2. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen SFRP2. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

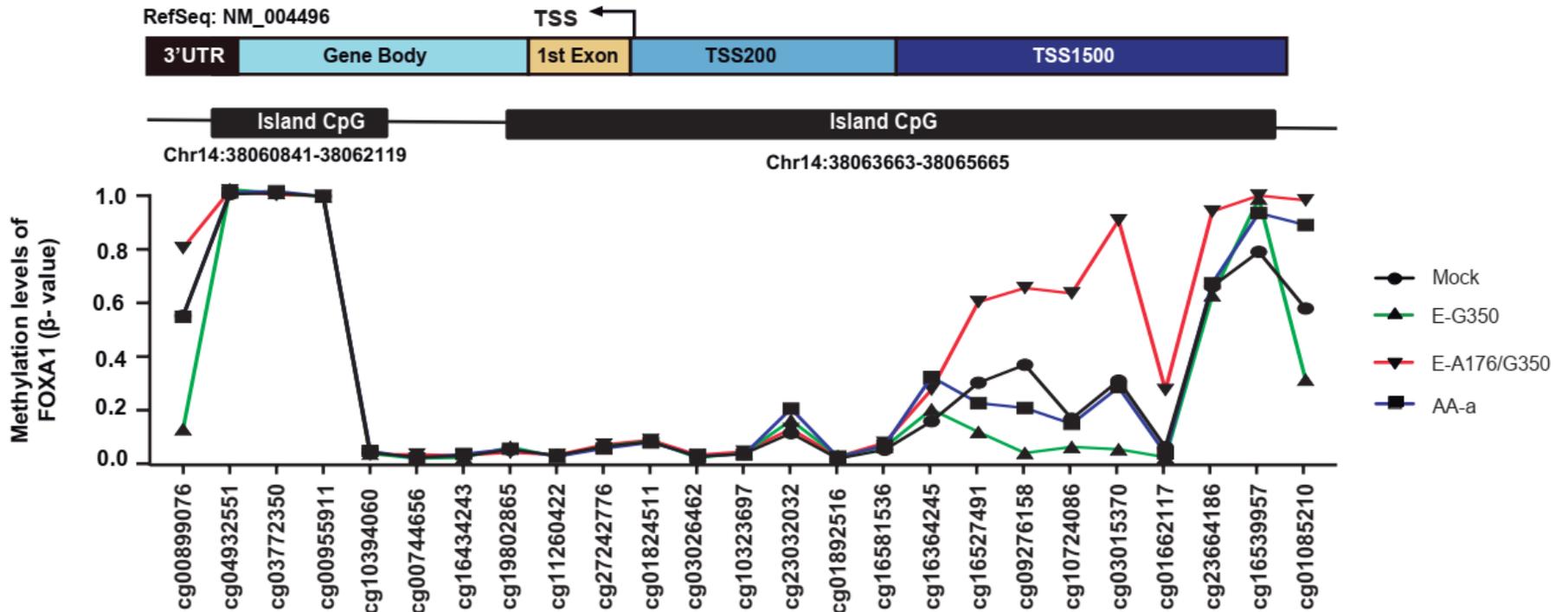


Figura suplementaria 12. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen FOXA1. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen FOXA1. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.

Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular

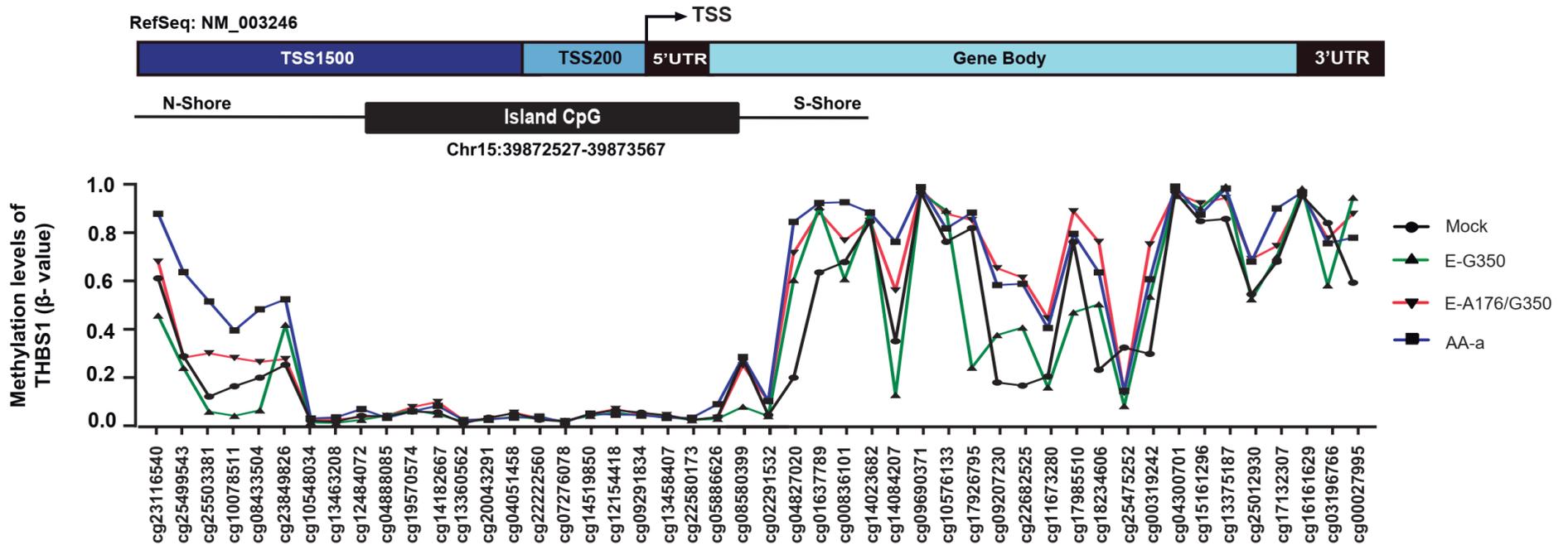


Figura suplementaria 13. Patrones de metilación de sitios CpGs establecidos por las variantes de la oncoproteína E6 de VPH 16 en el gen THBS1. En el grafico se muestran los niveles de metilación de cada uno de los sitios CpGs localizados en las diferentes regiones del gen THBS1. También se representa la localización de la isla CpG observándose los sitios CpGs que abarca. El nivel de metilación se representa como valores Beta en una escala de 0 a 1, donde el nivel de metilación va aumentando conforme el valor se acerca a 1.