



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Facultad De Ciencias Químico Biológicas

Unidad Académica de Medicina

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología

Maestría En Ciencias Biomédicas

Laboratorio de Epigenética del Cáncer

Efecto de la disminución de HOTAIR en la metilación y expresión de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1, que participan en adhesión celular, en la línea celular HeLa.

T E S I S

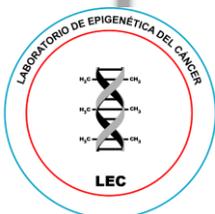
**Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

Q.B.P. Jessica Paola Gómez Sonora

Director de tesis:

Dr. Daniel Hernández Sotelo



Chilpancingo de los Bravo, Gro, enero de 2020



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 16 días del mes de enero 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 disminución de HOTAIR en la metilación y expresión de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1, que participan en adhesión celular, en la línea celular HeLa", presentada por la alumna Jessica Paola Gómez Sonora, 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.

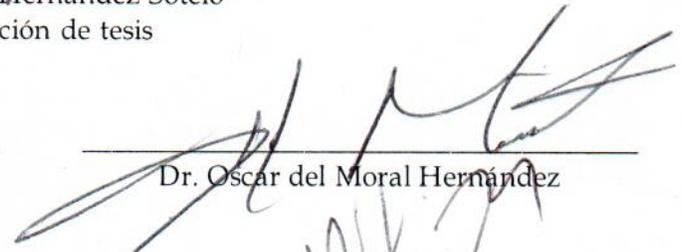
El Comité Tutorial



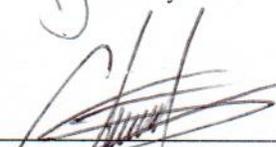
Dr. Daniel Hernández Sotelo
Dirección de tesis



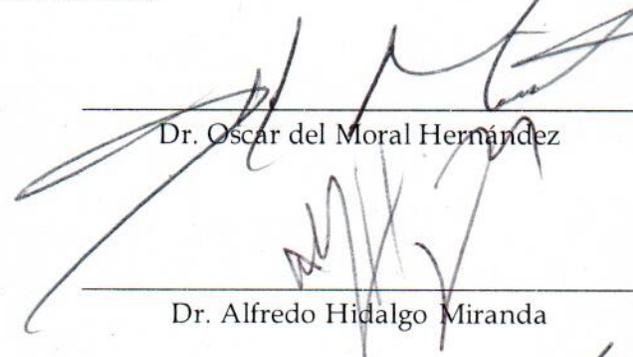
Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres



Dr. Oscar del Moral Hernández

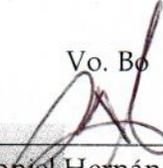


Dr. Eduardo Castañeda Saucedo



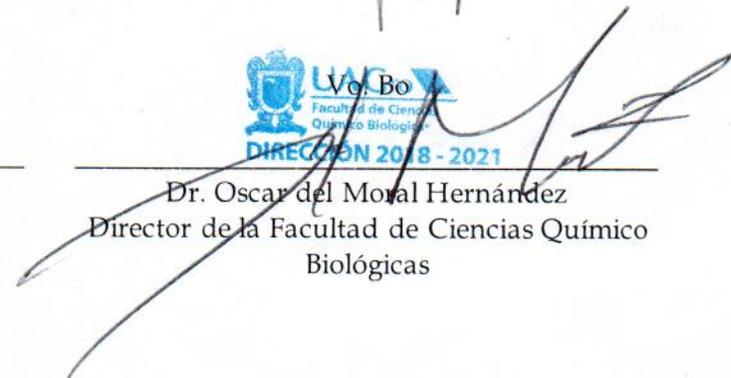
Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Vo. Bo



Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas


Vo. Bo
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021



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

Efecto de la disminución de HOTAIR en la metilación y expresión de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1, que participan en adhesión celular, en la línea celular HeLa.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Epigenética del Cáncer de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo de los Bravo; Guerrero.

Bajo la Dirección de

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Y la asesoría de

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

Dr. Oscar Del Moral Hernández

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Durante el periodo en el que la C. Jessica Paola Gómez Sonora cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, percibió el apoyo para la formación de recursos humanos, por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número CVU: 857779.

Este proyecto fue financiado por CONACyT, Ciencia Básica 2014 (242812).



AGRADECIMIENTOS

Dr. Daniel Hernández Sotelo; mi director de tesis, gracias por aceptarme en su laboratorio y darme la confianza de realizar mi proyecto de tesis.

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares, por sus aportaciones y el apoyo brindado para fortalecer este trabajo. Gracias por ser un ejemplo a seguir.

Dr. Oscar del Moral Hernández, por el tiempo invertido y las sugerencias que contribuyeron y guiaron este trabajo.

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, por sus aportaciones y sugerencias que enriquecieron a este proyecto. Gracias por la disposición en todo momento.

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, gracias por el apoyo otorgado en este trabajo.

Dra. Gloria Fernández Tilapa, por ser una guía en la elaboración de este proyecto.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Epigenética del Cáncer, por el apoyo, solidaridad y compañerismo constante.

A esas personas particulares que aparecieron en el transcurso de esta maestría, se ganaron mi cariño y aprecio sincero.

A mis amigos...

Miranda G. Juan

Mendoza Franco G.

Zuñiga E. Miriam D.

Noriega B. Brianda

Dena B. Jose L.

Cortés Graciela

No hacen falta palabras para expresarles lo que significan para mí, cada uno sabe lo importantes que son para mí y cuánto valoro su amistad. Gracias por estar siempre.

A **Jehová,** Dios, por sostenerme siempre.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Marco Antonio Gómez Mandujano (Tony)

Teresa Sonora Salado

No podría terminar de expresar cuánto los amo.

A mi familia.

A mis amigos.

Contenido

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Material y métodos	7
<i>Cultivo celular</i>	7
<i>Transfecciones</i>	7
<i>Extracción de RNA</i>	7
<i>Análisis de vías enriquecidas utilizando KEGG</i>	7
<i>Extracción de DNA</i>	8
<i>Modificación de DNA con bisulfito</i>	8
<i>PCR sensible a metilación (PCR-SM)</i>	8
<i>RT-qPCR</i>	9
Resultados	11
Análisis de enriquecimiento de vías.....	11
Disminución del nivel de expresión de HOTAIR en la línea celular HeLa.....	14
Efecto de la disminución de HOTAIR en la metilación de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1.....	15
Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de los genes CDH3, HLA-DRA, VCAM1 e ITGA8 en la línea celular HeLa.....	17
Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de las subunidades del complejo PRC2 (EZH2 y SUZ12).....	18
Discusión	19
Conclusiones	24
Referencias	25
Anexos	31
Anexo 1. Figuras suplementarias	31
Anexo 2	34
Extracción de DNA a partir de TRIzol (300µl)	34

Resumen

HOTAIR es un lncRNA que regula la expresión de genes vía metilación del DNA. En cáncer cervical HOTAIR se encuentra sobre-expresado y regula procesos celulares como migración, invasión, proliferación y apoptosis, entre otros. En las células tumorales los procesos de migración e invasión celular son favorecidos por alteraciones en el perfil de expresión de moléculas de adhesión celular, modificando la forma en que las células interactúan con la Matriz Extracelular (MEC) y con sus células adyacentes. En este trabajo fue de nuestro interés conocer el efecto de la disminución de la expresión de HOTAIR en la metilación y expresión de genes que participan en adhesión celular (CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1) en la línea celular de cáncer cervical HeLa. Para determinar dicho efecto, se disminuyó la expresión de HOTAIR mediante un RNA de interferencia. Para determinar el estado de metilación de los genes se realizó PCR-SM previa modificación del DNA con bisulfito de sodio y el nivel de expresión de los genes se determinó mediante RT-qPCR. Los resultados muestran que la disminución de HOTAIR aumenta la metilación de CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y disminuye la metilación de VCAM1. Consistente con nuestros resultados, la disminución de HOTAIR reduce la expresión de CDH3 y HLA-DRA. Por otro lado, ITGA8 y VCAM1 no se expresaron en células HeLa. De manera adicional, observamos que la disminución de HOTAIR afecta la expresión de SUZ12 y EZH2, moléculas que forman parte de PRC2. Este complejo puede regular la expresión de genes y promueve metilación del DNA vía EZH2. En conjunto, nuestros datos sugieren que HOTAIR puede regular la metilación y expresión de CDH3 y HLA-DRA y afectar la metilación de ITGA8 y VCAM1. Este mecanismo podría ser regulado por EZH2.

Palabras clave: HOTAIR, metilación del DNA, Moléculas de adhesión celular, EZH2, cáncer cervical.

Abstract

The lncRNA HOTAIR regulates gene expression through DNA methylation. HOTAIR is overexpressed in cervical cancer and modulates migration, invasion, proliferation, and apoptosis among other cellular processes. The migration and cellular invasion events in tumoral cells are enhanced by changes in the expression profile of adhesion molecules, which promotes alterations in the interaction dynamics between tumoral cells-extracellular matrix (ECM) and tumoral cells-other cells. In this project, we aimed to study the effect of downregulated HOTAIR level over methylation and expression of adhesion molecules genes (CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1) in a cervical cancer line, HeLa. To determine the HOTAIR effect in methylation and expression of CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1, we diminished HOTAIR expression using an interfering RNA. The methylation of the promoter region in all genes was determined by sodium bisulfite modification coupled to PCR-SM. Gene expression was evaluated by RT-qPCR. Our results show that the downregulated HOTAIR levels increase DNA methylation of CDH3, HLA-DRA, ITGA8 and decreased VCAM1 gene methylation. Consistently, HOTAIR downregulation reduces CDH3 and HLA-DRA expression levels. Nevertheless, we did not observe ITGA8 and VCAM1 expression in HeLa cells. Additionally, we observed that HOTAIR downregulation affects SUZ12 and EZH2 expression, which are components of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). This complex can regulate gene expression and promotes DNA methylation by EZH2. Together, our results suggest that HOTAIR regulates expression of adhesion molecules such as CDH3 y HLA-DRA through DNA methylation, also affects the promoter region methylation of ITGA8 and VCAM1 genes. This mechanism is probably catalyzed by EZH2.

Key words: HOTAIR, DNA methylation, cellular adhesion molecules, EZH2, cervical cancer.

Introducción

El cáncer es una enfermedad causada por cambios en la expresión de los genes que controlan las funciones primordiales de las células. Estos cambios pueden ser genéticos y epigenéticos. En los diferentes tipos de tumores, los defectos epigenéticos son algunas de las alteraciones celulares que conducen al fenotipo maligno (Dueñas *et al.*, 2005). Los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes, incluyen la metilación del DNA, modificaciones de histonas y la participación de RNAs no codificantes (Lu *et al.*, 2012).

La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de las citosinas, proceso llevado a cabo por DNA metil transferasas (DNMTs), dentro de un contexto de dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG), localizados generalmente dentro de islas CpGs (Fhang *et al.*, 2014). Las islas CpGs frecuentemente se encuentran en promotores de genes o exones que usualmente no están metilados en células normales (Costello *et al.*, 2000), sin embargo, en células cancerosas existen alteraciones en los patrones de metilación, en los cuales hay hipermetilación específica de genes e hipometilación global (Bhat *et al.*, 2017). La metilación aberrante de genes resulta en la activación de oncogenes, activación de transposones, pérdida de la impronta genómica y silenciamiento de genes supresores de tumor (Dueñas *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013).

Los RNAs no codificantes (ncRNAs) participan en diferentes procesos celulares y pueden regular la expresión de genes (Peng *et al.*, 2016). Los ncRNAs se clasifican en dos grupos con base en el número de nucleótidos: los ncRNAs pequeños con menos de 200 nucleótidos de longitud (incluidos los microRNAs) y los ncRNAs largos (lncRNA), con más de 200 nucleótidos (Sotillo y Tikhonenko, 2011). Algunos lncRNAs pueden actuar como estructuras de andamiaje entre la maquinaria de regulación epigenética y el DNA, permitiendo el reclutamiento de enzimas respectivas a loci genómicos específicos (Bure *et al.*, 2018). HOTAIR (RNA transcrito antisentido intergénico HOX *por sus siglas en inglés*) es un lncRNA ampliamente estudiado, cuyo

gen se localiza en el locus HOXC en el cromosoma 12q13.13 y es codificado de la cadena antisentido (Rinn *et al.*, 2007).

HOTAIR actúa como una molécula de andamiaje para coordinar el reclutamiento de complejos asociados a represión transcripcional, como PRC2 (formado por las subunidades EZH2, SUZ12 y EDD) y el complejo LSD1/CoREST-REST. La interacción HOTAIR-PRC2 promueve la H3K27me3 (la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3), e inhibe la expresión de genes. Asimismo, la interacción HOTAIR-LSD1/CoREST-REST promueve la desmetilación de H3K4me2, y contribuye al silenciamiento de genes (Gupta *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2010). HOTAIR promueve, además, cambios en la metilación del DNA en distintos genes y puede cumplir un papel dual ya sea promoviendo o disminuyendo la metilación (Bure *et al.*, 2018). La proteína EZH2, una de las subunidades del complejo PRC2, puede reclutar DNMTs y modificar la metilación del DNA (Vire *et al.*, 2006), lo que sugiere que HOTAIR regula la metilación del DNA a través de la interacción indirecta con DNMTs. Se ha reportado en cáncer de ovario que HOTAIR induce cambios en la metilación del DNA en distintos genes, algunos de ellos genes blanco de PRC2 (Teschendorff *et al.*, 2015).

Varios estudios muestran que HOTAIR está sobre-expresado en distintos tipos de cáncer (Wu *et al.*, 2014). En cáncer cervical, HOTAIR se encuentra sobre-expresado, evento que se ha asociado con el aumento de la invasión, migración y proliferación celular (Huang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Jing *et al.*, 2015). La metilación aberrante de genes es un evento temprano y frecuente en este tipo de cáncer (Yang *et al.*, 2013) y se ha reportado la hipometilación de oncogenes, así como la hipermetilación de genes supresores de tumor, los cuales en células normales pueden participar en distintos procesos biológicos; genes pro-apoptóticos como DAPK (proteína cinasa asociada a muerte); genes relacionados con la reparación del DNA, como MGMT; genes implicados en la regulación del ciclo celular, como p16 y genes que participan en la adhesión celular como CDH1; que, en cáncer, son silenciados debido a hipermetilación en su promotor (Yin *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2012).

Recientemente en nuestro grupo, se realizó el análisis de la metilación global en respuesta a la disminución de HOTAIR en la línea celular HeLa. Los resultados mostraron 795 sitios CpGs diferencialmente metilados (correspondientes a 488 genes: 384 genes hipermetilados y 104 genes hipometilados). Una vez que se analizó la función en la que participan dichos genes se encontró que 488 genes están implicados en vías relacionadas a cáncer, tales como la vía WNT, endocitosis, moléculas de adhesión celular, entre otras (Blanco, E., datos no publicados).

Una de las vías principales en la que participan los genes con cambios en la metilación del DNA es la vía que involucra moléculas de adhesión celular. La adhesión celular involucra la unión de células a la matriz extracelular (MEC), la unión a otras células, o bien, a una superficie específica. Este proceso es esencial para el crecimiento y supervivencia de la célula. Alteraciones en la adhesión célula-MEC y célula-célula facilitan la invasión y metástasis (Szalmás *et al.*, 2009). De hecho, en cáncer es común la inhibición de la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión celular que permiten el anclaje célula-célula o célula-MEC. Por otro lado, también existe sobre-expresión de moléculas de adhesión asociadas a migración celular y a otros procesos (Hanahan y Weinberg, 2011).

Algunos de los genes que participan como moléculas de adhesión celular y que presentaron cambios en la metilación del DNA fueron cadherina 3 (CDH3), subunidad alfa de integrina 8 (ITGA8), complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, DR alfa (HLA-DRA) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1). Diversos estudios indican que el aumento o disminución de la expresión de estos cuatro genes tienen un papel importante en diversos tipos de cáncer. Actualmente no existen reportes del estado de metilación y expresión de estos genes en cáncer cervical, así como del efecto de la metilación en el nivel de su expresión. Por lo anterior, en este trabajo estamos interesados en evaluar el efecto de HOTAIR en la metilación y expresión de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1, implicados en la adhesión celular en células HeLa.

Material y métodos

Cultivo celular. Las células HeLa fueron sembradas en medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM-F12), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2.0 mM de L-glutamina, 1.0 mM de piruvato de sodio, 100 µg de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina (Gibco-BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e incubadas a 37°C en 5% de CO₂.

Transfecciones. Para disminuir los niveles de expresión de HOTAIR, las células HeLa se sembraron en placas de 12 pozos hasta una confluencia del 80%. Después se transfectaron a las 0 y 24 h con 3.28 µL (20 µM) de DsiHOTAIR (RNA de interferencia dirigido para HOTAIR) y/o DsiControl (RNA de interferencia control) (No. Cat. 51011403, Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos) mediante el uso de lipofectamina 2000 (No. Cat. 11668019, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). La secuencia DsiHOTAIR utilizada fue 5' UAA CAA GAC CAG AGA GCU GUU y para DsiControl (NC) 5' CUA CAA CAG CCA CAA CGU CdTdT. Las células se cosecharon a las 48 h post-transfección para los análisis posteriores.

Extracción de RNA. Se realizó extracción de RNA total con TRIzol (No. Cat. 15596018, lote 144303, Ambion by Life Technologies, Estados Unidos). Las células transfectadas se lavaron 2 veces con PBS 1x frío y estéril, se agregaron 400 µL de TRIzol, 80 µL de cloroformo, 500 µL de isopropanol frío y 200 µL de etanol al 70%. Finalmente, el RNA se resuspendió en 20 µL de agua DEPC. La cuantificación del RNA se realizó mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), a una longitud de onda de 260/280 nm.

Análisis de vías enriquecidas utilizando KEGG. A partir de los datos obtenidos del microarreglo de metilación HumanMethylation450 BeadChip (Blanco, E., datos no

publicados), se realizó el análisis de enriquecimiento de vías de los genes en los que aumentó o disminuyó la metilación, clasificando los grupos de acuerdo con las diferentes regiones genómicas analizadas (promotor, cuerpo del gen, 1er exón, regiones 5' y 3'UTR). Para el análisis de enriquecimiento se utilizó la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y, con base en los criterios del programa, el análisis de enriquecimiento de genes fue considerado significativo cuando el valor de $p \leq 0.05$.

Extracción de DNA. Se realizó extracción de DNA total de las células transfectadas con el DsiHOTAIR y DsiCONTROL utilizando el Experimental protocol for DNA isolation (Invitrogen, No. Cat. 15596026) con algunas modificaciones (Anexo 2). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría usando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), a una longitud de onda de 260/280 nm.

Modificación de DNA con bisulfito. Se modificaron 2 μ g de DNA utilizando el Kit EZ DNA Methylation-Gold™ (No. Cat. D5006, lote: ZRC183408; Zymo Research, The Epigenetics COMPANY; México, CDMX) para la conversión con bisulfito de sodio; la preparación de las muestras y reactivos se realizó siguiendo las instrucciones sugeridas en el protocolo, con algunos cambios. El DNA modificado se eluyó en 20 μ l de agua estéril y fue utilizado para la PCR-SM.

PCR sensible a metilación (PCR-SM). El estado de metilación en los genes se analizó mediante PCR-SM utilizando el DNA modificado con bisulfito de sodio. Se utilizó el kit AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Lote: 1803072, Applied Biosystem, Estados Unidos) en un volumen final de 10 μ L. La secuencia de los oligonucleótidos y la temperatura de alineamiento para cada gen se indican en la Tabla 1. Los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 10 μ M para VCAM1 y a 5 μ M para CDH3, HLA-DRA e ITGA8. Las condiciones de amplificación para cada gen fueron 10 min a 95°C, seguido de 35, 33 o 32 ciclos (CDH3, ITGA8, HLA-DRA y

VCAM1, respectivamente) de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de alineamiento indicada en la Tabla 1, 30 s a 72°C y finalmente 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2%, visualizados bajo luz UV y fotografiados.

RT-qPCR. Para determinar el nivel de expresión de los genes estudiados se utilizó el reactivo SCRIPT One-Step RT-qPCR Green Master highROX (Lote: 116.153, Jena Bioscience, Jena, Alemania). Se utilizaron 100 ng de RNA total y oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 1) (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 15 min a 50°C, 5 min a 95°C (retrotranscripción), y 40 ciclos a 5 s a 95°C, 30 s a la temperatura de amplificación de cada gen (ver Tabla 1), 30 s a 72°C. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL utilizando el equipo QuanStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, California, Estados Unidos). Para cada reacción se utilizaron 2.0 µL de H₂O, 5 µL del Mix SCRIPT Green Master, 0.5 µL de cada oligonucleótido (sentido y antisentido, 10 µM) y 2.0 µL de RNA total (50 ng/µl). Los datos fueron normalizados usando GAPDH como control endógeno y los niveles de expresión se determinaron utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en este estudio

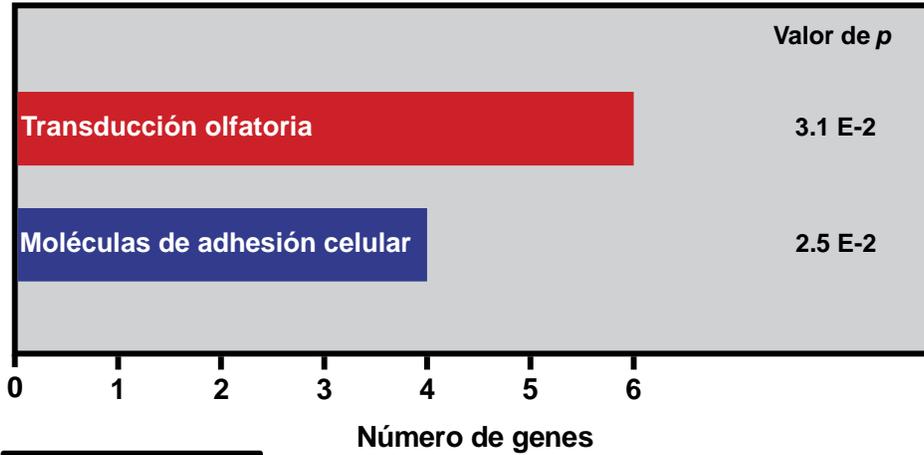
Gene	Secuencia	TA	Referencia
PCR-SM			
<i>CDH3</i>	F5' GGC GGG ATT TCG TGG CGT R5' ATA AAA CAA CTA CCG CGA CG	57	Paredes, <i>et al.</i> , 2005
<i>ITGA8</i>	F5' GCG GGT GGG AGT AGA CGT C R5' CTA CCC AAA AAC GCG AAC CG	57	Cai, <i>et al.</i> , 2007
<i>HLA-DRA</i> **	F5' TGG GAG GTA GAA GTA GGT AGA TTA C R5' TCC CGA ATA ACT AAA ACT ACA AAC G	55	--
<i>VCAM1</i> **	F5' TAT TTT ATT TCG CGG TAT TTG TAT C R5' CCC AAA CAT TTT AAA TTA CTA TCG TA	55	--
RT-qPCR			
<i>HOTAR</i> **	F5' CAG TGG GGA ACT CTG ACT CG R5' GTG CCT GGT GCT CTC TTA CC	60	--
<i>GAPDH</i> **	F5' CCG GGA AAC TGT GGC GTG ATG G R5' AGG TGG AGG AGT GGG TGT CGC TGT T	60	--
<i>CDH3</i>	F5' TGA CCA CAA GCC CAA GTT TAC R5' TAA GCA ACC ACC CCA TTG TAG	60	Kumara <i>et al.</i> , 2017
<i>ITGA8</i>	F5' ACA TTC TGG TGG ACT GTG G R5' AAT CCC TTG TTG TTG CGT TC	60	Ryu <i>et al.</i> , 2016
<i>HLA-DRA</i>	F5' CAA AAG CAA TGC AGC AGA AC R5' GCC AGC TTT GTA AAG CCA TT	57	Lee, <i>et al.</i> , 2012
<i>VCAM1</i>	F5' CGA ATGA GGG GAC CAC ATC T R5' GAC TGT GAT CGG CTT CCC AG	62	Cao, <i>et al.</i> , 2017
<i>EZH2</i> **	F5' GTA CAC GGG GAT AGA GAA TGT GG R5' GGT GGG CGG CTT TCT TTA TCA	65	--
<i>SUZ12</i> **	F5' AGG CTG ACC ACG AGC TTT TC R5' GGT GCT ATG AGA TTC CGA GTT C	60	--
TA, temperatura de alineamiento; ** Iniciadores diseñados			

Resultados

Análisis de enriquecimiento de vías

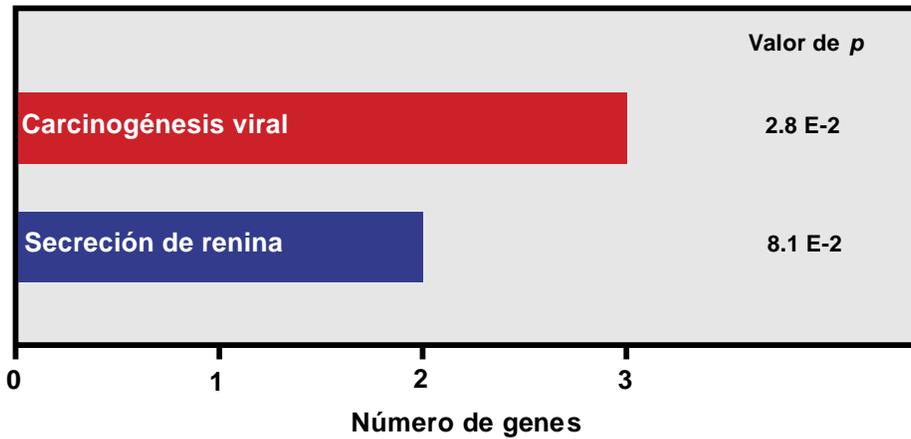
Para identificar en qué vías o procesos biológicos están implicados los genes con cambios en el nivel de metilación (identificados en el arreglo de metilación HumanMethylation450 BeadChip), se realizó el análisis de vías enriquecidas utilizando la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). El análisis se realizó a partir de 417 genes diferencialmente metilados en respuesta a la disminución de HOTAIR. Se realizó el análisis KEGG para cada grupo de genes: 108 genes con aumento y 24 genes con disminución de la metilación en el promotor (Figura 1a y b), 226 genes con aumento y 59 genes con disminución de la metilación en el cuerpo del gen (Figura 1c y d). Asimismo, se realizó el análisis para 7 genes en los que aumentó o disminuyó la metilación en el primer exón, 49 genes con aumento o disminución de la metilación en la región 5'UTR y 9 genes con aumento o disminución de la metilación en la región 3'UTR, en los que no encontramos vías o procesos celulares enriquecidos (datos no mostrados). El análisis KEGG fue considerado significativo cuando el valor de $p \leq 0.05$. Cabe señalar que las vías con mayor significancia fueron moléculas de adhesión celular (1a) y Endocitosis (1c). Para este trabajo, nos interesamos en los genes involucrados en la vía de moléculas de adhesión celular, dada la importancia que tiene la adhesión celular en el desarrollo y progresión del cáncer (Szalmás *et al.*, 2009), y por la importancia que tiene la metilación de promotores en la expresión de genes (Fang *et al.*, 2014).

a) 108 genes que aumentan la metilación en el promotor



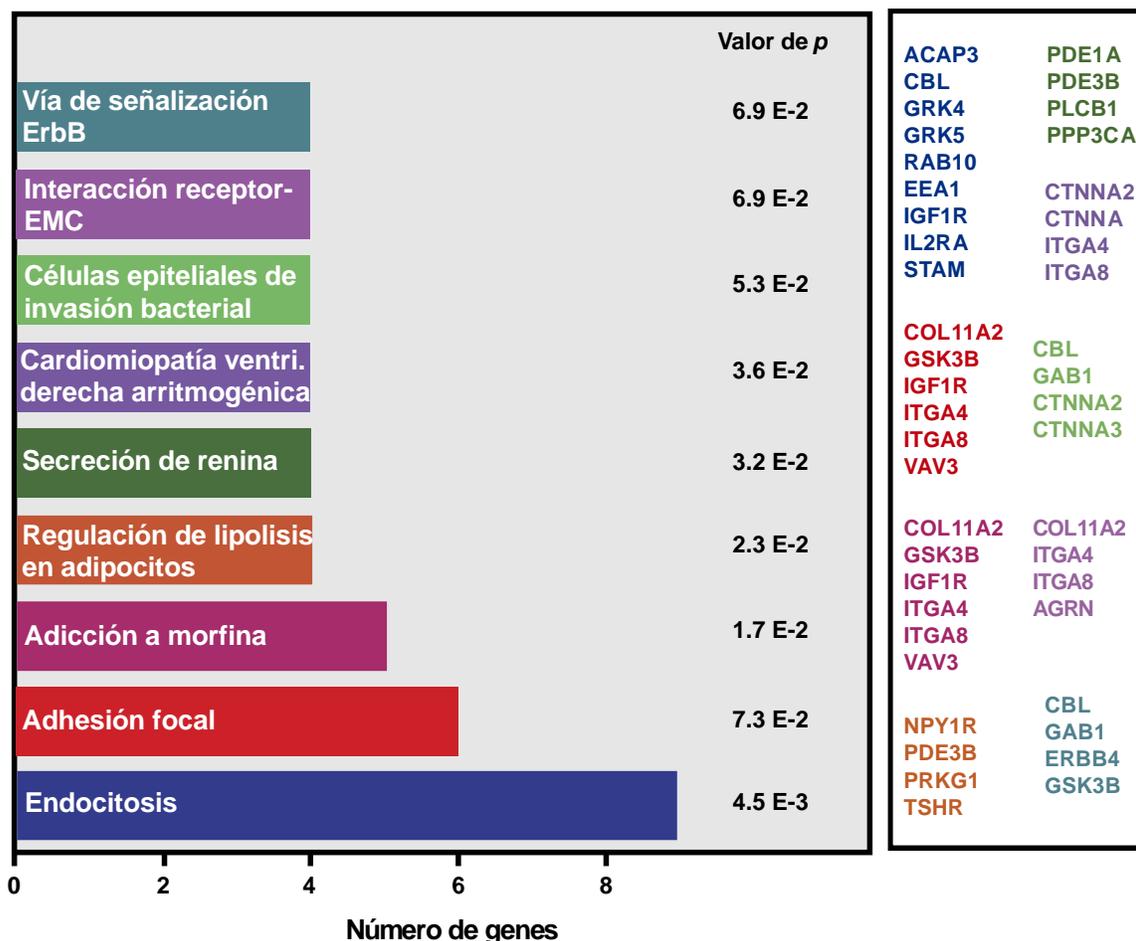
OR10A2	CDH3
OR10A6	ITGA8
OR4K14	HLA-DRA
OR5K4	VCAM1
OR8U8	
PRKG1	

b) 24 genes que disminuyen la metilación en el promotor



CCNA2	GNAS
DLG1	KCNMA1
HIST1H4B	

c) 226 genes que aumentan la metilación en el cuerpo del gen



d) 59 genes que disminuyen la metilación en el cuerpo del gen

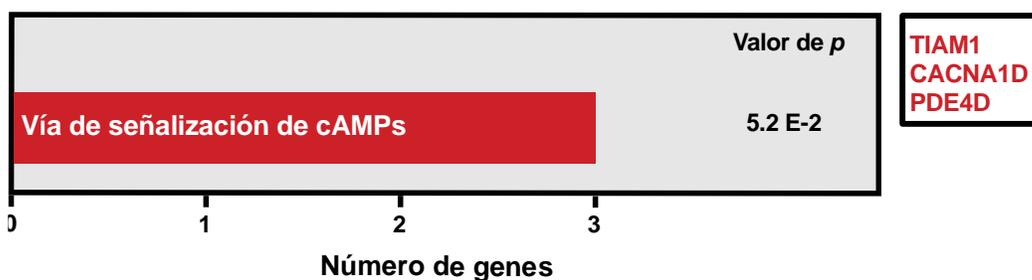


Figura 1. Análisis de vías enriquecidas mediante KEGG. Se realizó el análisis de las vías en las que participan 132 genes diferencialmente metilados en el promotor y 285 genes diferencialmente metilados en el cuerpo del gen. **a)** Se muestra el análisis de enriquecimiento de 108 genes en los que aumenta la metilación en el promotor, **b)** Análisis de enriquecimiento de 24 genes en los que disminuye la metilación en el promotor, **c)** Análisis de enriquecimiento de 226 genes en los que aumenta la metilación en el cuerpo del gen y **d)** Análisis de enriquecimiento de 59 genes en los que disminuye la metilación en el cuerpo del gen.

Disminución del nivel de expresión de HOTAIR en la línea celular HeLa.

HOTAIR se encuentra sobre-expresado en distintos tipos de cáncer y su función como regulador maestro de genes promueve la presencia de eventos biológicos que favorecen al cáncer, incluido el cáncer cervical (Huang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). Para evaluar el efecto de HOTAIR en la metilación y expresión de genes en la línea celular HeLa, montamos un modelo de estudio en el cuál se disminuyó el nivel de expresión de HOTAIR mediante transfección con DsiHOTAIR y DsiControl. Las células fueron cosechadas 48h post-transfección y se determinó el nivel de expresión de HOTAIR por RT-qPCR. Los resultados del nivel de expresión de HOTAIR en células transfectadas con DsiHOTAIR muestran que disminuye 80% su expresión respecto a las células transfectadas con el DsiControl (Figura 2). Lo anterior indica la eficiencia del DsiHOTAIR empleado en nuestro modelo experimental.

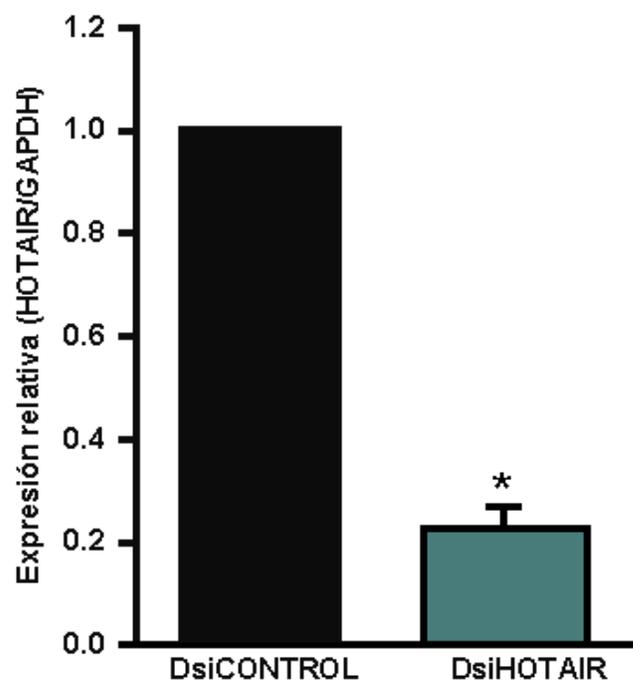


Figura 2. Disminución del nivel de expresión de HOTAIR en la línea celular HeLa mediante DsiRNA. Las células HeLa fueron transfectadas con un DsiRNA dirigido para HOTAIR y un DsiRNA control. El nivel de HOTAIR fue determinado por RT-qPCR y normalizado respecto a GAPDH. Los resultados son expresados como la media \pm D.E. (Desviación Estándar), de al menos tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$

Efecto de la disminución de HOTAIR en la metilación de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1.

Dado que HOTAIR tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes, un gran número de éstos puede cambiar su expresión en función del nivel de expresión de HOTAIR (Gupta *et al.*, 2010). Sin embargo, los mecanismos por los cuales regula su expresión de genes son diversos. La metilación del DNA es un mecanismo epigenético que regula la expresión de genes y se sabe que HOTAIR modula la metilación del DNA (Blanco, n.d.; Teschendorff *et al.*, 2015). Para evaluar el efecto de la disminución de HOTAIR en la metilación de los promotores de los genes CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1, se realizó PCR-SM. Los resultados muestran que la disminución de HOTAIR aumenta la metilación en el promotor de CDH3, ITGA8 y HLA-DRA y disminuye la metilación en el promotor de VCAM1 (Figura 3a-d). Aunque los resultados respecto a CDH3 y HLA-DRA no fueron significativos, los resultados sugieren que HOTAIR afectar la metilación de los cuatro genes.

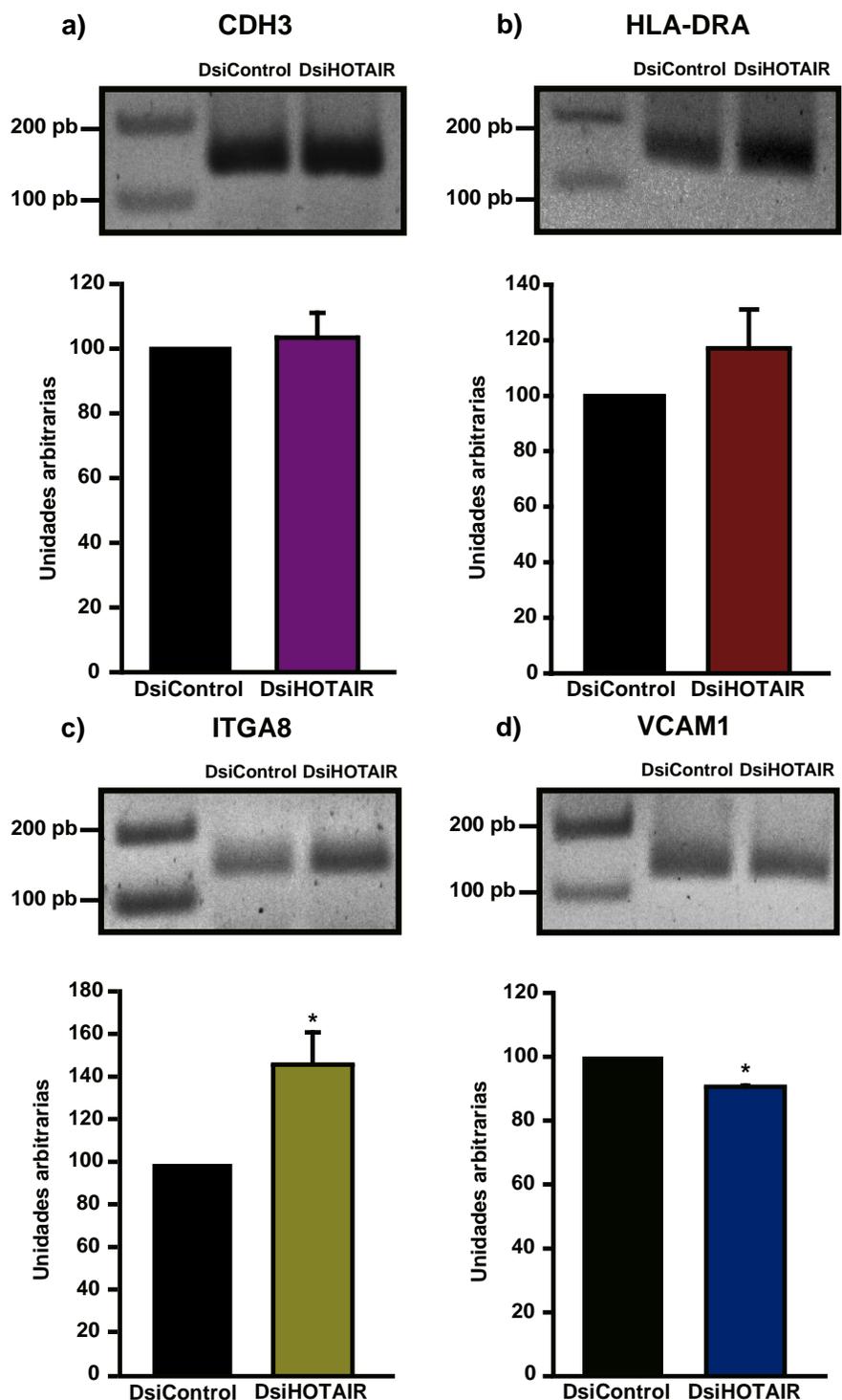


Figura 3. Efecto de HOTAIR en la metilación de los genes CDH3, HLA-DRA, ITGA8, y VCAM1 en la línea celular HeLa. a-d (parte superior). Imagen representativa del estado de metilación del promotor de cada gen, tanto en células DsiControl, como en células DsiHOTAIR. **a-d (parte inferior).** Semi-cuantificación del nivel de metilación de cada gen mediante densitometría. Los resultados son expresados como la media \pm D.E. (Desviación Estándar) de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$

Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de los genes CDH3, HLA-DRA, VCAM1 e ITGA8 en la línea celular HeLa.

Para evaluar el efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de los genes antes mencionados realizamos RT-qPCR del RNA obtenido de células HeLa transfectadas con DsiControl y DsiHOTAIR. Los resultados sugieren que la disminución de HOTAIR reduce la expresión de CDH3 y HLA-DRA respecto a células control (Figura 4a y b). Por otro lado, observamos que los RNAm de ITGA8 y VCAM1 no pudieron ser detectados en la línea celular HeLa. Para demostrar que nuestro sistema de detección de estos RNAm funciona, los detectamos en células HS587T y HCC1187 (líneas celulares de cáncer de mama), en las cuales previamente se ha reportado la presencia de los mensajeros de ITGA8 y VCAM1. En la figura 4c mostramos que se lograron amplificar ambos genes.

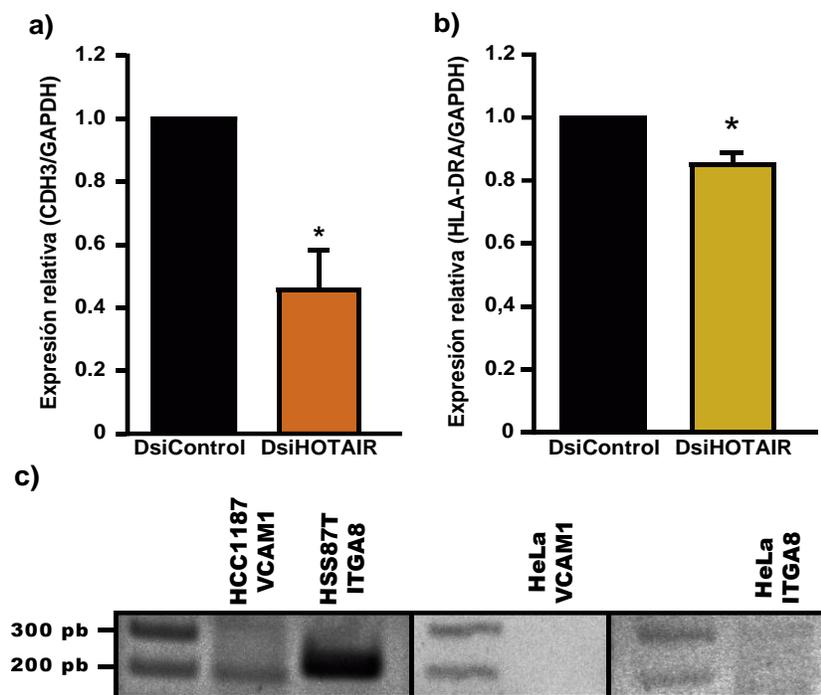


Figura 4. Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de los genes CDH3, HLA-DRA, ITGA8, y VCAM1. Las células HeLa fueron transfectadas con un DsiRNA dirigido para HOTAIR y DsiRNA control. El nivel de expresión de los 4 genes fue determinado por RT-qPCR y normalizado respecto a GAPDH. Las gráficas muestran el nivel de expresión de CDH3 y HLA-DRA en la línea celular HeLa (**a** y **b**). La expresión de ITGA8 y VCAM1 fue detectada únicamente en la línea celular HSS87T y HCC1187, respectivamente, pero no en células HeLa (**c**). Los resultados son expresados como la media \pm D.E. (Desviación Estándar), de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de las subunidades del complejo PRC2 (EZH2 y SUZ12).

Ha sido bien caracterizado que HOTAIR regula la expresión de genes a través de su interacción con PRC2, formado por las subunidades EZH2, SUZ12 y EDD. Asimismo, se ha observado que los patrones de expresión de genes cambian en función de la expresión de las subunidades de este complejo (Gupta *et al.*, 2010). Aunado a esto, uno de los mecanismos por los cuales HOTAIR podría regular la metilación del DNA es a través del reclutamiento de DNMTs mediante EZH2, por lo tanto, decidimos evaluar el efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de las subunidades EZH2 y SUZ12, y se observó que la disminución de HOTAIR disminuye la expresión de SUZ12 y aumenta la expresión de EZH2, sin embargo, éste último dato no resultó significativo (Figura 5).

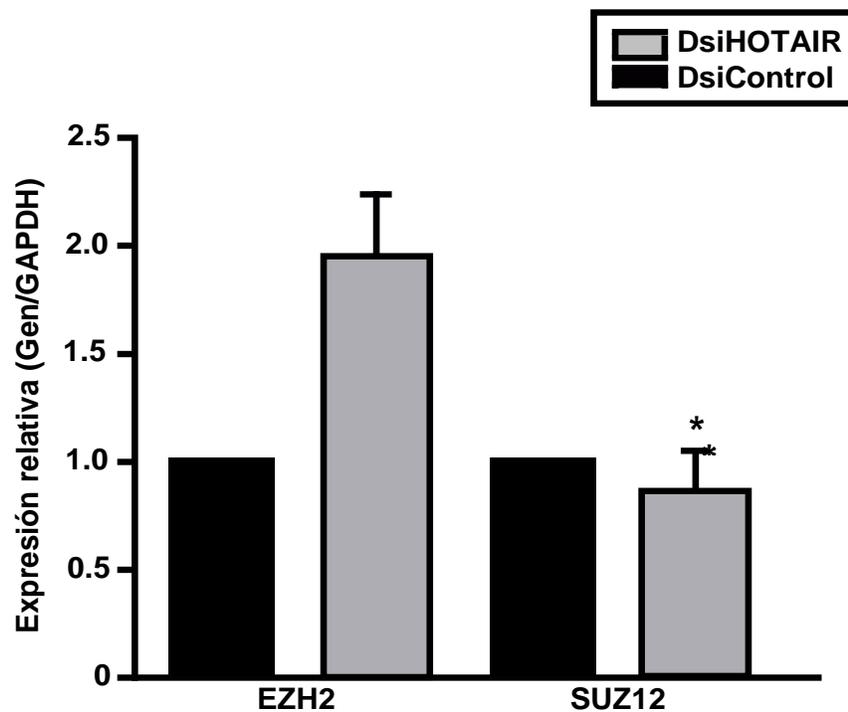


Figura 5. Efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de los genes EZH2 y SUZ12 en la línea celular HeLa. Las células fueron transfectadas con DsiControl y DsiHOTAIR y posteriormente cosechadas 48h post-transfección. El nivel de expresión de EZH2 y SUZ12 fue determinado mediante RT-qPCR y normalizado respecto a GAPDH. Los resultados son expresados como la media \pm D.E. (Desviación Estándar) de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$.

Discusión

Los lncRNAs pueden coordinar la dinámica de la cromatina, modular la estabilidad de RNAs no codificantes y RNAm y regular la metilación del DNA para en su conjunto modular la expresión de genes (Forrest *et al.*, 2017). HOTAIR es un lncRNA que se encuentra sobre-expresado en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer cervical (Huang *et al.*, 2014). El efecto de HOTAIR en procesos que favorecen el cáncer es mediado, en parte, por la regulación de la expresión de genes que cumplen un papel importante en la regulación de dichos procesos. Uno de los mecanismos por los cuales HOTAIR regula la expresión de genes es vía metilación del DNA, ya sea al reclutar DNMTs a través del complejo PRC2 (Vire *et al.*, 2006) o al regular la expresión de DNMTs (Fang *et al.*, 2016; Blanco n.d.).

Previamente, en nuestro grupo se realizó un análisis de metilación global en respuesta a la disminución de HOTAIR en la línea celular HeLa. Se observó que alrededor de 400 genes cambian su metilación y dichos genes participan en distintos procesos o vías relacionadas con el cáncer (Blanco, E., datos no publicados).

Posteriormente, realizamos el análisis KEGG para identificar las vías o procesos celulares en las que participan los genes con cambios significativos en la metilación del DNA en las distintas regiones genómicas en respuesta a la disminución de HOTAIR. La metilación de sitios CpGs en los promotores de genes está asociada con condensación de la cromatina e inhibición de la transcripción (Costello *et al.*, 2000). El silenciamiento de genes supresores de tumor vía metilación de su promotor es un evento común de la carcinogénesis cervical (Yang *et al.*, 2013; Clarke *et al.*, 2017). Por otra parte, el efecto de la metilación del DNA en los cuerpos de genes no ha sido completamente entendido. De manera general, el aumento de la metilación en estas regiones se asocia con transcripción activa y es tejido y gen específica (Jones *et al.*, 2012; Bure *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2014).

Nuestros resultados mostraron que las principales vías enriquecidas de manera significativa fueron la vía de moléculas de adhesión celular (Figura 1a), la vía de

carcinogénesis viral (Figura 1b), la vía de endocitosis (Figura 1c) y no se observaron vías significativamente enriquecidas para los genes con disminución de la metilación en el cuerpo del gen (Figura 1d). Alteraciones en estas vías pueden contribuir en el desarrollo del cáncer. En muchos tipos de cáncer, cambios en la adhesión de células neoplásicas, así como de la señalización intracelular mediada por moléculas de adhesión celular, juegan un papel esencial en el desarrollo y progresión del cáncer (Zigler *et al.*, 2010). Alteraciones en la adhesión celular y en la expresión de proteínas de adhesión han sido reportadas en cáncer cervical y sus lesiones precursoras (de Mendez *et al.*, 2011). Asimismo, la hipermetilación de moléculas de adhesión celular, como CADM1, es observada en cáncer cervical y se ha reportado que la demetilación del DNA reduce la proliferación celular (Woo *et al.*, 2015).

En este trabajo nos enfocamos en los genes con aumento de la metilación en sus promotores particularmente de: CDH3, ITGA8, HLA-DRA y VCAM1 en la línea celular HeLa. Para ello, disminuimos el nivel de expresión de HOTAIR en la línea celular HeLa (Figura 2) y evaluamos la metilación del DNA en los promotores de los 4 genes mencionados. Encontramos que la disminución de HOTAIR aumenta la metilación de CDH3, ITGA8 y HLA-DRA, y reduce la metilación de VCAM1 (Figura 3a-d).

CDH3 es una glicoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio, la cual es crucial en la conservación de la integridad estructural de tejidos epiteliales y puede estar involucrada en distintas enfermedades, incluido el cáncer (Vieira *et al.*, 2015). Nosotros observamos que la disminución de HOTAIR aumenta ligeramente la metilación del DNA en el promotor de CDH3 en células HeLa (Figura 3a). Esta proteína se sobre-expresa en distintos tipos de cáncer, como el cáncer de mama (Shimoyama *et al.*, 1991), ovario (Song y Naora, 2014), y colorectal, entre otros. Además, en cáncer colorectal la desmetilación de CDH3 es frecuentemente encontrada en etapas avanzadas de esta enfermedad, lo cual se correlaciona con el aumento en su expresión (Kumara *et al.*, 2017; Hibi *et al.*, 2009).

Nosotros observamos que la disminución de HOTAIR reduce la expresión de CDH3, probablemente vía metilación de su promotor. Tomando en cuenta que la disminución

de HOTAIR reduce el fenotipo tumoral y aunado a que CDH3 se sobre-expresa en muestras de pacientes con carcinoma cervical y endocervical de células escamosas (CESC, *por sus siglas en inglés*) (Figura suplementaria 1a), podríamos sugerir que la sobre-expresión de CDH3 tiene un papel posiblemente oncogénico en cáncer cervical. La expresión de CDH3 puede ser regulada por distintos factores de la transcripción tales como c-Myc, p63 y C/EBP β (Albergaria *et al.*, 2011). Se ha observado que BRCA1 forma un complejo represor con c-Myc, el cual se une al promotor de CDH3 y bloquea su transcripción (Gorski *et al.*, 2010); por otro lado, se ha observado que BRCA1 se une a EZH2 justo en el dominio de unión en el cual se une HOTAIR, de tal manera que BRCA1 compite con HOTAIR para unirse a EZH2 (Wang *et al.*, 2013). Esto puede sugerir que en ausencia de HOTAIR, BRCA1 podría unirse con mayor afinidad a EZH2 y reprimir la expresión de CDH3 vía metilación. Además, nuestros resultados muestran que EZH2 no reduce su expresión en respuesta a la disminución de HOTAIR (Figura 5), lo cual sugiere que EZH2 podría seguir reclutando DNMTs en el promotor de genes blanco de BRCA1 diferentes a los que se une cuando interactúa con HOTAIR.

Al evaluar la metilación de HLA-DRA, los resultados sugieren que la disminución de HOTAIR aumenta ligeramente la metilación (Figura 3b) y reduce la expresión de HLA-DRA (Figura 4b). HLA-DRA se sobre-expresa en líneas celulares de melanoma (Kim *et al.*, 2002) y cáncer de ovario (Rangel *et al.*, 2004). Asimismo, se han observado niveles de expresión altos en monocitos de sangre periférica (MSPs) de pacientes con carcinoma cervical escamoso y niveles elevados fueron asociados con la progresión de la enfermedad (Feng *et al.*, 2012). Esto sugiere que HOTAIR podría regular la metilación de HLA-DRA y posiblemente regular su expresión en la línea celular HeLa, tomando en cuenta que el aumento de la metilación en el promotor es un mecanismo de silenciamiento epigenético. Sin embargo, los resultados del aumento de la metilación en el promotor de HLA-DRA no son significativos, pero el cambio en la expresión de este gen sí, por lo que no podemos descartar que otros factores regulen la expresión de este gen. Aunado a esto, observamos que la expresión de HLA-DRA es más alta en CESC respecto a tejido normal (Figura suplementaria 1b).

La proteína NF-kB es uno de los factores de la transcripción que regula la expresión de HLA-DRA (Lee *et al.*, 2006). Se ha observado que la disminución de HOTAIR reduce la expresión de genes blanco de NF-kB vía inhibición del reclutamiento de NF-kB y sus cofactores a promotores de sus genes blanco (Obaid *et al.*, 2018).

También se evaluó la metilación en el promotor de ITGA8. No existe suficiente evidencia sobre su papel en cáncer. Un estudio realizado en muestras de cáncer colorectal, demostró que ITGA8 se encuentra hipermetilado y esta condición se asocia con disminución de su expresión (Sin *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha observado que ITGA8 se sobre-expresa en mieloma múltiple (Ryu *et al.*, 2016). En este trabajo, ITGA8 se encuentra hipermetilado en respuesta a la disminución de HOTAIR en la línea celular HeLa (Figura 3c), sin embargo, no pudimos evaluar el efecto de la metilación en la expresión de ITGA8, dado que este gen no se expresa en células HeLa (revisado en Genome browser). Aunque en nuestro modelo de estudio ITGA8 no se expresa, se ha observado que en cáncer de mama este gen podría tener un papel interesante y relacionado al nivel de HOTAIR (Gupta *et al.*, 2010).

Analizamos el estado de metilación de VCAM1, cuya sobre-expresión está estrechamente asociada con progresión de tumor y metástasis. La disminución de VCAM1 en células de cáncer de pulmón reduce la migración celular (Kim *et al.*, 2017), y en cáncer de mama VCAM1 está sobre-expresado y participa en la metástasis (Sharma *et al.*, 2017). Actualmente, no existen reportes de si la expresión de VCAM1 es regulada vía metilación del DNA. Nuestros resultados sugieren que la disminución de HOTAIR reduce la metilación del promotor de VCAM1 (Figura 3d) en células HeLa, a pesar de que la disminución de la metilación en el promotor se asocia de manera general con activación transcripcional, este cambio no fue suficiente para inducir la expresión de VCAM1 en esta línea celular (Figura 4c). Por otro lado, observamos que la expresión de ITGA8 y VCAM1 es menor en CESC respecto a tejido normal (Figura suplementaria 1c y d), lo cual concuerda con lo observado en nuestro modelo de estudio.

Finalmente, analizamos la expresión de EZH2 y SUZ12 en respuesta a la disminución de HOTAIR, ambos son parte de PRC2, complejo que participa en el silenciamiento de diversos genes. Nuestros resultados muestran que la disminución de HOTAIR aumenta ligeramente la expresión de EZH2 y reduce la expresión de SUZ12 (Figura 5). Se ha observado que SUZ12 se sobre-expresa en cáncer de colon (Liu *et al.*, 2015) y cáncer gástrico. En este último, la expresión incrementada de SUZ12 se correlaciona con aumento de la proliferación celular y metástasis, mientras que la disminución de SUZ12 reduce la proliferación celular e invasión, conduciendo a la inhibición de la metástasis (Xia *et al.*, 2015). Además, HOTAIR induce la metilación y reprime la expresión de supresores de tumor como PCDH10 de manera dependiente de SUZ12 (Lee *et al.*, 2016), lo cual sugiere que la expresión de SUZ12 favorece el fenotipo maligno. Por otro lado, la expresión de EZH2 está aumentada en varios tipos de cáncer, evento que favorece la enfermedad. Sin embargo, en algunos otros tipos de cáncer se ha observado que la supresión de EZH2 promueve la progresión del cáncer, sugiriendo que EZH2 podría tener algún papel supresor de tumor (Yan *et al.*, 2017). Por lo tanto, EZH2 parece tener un papel dual (oncogénico o supresor tumoral) dependiendo de las proteínas con las que forme complejos, como por ejemplo puede interactuar con HOTAIR o BRCA1 (Wang *et al.*, 2013).

Conclusiones

- La disminución de HOTAIR reduce la expresión de CDH3 y HLA-DRA probablemente vía metilación de su promotor.
- Por otro lado, la disminución de HOTAIR aumenta ligeramente la expresión de EZH2 y reduce la expresión de SUZ12.
- El efecto de HOTAIR en la metilación de genes implicados en la vía de moléculas de adhesión celular puede ser un mecanismo de regulación de la expresión de estos genes y puede ser un mecanismo por el cuál HOTAIR promueva el fenotipo canceroso.

Referencias

- Albergaria, A., Ribeiro, A.S., Vieira, A.F., Sousa, B., Nobre, A.R., Seruca, R., *et al.* (2011). P-cadherin role in normal breast development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 811-822.
- Banzai, C., Nishino, K., Quan, J., Yoshihara, K., Sekine, M., Yahata, T., Tanaka, K., *et al.* (2014). Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 19:127–132.
- Bhat, S., Kabekkodu, S., Noronha, A., Satyamoorthy (2016). Biological Implications and Therapeutic Significance of DNA Methylation Regulated Genes in Cervical Cancer. *Biochimie.*
- Bhat, S., Kabekkodu, S., Varghese, V., Chakrabarty, S., Mallya, S., Rotti, H., Pandey, D., *et al.* (2017). Aberrant gene-specific DNA methylation signature analysis in cervical cancer. *Tumor biology.* 1-16.
- Bure, I., Geer, S., Knopf, S., Roa, M., Henze, S., Ströbel, P., Agaimy, P., *et al.* (2018). Long noncoding RNA HOTAIR is upregulated in an aggressive subgroup of gastrointestinal stromal tumors (GIST) and mediates the establishment of gene-specific DNA methylation patterns. *Genes Chromosomes Cancer.* 1–14.
- Cai L., Abe M., Izumi S., Imura M., Yasugi T., Ushijima T. (2007). Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers. *Life Sci.* 80(16):1458-65.
- Chomczynski P. and Sacchi N., (1987). Single Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-Phenol Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 162: 156-159.
- Clarke, M., Luhn, P., Gage, J., Bodelon, C., Dunn S., Walker, J., Rosemary Zuna, R., *et al.* (2017). Discovery and validation of candidate host DNA methylation markers for detection of cervical precancer and cancer. *Int. J. Cancer.* 141, 701–710.
- Costello, J., Frühwald, M., Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, *et al.*, (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 24(2):132-8.
- de Méndez, M., Bosch, A. (2011). Abnormal immunoexpression of cell adhesion molecules (CAMs) in cervical cancer. *Int J Surg Pathol.* 19(6):733-42.
- de Méndez, M.T. and Bosch, A.L. (2011). Abnormal Immunoexpression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in Cervical Cancer. *Int J Surg Pathol.* 19 (6), 733-42.

-
-
- Dueñas, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*. 4:38.
 - Fang S, Gao H, Tong Y, et al. Long non-coding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells. *Lab Invest* 2016;96:60-8.
 - Fang, J., Zhang, H., & Jin, S. (2014). Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumor Biol.* (2014) 35:5083–5093.
 - Feng T., Zhou J., Liu J., Ye F., Lu W., Xie X. (2012). Altered expression levels of HLA class II and costimulatory molecules on circulating monocytes from patients with cervical intraepithelial neoplasia and squamous cervical cancer. *Mol Med Rep.* (6):1301-4.
 - Feng, T., Zhou, J., Liu J., Ye F., Lu W., Xie X. (2012). Altered expression levels of HLA class II and costimulatory molecules on circulating monocytes from patients with cervical intraepithelial neoplasia and squamous cervical cancer. *Mol Med Rep.* (6):1301-4.
 - Forrest M, Khalil A. (2017). Review: Regulation of the cancer epigenome by long non-coding RNAs. *Cancer Lett.* 407:106-112.
 - Gorski, J.J., James, C.R., Quinn, J.E., Stewart, G.E., Staunton, K.C., Buckley, N.E., Mcdyer, F.A., Kennedy, R.D., Wilson, R.H., Mullan, P.B. *et al.* (2010). BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 122: 721-731.
 - Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., et al. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 464(7291), 1071-1076.
 - Hanahan D., and Weinberg R.A., (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
 - Hibi, K., Goto, T., Mizukami, H., Kitamura, Y.H., Sakuraba, K., Sakata, M., *et al.* (2009). Demethylation of the CDH3 Gene Is Frequently Detected in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 29 (6), 2215-7.
 - Huang M, Chen Q, Xiao J, Liu C, Zhao X. (2013). Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer a meta-analysis. *Int J Cancer.*132: 363-373.
 - Huang, L., Liao, L. M., Liu A. W., Wu, J. B., Cheng, X. L., Lin, J. X., et al. (2014). Overexpression of long noncoding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 290: 717-723.

-
-
- Jacobs K, Feys L, Vanhoecke B, Van Marck V, Bracke M. (2011). P-cadherin expression reduces melanoma growth, invasion, and responsiveness to growth factors in nude mice. *Eur J Cancer Prev.* 20(3):207–16.
 - Jones, P. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews, Genetics.* Vol 3: 484-492.
 - Kim, H. J. Lee, D. W., Yim, G. W., Nam, E. J., Kim, S., Kim, S. W., et al. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *International journal of oncology*, 46(2), 521-530.
 - Kim, M., Jang, J., Park, C., Kim, T., Kim, Y., Chung, J., Shim, H., Nam, I., Han, J., Lee S., (2017). A Human Antibody That Binds to the Sixth Ig-Like Domain of VCAM-1 Blocks Lung Cancer Cell Migration In Vitro. *Int J Mol Sci.* 18(3). pii: E566.
 - Kim, J., Lee, J., Park, J., Lee, J., Kim, Y., and Kim, S., (2002). Induction of ICAM-1 and HLA-DR expression by IFN- γ in malignant melanoma cell lines. *Yonsei Med.* 36(1):15-25.
 - Kumara, H.M.C.S., Bellini, G.A., Caballero, O.L., Herath, S.A.C., Su, T., Ahmed, A., et al. (2017). P-Cadherin (CDH3) Is Overexpressed in Colorectal Tumors and Has Potential as a Serum Marker for Colorectal Cancer Monitoring. *Oncoscience.* 4 (9-10), 139-147.
 - Lee, J., Li, L., Gretz, N., Gebert, J., Dihlmann, S. (2012). Absent in Melanoma 2 (AIM2) is an important mediator of interferon-dependent and -independent HLA-DRA and HLA-DRB gene expression in colorectal cancers. *Oncogene.* 31(10):1242-53
 - Lee, K.W., Lee, Y., Kim, D.S., Kwon, H.J. (2006). Direct role of NF-kappaB activation in Toll-like receptor-triggered HLA-DRA expression. *Eur J Immunol.* 36(5):1254-66.
 - Lee, N.K., Lee, J.H., Kim, W.K., Yun, S., Youn, Y.H. (2016). Promoter Methylation of PCDH10 by HOTAIR Regulates the Progression of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Oncotarget.* 7 (46), 75307-75318
 - Lee, S.T., Li, Z., Wu, Z., Aau, M., Guan, P., Karuturi, R.K., Liou, Y.C., et al. (2011). Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell.* 43(5):798-810.
 - Li X., Lu H., Fan G., He M., Sun Y., Xu K., et al. (2017). A novel interplay between HOTAIR and DNA methylation in osteosarcoma cells indicates a new therapeutic strategy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 143(11):2189-2200.
 - Li, X., and Cai, Y. (2018). Methylation-Based Classification of Cervical Squamous Cell Carcinoma into Two New Subclasses Differing in Immune-Related Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3607.

-
-
- Li, X., Lu, H., Fan, G., He, M., Sun, Y., Xu, K., Shi, F. (2017). A novel interplay between HOTAIR and DNA methylation in osteosarcoma cells indicates a new therapeutic strategy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 143:2189–2200.
 - Li, X., Lu, H., Fan, G., He, M., Sun, Y., Xu, K., Shi, F. (2017). A novel interplay between HOTAIR and DNA methylation in osteosarcoma cells indicates a new therapeutic strategy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 143:2189–2200.
 - Liu, Y., Mayo, M.W., Nagji, A.S., Smith, P.W., Ramsey, C.S., Jones, D.R. (2012). Phosphorylation of RelA/p65 Promotes DNMT-1 Recruitment to Chromatin and Represses Transcription of the Tumor Metastasis Suppressor Gene BRMS1. *Oncogene.* 31 (9), 1143-54.
 - Liu, Y.L., Gao, X., Jiang, Y., Zhang, G., Sun, Z.C., Cui, B.B. (2015). Expression and Clinicopathological Significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in Colorectal Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141 (4), 661-9.
 - Lu, O., Ma, D., Zhao, S. (2012). DNA Methylation Changes in Cervical Cancers. Chapter 9.
 - Lu, Q., Dehua M., and Zhao, S. (2012). Chapter 9. DNA Methylation Changes in Cervical Cancers. *Cancer Epigenetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 863, DOI 10.1007/978-1-61779-612-8_9.
 - Mendeville J., Neto S., Vanni A., Smith G., Rieger K., Zeheb R., Loda M., Libertino J., et al. (2008). P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *BJU Int.* 102 (11):1707-14.
 - Moarii, M., Boeva, V., Vert, J., and Reyat, F. (2015). Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC Genomics.*16:873.
 - Obaid, M., Udden, S.M.N., Deb, P., Shihabeddin, N., Zaki, M.H., Mandal, S.S. (2018). LncRNA HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced cytokine expression and inflammatory response in macrophages. *Sci Rep.* 8(1):15670.
 - Paredes J. (2010). CDH3/P-cadherin overexpression in breast carcinomas: its regulatory mechanisms, the role in cell invasion, and the association with cancer stem cell properties. *BMC Proc.*
 - Peng L., Yuan X., Jiang B, Tang Z., Li G.C., (2016). LncRNAs: key players and novel insights into cervical cancer. *Tumour Biol* 37:2779–2788.
 - Rangel L., Agarwal R, Sherman C., Mello V., Pizer E., Ji H, Taub D, Morin P. (2004). Anomalous expression of the HLA-DR alpha and beta chains in ovarian and other cancers. *Cancer Biol Ther.* 3(10):1021-7.
 - Rinn J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., et al. (2007). Functional demarcation of active and silent

chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 129, 1311–1323.

- Ryu, J., Koh Y., Park H., Kim D., Kim D., Byun J., Lee H., Yoon S. (2016). Highly Expressed Integrin- α 8 Induces Epithelial to Mesenchymal Transition-Like Features in Multiple Myeloma with Early Relapse. *Mol Cells*. 39(12):898-908.
- Sharma, R., Sharma, R., Khaket T., Dutta, C., Chakraborty, B., Mukherjee T. (2017). Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cell Oncol (Dordr)*. 40(3):199-208.
- Shimoyama, Y. and Hirohashi, S. (1991). Cadherin Intercellular Adhesion Molecule in Hepatocellular Carcinomas: Loss of E-cadherin Expression in an Undifferentiated Carcinoma. *Cancer Lett*. 57 (2), 131-5
- Sin, T., Mohd, N., Mokhtar, Hassan, N., Sagap, I., Rose, I., Harun, R., And Jamal, R. (2015). Identification of diagnostic markers in colorectal cancer via integrative epigenomics and genomics data. *Oncology Reports*. 34: 22-32.
- Sin, T.K., Mokhtar, N.M., Hassan, N.Z.A., Sagap, I., Rose, I.M., Harun, R., *et al.* (2015). Identification of Diagnostic Markers in Colorectal Cancer via Integrative Epigenomics and Genomics Data. *Oncol Rep*. 34 (1), 22-32.
- Song, Y.K., and Naora, H. (2014). HOXA9 Promotes Homotypic and Heterotypic Cell Interactions That Facilitate Ovarian Cancer Dissemination via Its Induction of P-cadherin. *Mol Cancer*. 13, 170.
- Sotillo, E. and Thomas-Tikhonenko, A. (2011). The long reach of noncoding RNAs. *Nature Genetic*. 43: 616–617.
- Szalmás, A., Kónya, J. (2009). Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 19:144–152.
- Vanharanta, S., Shu, W., Brenet, F., Hakimi, A.A., Heguy, A., Viale, A., *et al.* (2013). Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. *Nat. Med*. 19, 50–56.
- Van-Marck, V., Stove, C., Jacobs, K., Van den Eynden, G., Bracke, M. (2011). P-cadherin in adhesion and invasion: opposite roles in colon and bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 128(5):1031–44.
- Vieira, A., and Paredes, J., (2015). P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Molecular Cancer*. 14:178.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., *et al.*, (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature Letters*. Vol 439.
- Wang, L., Zeng, X., Chen, S., Ding, L., Zhong, J., Zhao, J.C. (2013). BRCA1 Is a Negative Modulator of the PRC2 Complex. *EMBO J*. 32 (11), 1584-97.

-
-
- Woo, H., Kim, S., Song, K., Kim, S., Yoon, C., Choi, B., Rhee J. (2015). Hypermethylation of the tumor-suppressor cell adhesion molecule 1 in human papillomavirus-transformed cervical carcinoma cells. *Int J Oncol.* 46(6):2656-62.
 - Xia, R., Jin, F.Y., Lu, K., Wan, Li., Xie, M., Xu, T.P., De, W., *et al.* (2015). SUZ12 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation and Metastasis by Regulating KLF2 and E-cadherin. *Tumour Biol.* 36 (7), 5341-51.
 - Yan, K.S., Lin, C.Y., Liao, T.W., Peng, C.M., Lee, S.C., Liu, Y.J. (2017). EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? *Int J Mol Sci.* 18 (6).
 - Yang, H., (2013). Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chinese Journal of Cancer.* Vol. 32: 42-48.
 - Yang, X., Han, H., De Carvalho, D., Lay, F., Jones, A., and Liang, G. (2014). Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell* 26, 577–590.
 - Yin, Z., Sun, Y., Ge, S., Sun, J. (2017). Epigenetic activation of WHSC1 functions as an oncogene and is associated with poor prognosis in cervical cancer. *Oncol Rep.* 37(4):2286-2294.
 - Zigler, M., Dobroff A., Bar, M. (2010). Cell adhesion: implication in tumor progression. *Minerva Med.* 101(3):149-62.

Anexos

Anexo 1. Figuras suplementarias

Nivel de expresión de CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1 en CESC.

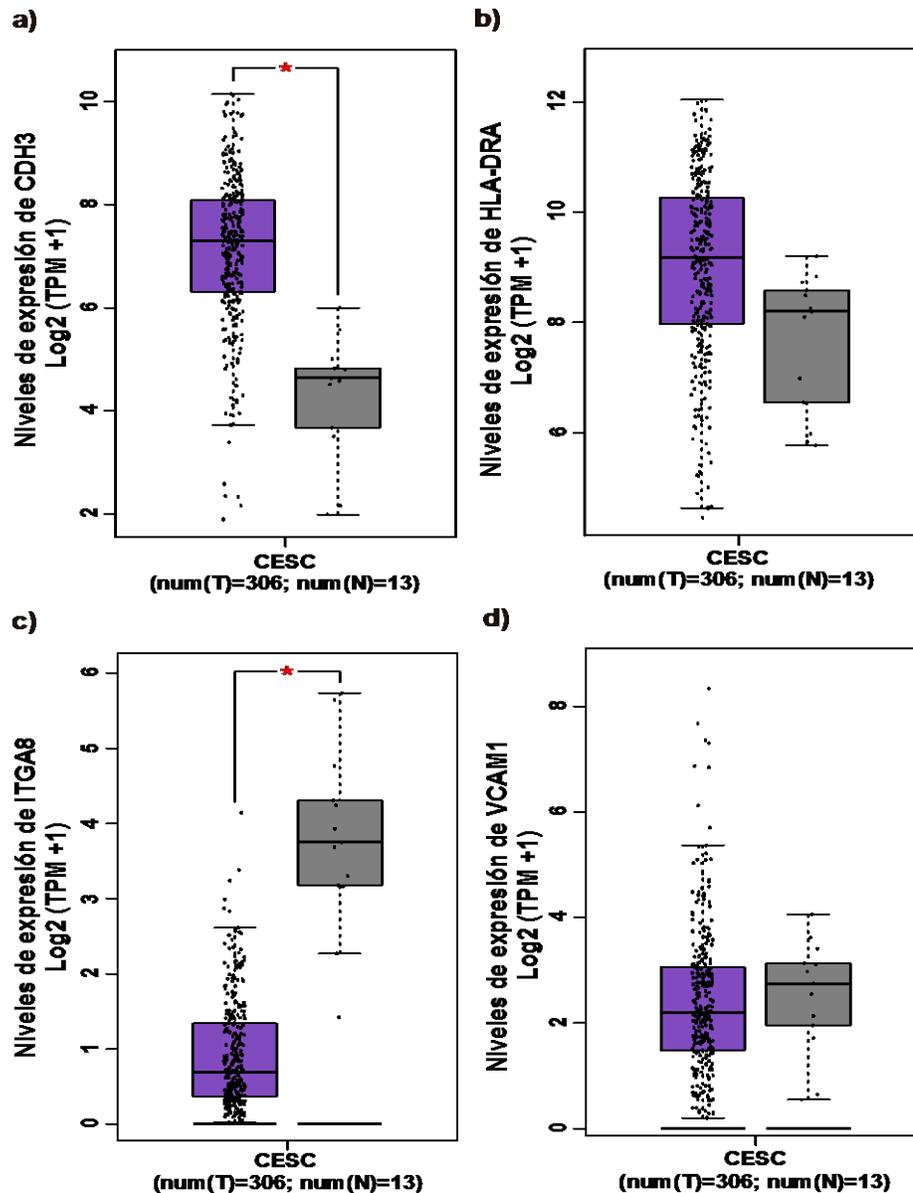


Figura suplementaria 1. Nivel de expresión de los genes CDH3, HLA-DRA, ITGA8, y VCAM1 en CESC. Se revisó el nivel de expresión de los genes CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1 en 306 muestras de pacientes con carcinoma cervical y endocervical de células escamosas (CESC, *por sus siglas en inglés*) (color morado) comparado respecto al nivel de expresión en 13 muestras de tejido normal (color gris). Los datos fueron tomados de la base de datos Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). TPM; Transcritos Por Millón.

1.2. Análisis de los factores de la transcripción potenciales que se unen al promotor de los genes CDH3, HLA-DRA e ITGA8.

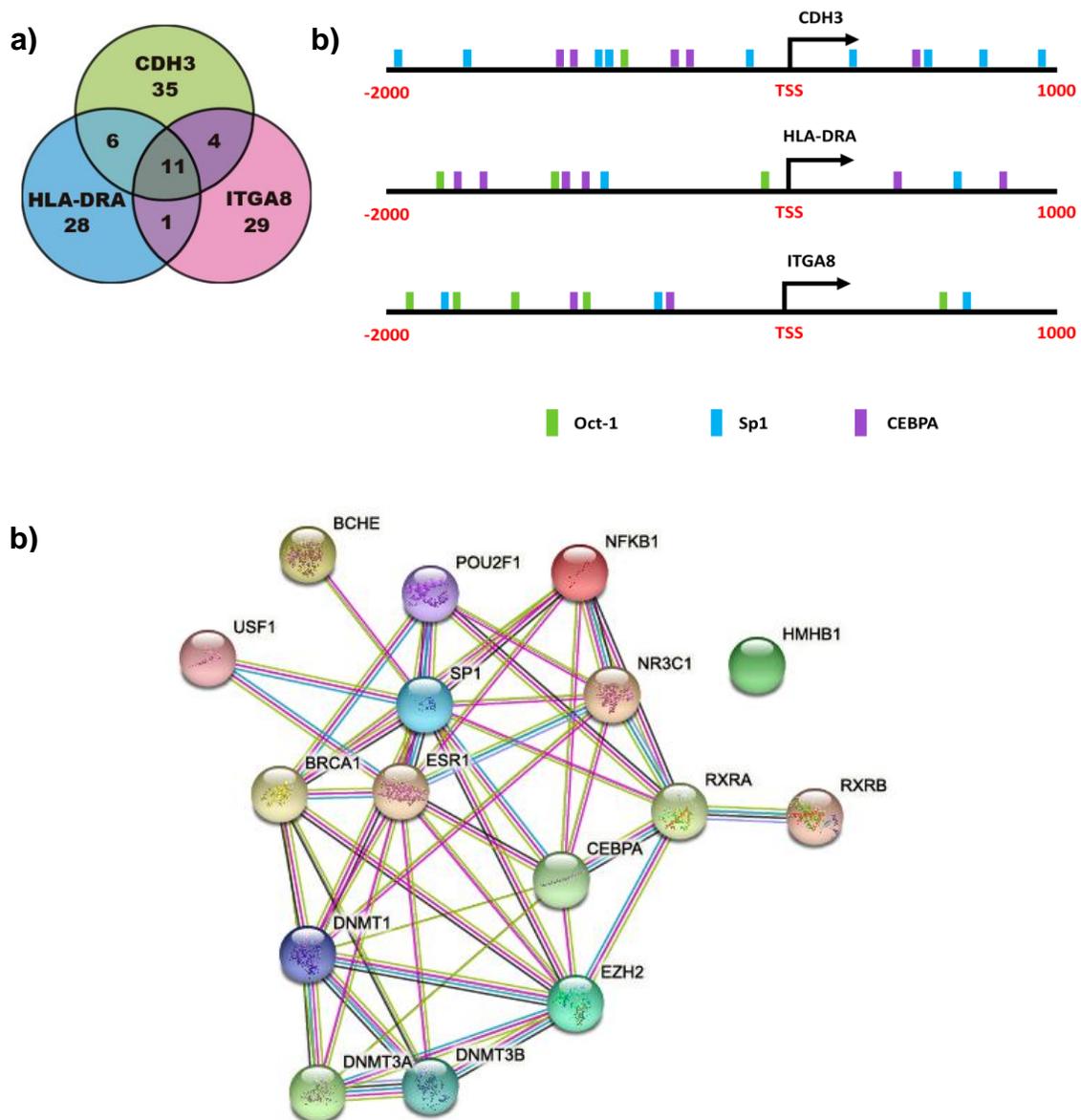


Figura suplementaria 2. Análisis de los factores de la transcripción potenciales que se unen al promotor de CDH3, HLA-DRA y ITGA8. a) Se identificaron los potenciales factores de la transcripción que pueden unirse al promotor de los genes con aumento de la metilación utilizando la base de datos Alibaba2. El Diagrama de Venn muestra el número de factores de transcripción identificados. b) Representación de 3 factores de transcripción en común entre los tres genes. c) Red de interacción de proteínas utilizando STRING de los factores de transcripción en común entre los tres genes. Se agregaron a la red de interacción las moléculas previamente descritas como posible mecanismo de regulación de la metilación, con la finalidad de observar si estos FTs interactúan con ellos. Las moléculas añadidas a la red son EZH2, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y BRCA1.

1.3. Análisis de motivos de unión para factores de la transcripción en común entre CDH3, HLA-DRA e ITGA8.

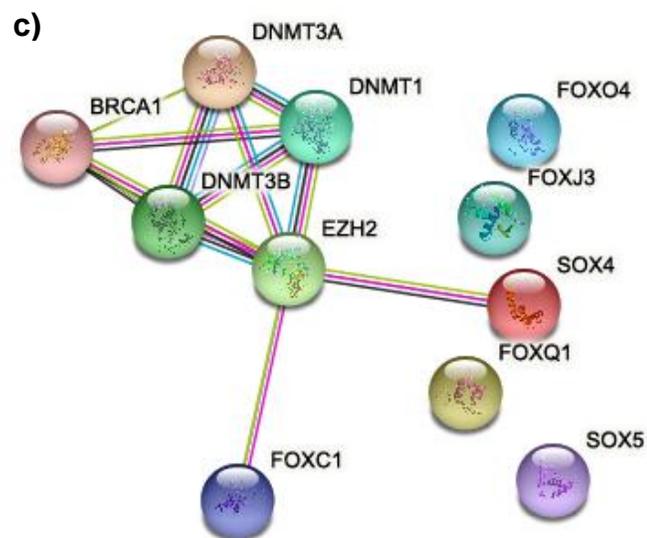
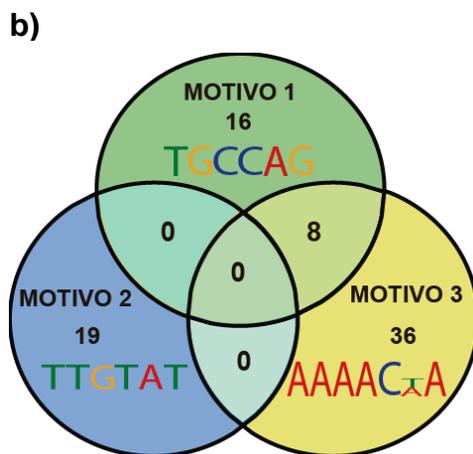
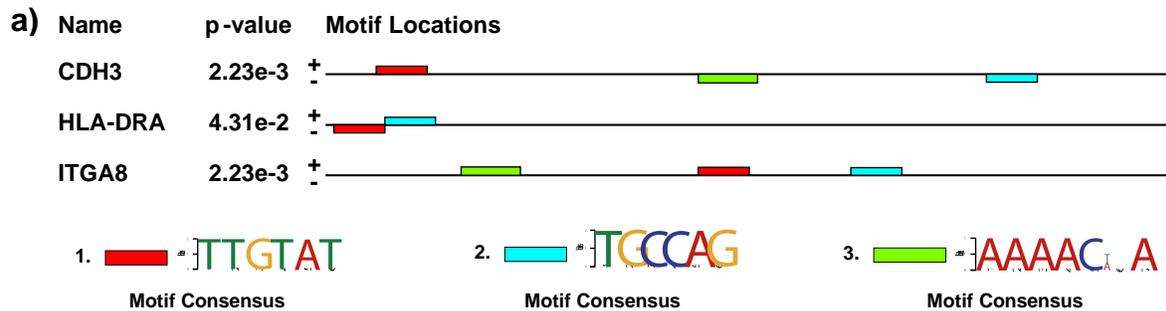


Figura suplementaria 3. Análisis de motivos de unión para factores de la transcripción en CDH3, HLA-DRA, ITGA8 y VCAM1. A) Identificación de motivos de unión para factores de la transcripción (FTs) utilizando la base de datos MEME suit (MEME-ChIP). B) Se identificaron los factores de la transcripción que se unen a los motivos previamente identificados utilizando la base de datos TOMTOM. El Diagrama de Venn muestra el número de factores de transcripción identificados. C) Red de interacción de proteínas utilizando STRING de los factores de transcripción en común entre los tres motivos identificados. Se agregaron a la red de interacción las moléculas previamente descritas como posible mecanismo de regulación de la metilación de CDH3 y HLA-DRA, con la finalidad de observar si estos FTs interactúan con ellos. Las moléculas añadidas a la red son EZH2, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y BRCA1.

Anexo 2.

Extracción de DNA a partir de TRIzol (300µl)

1.-Descongelar células en hielo. Una vez descongeladas incubar 5 min a temperatura ambiente.

2.-Agregar 60µl de cloroformo (40µl por cada 200µl de TRIzol). Agitar 15s a mano, incubar 4 min a temperatura ambiente y centrifugar a 4°C, 10 min a 12500 rpm. Separar la fase acuosa a un tubo nuevo (Fase que contiene el RNA).

6.-Añadir 90µl de etanol al 100% (grado biología molecular) por cada 300µl de TRIzol en el tubo con la interfase. Tapar el tubo, mezclar por inversión varias veces e incubar por 5 min a temperatura ambiente.

9.-Centrifugar 10 min a 2000g a 4°C para el pellet de DNA.

10.-Transferir el sobrenadante (No tocar o llevarse el pellet) etanol-fenol a un tubo nuevo (Este sobrenadante puede ser usado para el aislamiento de proteínas).

11.-Resuspender el pellet en 300µl de citrato de sodio a 0.1 M en 10% de etanol por cada 300µl de TRIzol.

12.-Incubar a temperatura ambiente por 30 min y mezclar ocasionalmente por inversión (cada 10 min). Incubar 30 min en agitación constante (en el vórtex).

13.-Centrifugar por 10 min a 10,000 rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.

15.-Resuspender en 750µl de etanol al 75% por cada 300µl de TRIzol e incubar 10 min a temp. ambiente en agitación (Vórtex). Centrifugar por 10 min a 10,000 rpm a 4°C.

18.-Si la pastilla está muy sucia repetir el paso 15-17 de dos a tres veces.

19.-Decantar sobrenadante y retirar la mayor cantidad de restante con pipetal. Secar la pastilla con los tubos abiertos, tapar con papel. Resuspender la pastilla de DNA en 30µl de agua estéril.