



BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Determinación de modificaciones epigenéticas del
gen de Galectina-9 en tumores de cáncer cervicouterino
y la relación con su nivel de expresión”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

Q.B.C. Erick Ricardo Armenta Castro

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Verónica Vallejo Ruiz. CIBIOR-IMSS

Dra. Irma Herrera Camacho. ICUAP-BUAP



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Sandra Reyes Carmona, Dra. Patricia Piña Sánchez y la Dra. Patricia Martínez Morales, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada "Determinación de modificaciones epigenéticas del gen de Galectina-9 en tumores de cáncer cervicouterino y la relación con su nivel de expresión", que presenta el alumno Erick Ricardo Armenta Castro para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los once días del mes de agosto del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Sandra Reyes Carmona

Dra. Patricia Piña Sánchez

Dra. Patricia Martínez Morales

RESUMEN

Antecedentes. El cáncer cervicouterino (CaCu) es un tipo de cáncer con alta incidencia a nivel mundial. Muchos casos son detectados en etapas avanzadas y actualmente no existen biomarcadores para la enfermedad. Galectina-9 (Gal-9), codificada por el gen *LGALS9*, es una proteína con diversas funciones esenciales intra y extracelulares, y su baja expresión en tumores sólidos se relaciona a un mal pronóstico. A la fecha, no se ha descrito qué factores pueden alterar su expresión. Las alteraciones epigenéticas, como cambios en la metilación del DNA y en la acetilación de histonas, en promotores de genes clave han sido descritos en los últimos años. Los cambios de expresión de Gal-9 y la determinación de alteraciones epigenéticas podrían ser útiles para esta caracterización de biomarcadores, así como para entender los mecanismos que pueden estar modulando su expresión durante la transformación maligna.

Metodología. La expresión de Gal-9 se determinó en líneas celulares derivadas de CaCu (SiHa y HeLa) y en biopsias de pacientes con CaCu, por inmunodetección. El nivel de metilación del DNA en el promotor de *LGALS9* se determinó mediante tratamiento con bisulfito del DNAg previamente aislado y posterior secuenciación Sanger. La evaluación de las marcas activadoras en histonas H3K9ac y H3K14ac en la región promotora de *LGALS9*, se realizó solo en las líneas celulares mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Además, se determinó en las líneas celulares el estado de acetilación global de H3K9ac y H3K14ac.

Resultados. La expresión de Gal-9 en líneas celulares tumorales fue menor que en la línea celular control HaCaT. Respecto a los patrones de metilación del promotor de *LGALS9*, no hubo diferencias que se relacionaran con la expresión de Gal-9. En las líneas celulares tumorales se observó una disminución estadísticamente significativa de las marcas H3K9ac y H3K14ac en el promotor. La marca global H3K9ac fue menor en las dos líneas tumorales respecto al control; y H3K14ac, solo en SiHa. El análisis de expresión de Gal-9 en pacientes con CaCu permitió identificar dos grupos: Gal-9(+) y Gal-9(-). El análisis de metilación del promotor de *LGALS9* no mostró diferencias entre estos dos grupos.

Conclusiones. Los bajos niveles de expresión de Gal-9 en SiHa y HeLa se relacionan a la disminución de H3K9ac y H3K14ac en el promotor. Sin embargo, no se relaciona al estado de metilación. Los cambios globales de H3K9ac y H3K14ac podrían ser indicativos de alteraciones en la expresión y/o la actividad de las enzimas HAT y HDAC. Los niveles de expresión de Gal-9 en las muestras de pacientes no se relacionan con el estado de metilación en el promotor; es necesario evaluar el estado de acetilación de histonas.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS) en colaboración con el Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:

- Instituto Mexicano del Seguro Social, y recibió recursos financieros para su realización del Fondo de Investigación en Salud del IMSS FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/113.
- CONACYT, y su financiamiento a los proyectos Infraestructura-2019-300379 y Salud-2017-290068.

Como alumno del Posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP, para la realización de este trabajo agradezco el apoyo en becas de:

- Beca CONACYT (No. 890564) de enero 2018 a diciembre 2019.
- Beca complementaria de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS (97221304), de marzo 2018 a febrero 2020.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás y mis hermanos, con quienes pude contar para llegar hasta aquí en mi decisión por dedicarme a la investigación, y a mis sobrinos que alegran nuestros días.

A la Dra. Vero por haberme recibido en el laboratorio de Biología Molecular del CIBIOR, y por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto. Por estar al pendiente siempre de los resultados que se obtuvieron, aconsejarme y mostrarme lo que es ser un investigador.

A la Dra. Irma, que siempre estuvo al pendiente de mis avances en este trabajo, y que me apoyó incluso desde antes de entrar al posgrado, hasta este momento en que finalizó este proyecto.

A los miembros del comité evaluador: la Dra. Lourdes Millán, Dra. Sandra Reyes, Dra. Patricia Martínez y a la Dra. Patricia Piña por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis.

A los integrantes de BM del CIBIOR, que son parte del equipo y con quienes logré una amistad. En especial a la Química María Antonia Paredes por su asesoría en cuestiones técnicas. A Ileana, Ivonne y Tania por su colaboración en la parte de la caracterización de Gal-9 como biomarcador en pacientes con CaCu. A Lily Caporal y Jesús Aparicio por su aporte en la caracterización del promotor de Gal-9.

En general, a los investigadores del CIBIOR de quienes de alguna manera recibí algún consejo durante mi estancia en el centro de investigación. A la Dra. Guadalupe Delgado por su asesoría en las técnicas de IHC.

A la Dra. Adriana Aguilar y al Dr. Luis Felipe Jave del CIBO por su colaboración en las líneas celulares, así como a Carlos Barrón por haberme asesorado en análisis de expresión. A la Dra. Claudia Gutiérrez por su asesoría en cuestiones de patología y por proporcionarnos las muestras de pacientes que fueron incluidas en este estudio.

A mis compañeros de generación Kenia, Laura, Nadia, Olivia, René y Sandra, por hacer de la maestría una experiencia más llevadera, y por la amistad que logramos formar.

A Alonso V. por su ayuda en el diseño de algunas de las figuras que se mostraron en este trabajo.

A mis amigos del CIBIOR de los laboratorios de oncoinmunología y biología celular del CIBIOR. A mis amigos de Los Mochis y Hermosillo que estuvieron al pendiente de mí durante toda mi estancia en Puebla.

INDICE

RESUMEN.....	3
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABLAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. ANTECEDENTES.....	16
1.1. Cáncer cervicouterino	16
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo	16
1.1.1.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)	16
1.1.1.2. Oncoproteínas E6 y E7	17
1.1.2. Clasificación del CaCu.....	18
1.1.3. Diagnóstico.....	20
1.2. Galectinas y sus alteraciones en el cáncer.....	21
1.2.1. Familia de galectinas	22
1.2.2. Funciones de galectinas y alteraciones en su expresión en el cáncer	23
1.3. Gal-9.....	26
1.3.1. Funciones de Gal-9	26
1.3.2. Alteraciones en la expresión de Gal-9 en el cáncer	28
1.3.3. Regulación de la expresión de Gal-9.....	28
1.4. Mecanismos epigenéticos y sus alteraciones en el cáncer.....	29
1.4.1. Metilación del DNA	29
1.4.1.1. Definición y mecanismo de acción	29
1.4.1.2. Dinucleótidos e islas CpG	33
1.4.1.3. Alteraciones en la metilación del DNA en el cáncer	34
1.4.1.4. Metilación aberrante del DNA en el CaCu.....	35

1.4.2. Modificaciones de histonas	36
1.4.2.1. Acetilación de histonas	37
1.4.2.1.1. Acetilación en H3K9ac y H3K14ac.....	39
1.4.2.2. Alteraciones en la acetilación de histonas en el cáncer.....	40
1.4.2.2.1. Acetilación de histonas en el CaCu.....	41
1.4.3. Complejos remodeladores de la cromatina.....	42
1.4.3.1. SWI/SNF	42
1.4.3.2. NuRD	43
1.4.3.3. Alteraciones en SWI/SNF y NuRD en el cáncer	43
1.4.3.3.1. Alteraciones en SWI/SNF y NuRD en el CaCu	44
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	45
3. JUSTIFICACIÓN.....	47
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
5. HIPÓTESIS	49
6. OBJETIVOS	50
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
7.1. Diseño experimental.....	51
7.2. Análisis <i>in silico</i>	51
7.2.1. Análisis del promotor de <i>LGALS9</i> y determinación de sitios CpG	51
7.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos	52
7.3. Modelos de estudio	53
7.3.1. Cultivo celular	53
7.3.2. Biopsias de pacientes con CaCu	53
7.4. Nivel de expresión y localización celular de Gal-9.....	54
7.4.1. Inmunocitoquímica por inmunofluorescencia (ICC/IF).....	54
7.4.2. Inmunohistoquímica (IHC)	55
7.5. Estado de metilación del DNA en el promotor de <i>LGALS9</i>	56
7.5.1. Aislamiento de DNA total en líneas celulares.....	56

7.5.2.	Aislamiento de DNA total en biopsias de CaCu	57
7.5.3.	Verificación de la integridad del DNA aislado.....	58
7.5.4.	Tratamiento con bisulfito.....	58
7.5.5.	Amplificación, purificación y secuenciación de productos	59
7.6.	H3K9ac y H3K14ac en líneas celulares.....	60
7.6.1.	Procedimiento del CHIP	60
7.6.1.1.	Curva de sonicación.....	60
7.6.1.2.	CHIP.....	61
7.6.1.3.	Cuantificación por qPCR	63
7.6.2.	H3K9ac y H3K14ac globales en líneas celulares por inmunofluorescencia	63
7.7.	Análisis estadístico.....	64
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
	SECCIÓN I: Resultados de análisis <i>in silico</i>	65
8.1.	Sitios CpG en el promotor de <i>LGALS9</i>	65
	SECCIÓN II: Resultados en líneas celulares de CaCu	68
8.2.	Nivel y patrón de expresión de Gal-9 en líneas celulares de CaCu	68
8.3.	Estado de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i> en líneas celulares de CaCu.....	71
8.4.	Ensayo de CHIP	73
8.4.1.	Curva de sonicación para CHIP	73
8.4.2.	H3K9ac en el promotor del gen <i>LGALS9</i> y global en líneas celulares.....	74
8.4.3.	Acetilación H3K14ac en el promotor del gen <i>LGALS9</i> y global en líneas celulares	77
8.4.4.	Relación entre H3K9ac y H3K14ac en líneas celulares	80
	SECCIÓN III. Resultados en biopsias de CaCu	82
8.5.	Datos clínico-patológicos de las pacientes con CaCu	82
8.6.	Nivel y patrón de expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu y lesiones premalignas ..	83
8.7.	Estado de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i> en biopsias de CaCu	88

9. CONCLUSIONES.....	92
10. PERSPECTIVAS.....	93
11. REFERENCIAS.....	94
ANEXO 1.....	109
ANEXO 2.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del cérvix.	20
Figura 2. Esquema de la familia de galectinas.	23
Figura 3. Efectos anti y protumorales de las galectinas	25
Figura 4. Representación de las funciones de Gal-9 en tumores sólidos	27
Figura 5. Mecanismo de metilación del DNA.	32
Figura 6. Mecanismo de acetilación de histonas.	38
Figura 7. Mapa de ubicación de oligonucleótidos diseñados.	53
Figura 8. Esquema de sitios CpG susceptibles a metilación del DNA en el promotor de <i>LGALS9</i> .	66
Figura 9. Expresión de Gal-9 en líneas celulares HaCaT, SiHa y HeLa.	69
Figura 10. Estado de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i> en líneas celulares de CaCu.	72
Figura 11. Curva de sonicación.	74
Figura 12. Estado de acetilación H3K9ac.	76
Figura 13. Estado de acetilación H3K14ac.	79
Figura 14. Relación H3K14ac/H3K9ac en el promotor de <i>LGALS9</i> .	81
Figura 15. Imágenes representativas que muestran la expresión de Gal-9 en biopsias de diagnóstico de LEIBG	85
Figura 16. Imágenes representativas de los resultados de la expresión de Gal-9 en biopsias de pacientes con CaCu.	87
Figura 17. Análisis estadístico de la expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu.	88
Figura 18. Sitios de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i> en biopsias de CaCu Gal-9(+) y Gal-9(-)	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Familia de HATs.	40
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor de <i>LGALS9</i> .	52
Tabla 3. Características clínico-patológicas de las muestras de las pacientes con CaCu.82	

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OGGDD: Dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato

5caC: 5-carboxilcitosina

5fC: 5-formilcitosina

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

APES: 3-aminopropyltriethoxysilano

BAF: Factores asociados a BRM

CaCu: Cáncer cervicouterino

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina

CIMP: Fenotipo de metilación en islas CpG

CRC: Cáncer colorrectal

CT: Ciclo Umbral

DBCAT: DataBase of CpG Islands and Analytical Tool

DMEM: Dubecco's Modified Eagle's Medium

DNMT: DNA metiltransferasa

DRC: Dominio de reconocimiento a carbohidratos

E6AP: Proteína asociada a E6

EMT: Transición epitelio-mesénquima

EPD: Eucaryotic Promoter Database

FFPE: Fijado en formalina y embebido en parafina

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

FT: Factor de la transcripción

HAT: Histona acetiltransferasa

HCP: Promotor con CpG alto

HDAC: Histona desacetilasa

HP1: Proteína 1 de heterocromatina

ICC/IF: Inmunocitoquímica por inmunofluorescencia

ICP: Promotor con CpG intermedio

IDT: Integrated DNA technologies

IHC: Inmunohistoquímica

IP: Inmunoprecipitación

ISWI: Imitación a SWI

LANGEBIO: Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad

LCP: Promotor con CpG Bajo

LCR: Región Larga de Control

LEIAG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado

LEIBG: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado

MBD: Dominio de Unión a Metilo

MEC: Matriz extracelular

MeCP2: Proteína 2 de Unión a CpG

MLL: Leucemia de Linaje Mixto

MS-PCR: PCR metal específica

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

NTC: Control Sin Plantilla

NuRD: Complejo Desacetilasa y Remodelador del Nucleosoma

O-GlcNAc: N-acetilglucosamina Ligada a oxígeno

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBAF: Factores Asociados a Polibromo

PBRM1: Polibromo 1

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular

PIC: Protease Inhibitor Cocktail

pRB: Proteína retinoblastoma

qPCR: PCR cuantitativa

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RSC: Complejo Remodelador de la Estructura de la Cromatina

SAM: S-adenosil metionina

SFB: Suero fetal bovino

SWI/SNF: Switching/Sucrose Non-fermentable

TDG: Timina-DNA-glucosilasa

TET: Hidroxilasa de Translocación 10-11

TRE: Elemento de Respuesta a TPA

VPH: Virus del Papiloma Humano

1. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer cervicouterino

1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial. Se han detectado más de medio millón de casos en el 2018 a nivel mundial, y más de 300,000 fallecimientos por esta enfermedad (OMS, 2018). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mayor prevalencia de CaCu existe en países en vías de desarrollo, donde se estima que el 90 % de las muertes ocurren en estos países, incluyendo México (Curado, M.-P. *et al.*, 2007; OMS, 2018). En este último, se ha determinado un incremento de casos de CaCu en mujeres entre 26 y 29 años, pero la mayor prevalencia ocurre entre 30 y 59 años; tres de cada 10 fallecimientos femeninos por cáncer se deben a CaCu según las estadísticas de la INEGI en 2016 (INEGI, 2016).

Se ha descrito que el 99 % de los casos de CaCu se deben a una infección persistente en el cérvix con algún genotipo del Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, por lo que se conoce como el principal agente etiológico. Sin embargo, se han descrito otros factores asociados al desarrollo de CaCu, algunos de los cuales favorecen a la infección por VPH, tales como: estado inmunitario deficiente, múltiples parejas sexuales, tabaquismo, mala alimentación, multiparidad, uso prolongado de anticonceptivos orales, inicio de la vida sexual a temprana edad y sin protección; la mayoría de los casos se presentan entre los 20 y 64 años. En la minoría de los casos se han descrito predisposiciones genéticas (Chelimo, C. *et al.*, 2013; OMS, 2018; Walboomers, J.M. *et al.*, 1999).

1.1.1.1. Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Existen aproximadamente 200 genotipos de VPH y estos a su vez se clasifican en cinco géneros, de los cuales alrededor de 60 genotipos pertenecen al género *Alphapapillomavirus*; los VPH de este género pueden infectar la zona anogenital (Concha, M., 2007; Fields, B. *et al.*, 2013). Estos virus se clasifican en función de su potencial oncogénico en VPH de alto riesgo y bajo riesgo. Los de bajo riesgo se asocian con verrugas genitales y lesiones de bajo grado, de los cuales se destacan los genotipos 6, 11, 42, 44. Por otro lado, los VPH de alto riesgo se asocian con lesiones de alto grado y cáncer, destacando a los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (Fields, B. *et al.*, 2013). Los VPH-16 y -18 son los más prevalentes al

causar más del 70 % de los casos de este carcinoma (OMS, 2019). Se ha visto que el genotipo 16 es causante de la mayoría de los carcinomas escamosos de cérvix, y el 18, de los adenocarcinomas (clasificación explicada más adelante) (Doorbar, J. *et al.*, 2015).

Los VPH son virus no envueltos, con una cápside icosaédrica y ADN de doble cadena como material genético, de aproximadamente 7.5 a 8.0 kb (kilobases). Su genoma se divide en tres regiones. La región temprana (E) contiene genes que codifican proteínas reguladoras, transformadoras y replicadoras, como: E1, la cual posee actividad de helicasa y participa en la replicación viral; E2, como un factor de la transcripción viral; E4, participando en el ensamblaje y la liberación de los viriones; y E5, E6 y E7, conocidas como oncoproteínas virales. La región tardía (L) que contiene genes que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2). Y una región denominada Región Larga de Control (LCR, por sus siglas en inglés) que no contiene ningún marco de lectura, pero está conformada por el origen de la replicación del ADN así como elementos importantes de control de la transcripción (Doorbar, J. *et al.*, 2015; Fields, B. *et al.*, 2013).

1.1.1.2. Oncoproteínas E6 y E7

De las proteínas de los VPH de alto riesgo, a las que se les atribuye una mayor importancia oncogénica son las E6 y E7, ya que participan en la transformación neoplásica de células epiteliales infectadas. Estas proteínas interfieren con las funciones de las proteínas p53 y la proteína del retinoblastoma (pRB) del ciclo celular, favoreciendo así la proliferación neoplásica. Además, desencadenan algunos eventos como el abatimiento de la diferenciación celular, bloqueo de la apoptosis, inestabilidad cromosómica y causan desregulación transcripcional de genes (Chowand, L.T. & Broker, T.R., 2007). Principalmente VPH-16 y 18 tienen potencial oncogénico al integrar su DNA al genoma de la célula hospedera, expresando posteriormente E6 y E7, las cuales se describen como proteínas virales en la transformación primaria (Chowand, L.T. & Broker, T.R., 2007; Melo, A. *et al.*, 2003; Moody, C.A. & Laimins, L.A., 2010).

E6 es una proteína pequeña, constituida por 151 aminoácidos. Uno de los mecanismos que tiene E6 en la propagación de cáncer es su capacidad de unirse a p53 mediante un complejo con la Proteína asociada a E6 (E6AP) con actividad ubiquitín ligasa, provocando su degradación por el proteosoma. Entre otros efectos, facilita la replicación de su ADN que sería bloqueado por p53, promueve la inmortalización celular al incrementar los niveles de actividad de telomerasa (Moody, C.A. & Laimins, L.A., 2010; Nominé, Y. *et*

al., 2006; Scheffner, M. *et al.*, 1990). Por otro lado, la oncoproteína E7 ha sido relacionada con la progresión tumoral al tener como blanco a la proteína pRB que controla la actividad de los factores de transcripción de la familia E2F. E7 facilita la fosforilación y ubiquitinación de pRB al formar el complejo terciario E7/pRB/E2F, provocando su degradación (Moody, C.A. & Laimins, L.A., 2010). Además, estas oncoproteínas virales han sido implicadas en la alteración del epigenoma de la célula infectada al desregular la actividad y la transcripción de enzimas involucradas en procesos como la metilación del DNA (DNA metiltransferasas, o DNMTs) y algunas modificaciones de histonas (como las HATs, o Histonas acetiltransferasas), como será mencionado más adelante. Dichas alteraciones contribuyen a la progresión de la infección viral y a la progresión del CaCu (Dueñas-González, A. *et al.*, 2005; Durzynska, J. *et al.*, 2017).

1.1.2. Clasificación del CaCu

El cuello del útero presenta diferentes epitelios (Fig. 1). El ectocérvix presenta un epitelio escamoso estratificado: se conforma de la lámina basal constituida por las células basales, las cuales van diferenciándose en células parabasales, células del estrato intermedio y células del estrato superficial; conforme se van diferenciando estas células, las células del estrato superficial se descaman. El endocérvix presenta un epitelio columnar, cuyas células conforman las glándulas secretoras de la mucosa cervical. La unión de ambos epitelios se denomina “zona de transformación” (Fig. 1A). De acuerdo a su origen histológico el CaCu puede ser clasificado en carcinoma escamoso de cérvix, adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso, (Fig. 1B) (OMS, 2018). Así el “carcinoma escamoso de cérvix” se origina en el ectocérvix; en algunos tumores de este tipo de carcinoma es posible detectar ciertas estructuras de queratina, por lo que a su vez este puede ser clasificado en: carcinoma escamoso de cérvix queratinizante o no queratinizante. El adenocarcinoma de cérvix es originado en el endocérvix, con frecuencia en la zona de transformación, se estima ser uno de los más agresivos (Schiffman, M. *et al.*, 2007). Cuando existe presencia de ambos tipos celulares, se habla de un carcinoma adenoescamoso. En cuanto a la incidencia de estos tres tipos de tumores, aproximadamente el 80 % de los casos corresponden a tumores de carcinoma escamoso de cérvix (Vizcaino, A.P. *et al.*, 2000); más del 10 % corresponden a adenocarcinomas; y menos del 5 %, a los carcinomas adenoescamosos (OMS, 2018). Se estima que los últimos dos casos, en especial el adenocarcinoma, han aumentado sus cifras en los últimos años. Aunque existen diferencias entre estos tres tipos de tumores por su origen, las pacientes actualmente reciben el mismo tratamiento (UK, C.R., 2018). Sin

embargo, recientemente se determinó que hay grandes diferencias moleculares en estos tipos de tumores (Network, C.G.A.R., 2017).

Tomando en cuenta que el carcinoma escamoso de cérvix es el tipo más común del CaCu, y por lo tanto el más estudiado, existen dos clasificaciones que se utilizan para el reporte de los estudios citológicos e histológicos. La primera clasificación y la más antigua utiliza la nomenclatura de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) en: NIC-1 (NIC de bajo grado), NIC-2 y NIC-3, siendo la primera la de menor grado de displasia, y la tercera donde se observa mayor displasia. Por la dificultad que muchas veces se presenta para diferenciar NIC-2 de NIC-3, se han unificado como lesiones de alto grado (Martin, C.M. & O'Leary, J.J., 2011). La segunda clasificación y la que se utiliza actualmente es la siguiente: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y de alto grado (LEIAG) esta última incluye a los carcinomas *in situ*. LEIBG y LEIAG son también conocidas como lesiones precancerosas o premalignas (Fig. 1B) (Solomon, D. *et al.*, 2002).

Actualmente existe una clasificación propuesta por FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), en el Comité de Ginecología Oncológica, que describe la evolución de cualquiera de los tres tipos de tumores de CaCu (Oncology, F.C.o.G., 2014). Esta clasificación evalúa la progresión de la enfermedad en 4 estadios:

- Estadio I: El carcinoma se encuentra estrictamente en el cérvix y solamente es posible detectar invasiones hacia el estroma de manera microscópica (inicialmente menos de 7 mm). A su vez, el estadio I puede subdividirse en IA, IA1, IA2, IB, IB1 y IB2 según se vaya dando el crecimiento del tumor (varía desde los 7mm hasta 4 cm de invasión de células tumorales).
- Estadio II: El carcinoma se ha extendido hacia regiones cercanas como el útero, pero no aún hacia la pared pélvica o menos de la tercera parte de la vagina. Puede subdividirse en IIA (a la vez en IIA1 y IIA2 si la lesión es menor o mayor a los 4 cm), y en IIB cuando hay compromiso parametrial, pero aún no en la pared pélvica.
- Estadio III: El tumor se ha extendido hacia la pared pélvica, y puede involucrar invasión a vagina (estadio IIIA) o algunos padecimientos relacionados a falla renal (estadio IIIB).
- Estadio IV: Extensión del carcinoma más allá de la pared pélvica, y la vejiga y/o recto se encuentran invadidos (estadio IVA), o incluso otros órganos más distantes (IVB).

Las pacientes con este tipo de carcinoma reciben un tratamiento específico dependiendo del estadio en el que se encuentren, y el pronóstico que presentan. Estos tratamientos pueden variar desde: histerectomía o conización, radio y quimioterapias (Bhatla, N. *et al.*, 2018; Bhatla, N. *et al.*, 2019). Hasta el momento no es común la utilización de tratamientos dirigidos a un blanco en específico.

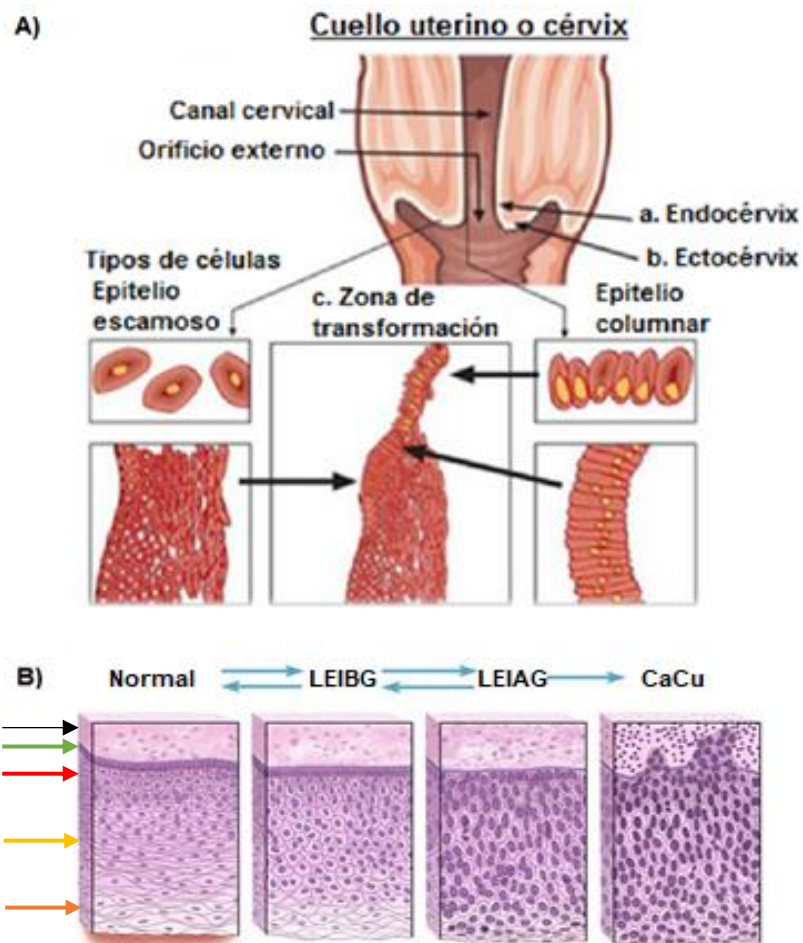


Figura 1. Esquema del cérvix. A) Se muestra el cuello uterino y la identificación de endocérvix, ectocérvix y zona de transformación. B) Se muestra un epitelio escamoso de cérvix normal donde posteriormente se observan lesiones precancerosas, hasta evolucionar al CaCu. En la parte inferior se muestran las células estromales (flecha en negro), la lámina basal donde se ubican las células basales (flecha en verde), las células parabasales (flecha en rojo), el estrato intermedio (flecha en amarillo) y el estrato superficial (flecha en naranja). Las células basales se van diferenciando, dando lugar a las diferentes capas del epitelio; mientras que las del estrato superficial se van descamando. Modificado de Anónimo (2019).

1.1.3. Diagnóstico

Uno de los primeros métodos que se desarrollaron para el diagnóstico oportuno del CaCu fue la tinción de Papanicolaou o Pap test (Koss, L.G., 1989). Este método consiste en un raspado de la región endocervical y ectocervical con un hisopo, cepillo citológico o con una espátula de Ayre. Posterior a realizar un extendido en la laminilla correspondiente, se realiza una tinción de Papanicolaou. En caso de presentar alguna lesión precancerosa o CaCu, se pueden observar alteraciones en la morfología de las células que conforman el epitelio del cérvix. Al detectar células anormales en el Pap test es recomendable la realización de una inspección visual o colposcopia, la cual consiste en que el médico hace una inspección en el cérvix utilizando un colposcopio, tras la aplicación de ácido acético al 5 % en la zona cervical (Egede, J. *et al.*, 2018; OMS, 2018). Estas pruebas mencionadas son principalmente para determinar anomalías en las células epiteliales del cérvix. Por otro lado, la genotipificación del VPH a partir de raspados cervicales por pruebas moleculares ha sido de importancia para la detección de genotipos de alto riesgo (Meijer, C.J. *et al.*, 2006), que pueden también estar relacionados con los cambios morfológicos en estos tipos celulares. Sin embargo, para un diagnóstico definitivo es importante la realización de una biopsia en la zona aparentemente afectada para realizar un examen histopatológico según lo indica la NOM-014-SSA2-1994, vigente hasta la fecha (Salud, S.d., 1994).

A pesar de que aparentemente existen varios métodos para la detección temprana de lesiones precancerosas del CaCu, muchos de los casos son detectados en etapas avanzadas, una gran parte de estos casos son por desconocimiento de estas pruebas por parte de la población en general. Sin embargo, se han reportado muchos casos de falsos negativos en la prueba de Pap que es la que se utiliza en los programas de tamizaje (Castillo, M. *et al.*, 2016; Philp, L. *et al.*, 2018), lo que conlleva al desarrollo del CaCu al no detectarse estas lesiones precancerosas (Suzuki, K. *et al.*, 2017). Para las pacientes que presentan CaCu, actualmente no se cuentan con marcadores tumorales o biomarcadores, que nos permitan evaluar el pronóstico o el seguimiento de la enfermedad (progresión).

1.2. Galectinas y sus alteraciones en el cáncer

Las galectinas son proteínas que pertenecen a la familia de las lectinas, también se conocen como lectinas tipo-S. Estas proteínas pueden reconocer estructuras glicánicas a través de Dominios de Reconocimiento a Carbohidratos (DRC), y son afines a estructuras que contienen β -galactósidos en los N- y O-glicanos de diferentes glicoproteínas (Johannes, L.

et al., 2018; Yang, R.-Y. *et al.*, 2008). Estas proteínas pueden encontrarse de manera intra y extracelular, cumpliendo una gran cantidad de funciones como será explicado más adelante. Las galectinas han sido de interés en el estudio del cáncer debido a que se han descubierto algunas funciones relacionadas a la progresión del cáncer, y a la modulación de la respuesta inmunitaria, incluyendo la vigilancia del sistema inmunológico (Advedissian, T. *et al.*, 2015). Los cambios de expresión asociados a la transformación maligna han resaltado su importancia como biomarcadores tumorales (Balan, V. *et al.*, 2010).

1.2.1. Familia de galectinas

Hasta la fecha se han descubierto 15 galectinas en mamíferos. Éstas contienen uno o dos DRC con aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 20 al 50 %, a excepción de la Galectina-12 que presenta una identidad menor al 20 % en comparación con los demás miembros, lo que les permite reconocer diferentes estructuras glicánicas (Hirabayashi, J. *et al.*, 2002). De acuerdo con sus características estructurales, las galectinas pueden dividirse en tres grupos: 1) Prototipo (Gal-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15), que solo contienen un DRC; 2) Tipo quimera (Gal-3), conformado por un péptido rico en prolina (Pro) y glicina (Gly) unido al DRC; 3) Repetición en tándem (Gal-4, 6, 8, 9 y 12), que contienen dos DRC en el extremo N-terminal (N-DRC) y en el C-terminal (C-DRC), unidos por un péptido de unión o "linker". Adicionalmente, pueden formar estructuras mediante interacciones entre las mismas galectinas y patrones de glicanos reconocidos por estas (Fig. 2) (Yang, R.-Y. *et al.*, 2008). Las galectinas prototipo tienden a formar dímeros como se muestra en la Fig. 2; Gal-3 de tipo quimera puede formar pentámeros a través del péptido adicional de su DRC; y las de repetición tipo tándem pueden formar redes como las prototipo formando homo- o hetero-multímeros (Miyanishi, N. *et al.*, 2007).

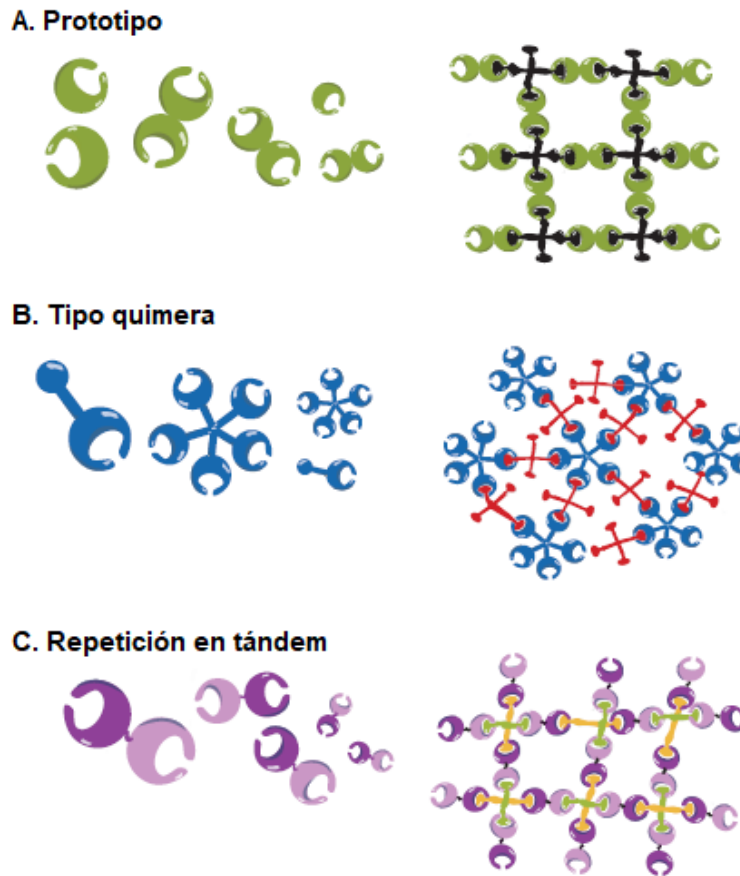


Figura 2. Esquema de la familia de galectinas. Conformada por: A) Prototipo, B) Tipo quimera, y C) Repetición en tándem. Del lado derecho, se observan las diferentes estructuras que pueden formar al reconocer los respectivos glicanos. Modificado de Yang, R.-Y. *et al.* (2008).

1.2.2. Funciones de galectinas y alteraciones en su expresión en el cáncer

A través del reconocimiento de diferentes glicanos y la conformación de las estructuras de la Fig. 2, las galectinas pueden estar involucradas en una gran cantidad de funciones. Dentro de las funciones intracelulares citoplasmáticas, pueden participar en: la transducción de señales relacionadas al crecimiento, diferenciación y supervivencia celular; y en el núcleo participa en el *splicing* del pre-RNA. Las galectinas cuyas funciones se han descrito más, son la Gal-1, Gal-3 y Gal-7. Por ejemplo, Gal-1 puede promover la transformación celular mediante la vía de señalización de RAS, al estabilizar las interacciones entre RAS y su proteína efectora para hacer una activación más eficiente (Hirbe & Gutmann, 2019). Además, puede favorecer la supervivencia celular al incrementar los niveles de expresión del receptor CXCR4 (Hirbe, A.C. & Gutmann, D.H., 2019). Se ha observado que Gal-3 está relacionada con el arresto del ciclo celular en las fases G1 o G2; pero también se han descubierto funciones antiapoptóticas, al proteger a la célula de

señales como la del receptor de muerte celular programada Fas (Liu, F.-T. *et al.*, 2002). Gal-7 cumple funciones proapoptóticas, al inducir muerte celular en respuesta a irradiaciones o expresión de p53; esta relación se observó en células de cáncer colorrectal (CRC) transfectadas con p53 en las que se induce la expresión de Gal-7 (Liu, F.-T. *et al.*, 2002). Las funciones extracelulares de las galectinas son también muy diversas. Las galectinas carecen de péptido señal y son sintetizadas en los ribosomas que se encuentran en el citosol, por lo que su secreción es mediante una vía no clásica. Aunque no se ha descrito cómo ocurre esta secreción, se ha estimado que puede ser por translocación directa, por asociación con endosomas tardíos o microvesículas (Popa, S.J. *et al.*, 2018). En principio, las galectinas extracelulares pueden mantener la adhesión entre célula-célula y célula-MEC (matriz extracelular). Además, pueden modular vías de señalización al regular la segregación de receptores en la membrana celular; ambas funciones principalmente por la conformación de las estructuras que se muestran en la Fig. 2 (Rabinovich, G.A. *et al.*, 2007).

Considerando las funciones que las galectinas cumplen normalmente, se han identificado algunas que pueden verse afectadas con los cambios de expresión que ocurren durante la progresión del cáncer. En la Fig. 3 se muestra una representación de algunas funciones anti y protumorales en las que pueden estar participando las galectinas cuando presentan un aumento o disminución en su expresión, dependiendo del tipo de célula que las exprese (Vladoiu, M.C. *et al.*, 2014). Las galectinas pueden llevar a cabo cierto papel que se ilustra en la Fig. 3. Es por esta razón que es muy complejo adjudicarle un papel en específico a las proteínas de la familia de galectinas, ya que su función dependerá no sólo de su concentración, sino también de su localización y tipo celular. Por ejemplo, Gal-1 es una de las galectinas más estudiadas y se ha reportado una relación de esta proteína con un papel predominantemente protumoral. Puede favorecer la apoptosis en células T con funciones antitumorales (Kovács-Sólyom, F. *et al.*, 2010), mientras que en células de CaCu inhibe este proceso, y favorece otros como la proliferación celular y la invasión (Chetry, M. *et al.*, 2020). En CaCu, se ha estudiado que Gal-3 favorece procesos como proliferación, metástasis y angiogénesis; Gal-7 se ha relacionado con una disminución de la proliferación en líneas celulares. Por otro lado, para Gal-9 los estudios en CaCu son limitados. Se ha reportado que existe una disminución en su expresión en biopsias de pacientes que puede tener una relación con un mal pronóstico de la enfermedad (Wang, L. *et al.*, 2018). Los niveles elevados de expresión de Gal-1 y Gal-3 en pacientes con cáncer por lo general se relacionan con mal pronóstico; y otras galectinas como la Gal-7 y Gal-8 han sido propuestas como biomarcadores de progresión y pronóstico, respectivamente (Bartolazzi, A., 2018). El

estudio de estas galectinas en los diferentes tipos de cáncer ha permitido proponerlas como blancos terapéuticos (Dings, R.P. *et al.*, 2018).

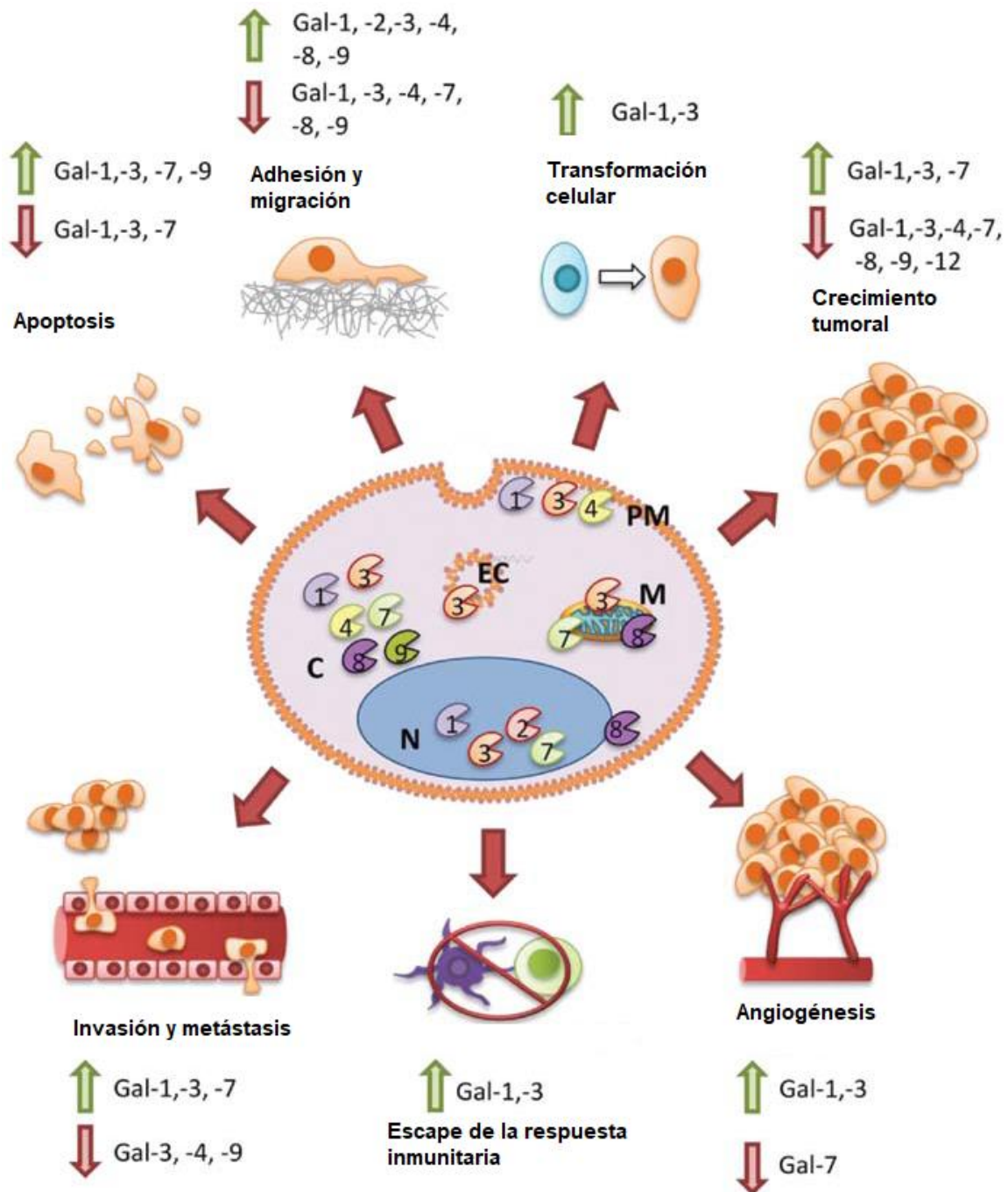


Figura 3. Efectos anti y protumorales de las galectinas en la progresión del cáncer. Se muestran los diferentes compartimentos celulares en los que pueden ejercer sus efectos (N: Núcleo; C: Citoplasma; M: Mitocondria; EC: Compartimentos Endosomoales; PM: Membrana plasmática interna). Las flechas en verde indican aumento en la expresión de las galectinas que se indican en el texto posterior a la flecha; las flechas en rojo indican disminución de la expresión de las galectinas que se indican en el texto posterior a la flecha. Modificado de Vladioiu, M.C. *et al.* (2014).

1.3. Gal-9

Gal-9 pertenece al subgrupo de galectinas de repetición en tándem. Por lo tanto, cuenta con dos dominios de reconocimiento a carbohidratos, con una identidad de aproximadamente 37 % en sus dominios N-DRC y C-DRC, lo que le permite reconocer estructuras glicánicas con diferente afinidad (Hirabayashi, J. *et al.*, 2002). Esta proteína es codificada por el gen *LGALS9*, cuyo locus está en el cromosoma 17q11.2. Se han identificado ocho variantes de RNAm del gen *LGALS9*, siendo este gen el que presenta más isoformas dentro de la familia de galectinas (Heusschen, R. *et al.*, 2013). De estas variantes, solo se ha evidenciado la expresión de tres isoformas proteicas: Gal-9LC (isoforma larga), Gal-9D5 (isoforma mediana, carente del exón 5) y Gal-9D5/6 (isoforma corta, carente de los exones 5 y 6); las cuales pueden encontrarse de manera intra y extracelular (Heusschen, R. *et al.*, 2013).

1.3.1. Funciones de Gal-9

Las principales funciones de Gal-9 radican en las que se descubrieron en la familia de las galectinas: extracelulares, como modulación de vías de señalización, y adhesión celular; aunque menos descritas, las intracelulares en la transducción de señales y *splicing* del pre-RNAm. Su implicación en estas funciones, conlleva a que estén involucradas en un gran número de procesos celulares, muchos de ellos descritos en función a la evolución del cáncer (Chou, F.-C. *et al.*, 2018). Al igual que las demás galectinas, Gal-9 puede ser anti y protumoral, dependiendo del tipo celular que exprese esta proteína. Muchas de éstas están relacionadas con las vías de señalización en las que participan. Por ejemplo, en osteoblastos puede inducir proliferación por la activación de la vía de señalización c-Src/ERK (Tanikawa, R. *et al.*, 2008), mientras que en mieloma induce a apoptosis mediante las vías JNK, p38-MAPK y de las caspasas (Kobayashi, T. *et al.*, 2010).

En una revisión de Heusschen, R. *et al.* (2013), describieron diferentes papeles que puede jugar Gal-9 en diferentes procesos en el cáncer (Fig. 4). En apoptosis y control del ciclo celular, Gal-9 induce a apoptosis en varios tipos celulares (líneas celulares de melanoma, de linfocitos T y de leucemias). En células endoteliales tratadas con IFN-gamma se puede inducir la expresión de Gal-9 y el arresto del ciclo celular. En procesos de adhesión, migración y metástasis, la expresión de Gal-9 en líneas celulares de melanoma y cáncer de mama permite la adhesión entre células, lo que disminuye la migración y la metástasis, al mantener la integridad en los tejidos. En el escape de la respuesta

inmunológica, Gal-9 puede modular la actividad y función de diversas células del sistema inmunitario. Se ha descrito que funciona como quimioatrayente para eosinófilos, los cuales cumplen funciones antitumorales en tumores sólidos. Aunque también se ha visto implicada en la inmunosupresión mediada por linfocitos T reguladores, a través de la interacción con el receptor Tim-3. Por último, esta proteína cumple funciones protumorales al estar involucrada en angiogénesis, ya que es importante para la formación de nuevos vasos sanguíneos junto con la Gal-1, Gal-3 y Gal-8.

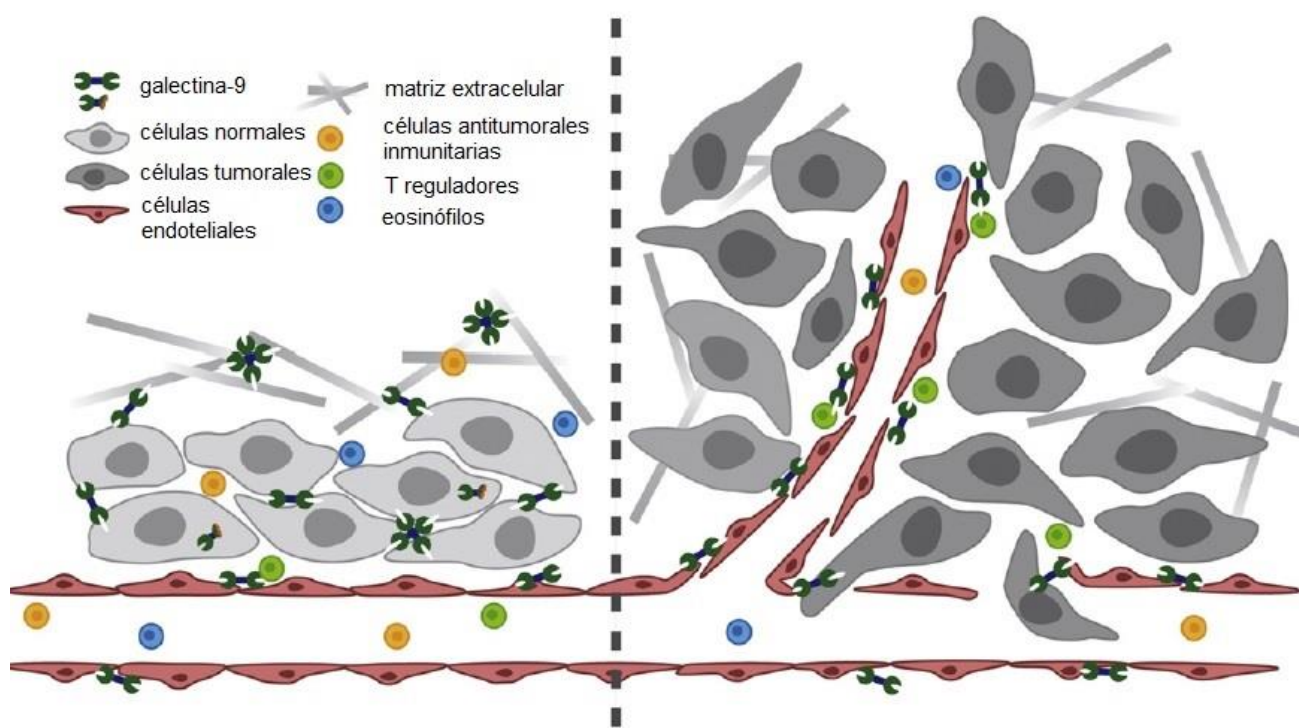


Figura 4. Representación de las funciones de Gal-9 en los tumores sólidos. En la imagen del lado izquierdo, Gal-9 puede encontrarse de manera intracelular en la modulación de transducción de señales, mientras que de manera extracelular participa en la adhesión y como quimioatrayente de eosinófilos. En el lado derecho, cuando las células cancerosas dejan de expresar a Gal-9 hay una pérdida en la integridad del tejido, pérdida de vigilancia inmunológica, y se favorecen otros procesos como angiogénesis e invasión, donde solamente las células endoteliales expresan Gal-9. Modificado de Heusschen, R. *et al.* (2013).

1.3.2. Alteraciones en la expresión de Gal-9 en el cáncer

La expresión de Gal-9 se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer. El primer tipo de cáncer en el que se describió esta proteína fue en el linfoma de Hodgkin donde se encontró una alta expresión de Gal-9 (Türeci, Ö. *et al.*, 1997) relacionada a eosinofilia, lo cual podría ser de buen pronóstico (Cyriac, S. *et al.*, 2008). En cáncer de mama se ha relacionado con un papel antimetastásico, por lo que la expresión de Gal-9 se relaciona con un buen pronóstico en pacientes con esta enfermedad (Irie, A. *et al.*, 2005; Yamauchi, A. *et al.*, 2006). En un modelo *in vitro* de células de cáncer gástrico, se determinó que la expresión de Gal-9 suprime la proliferación de éstas (Takano, J. *et al.*, 2016). En relación con pacientes con este tipo de cáncer, se ha visto que una disminución o ausencia de Gal-9 en tumores de cáncer gástrico se relaciona a un mal pronóstico (Jiang *et al.*, 2013). En carcinoma hepatocelular, se ha reportado que puede inducir a apoptosis en este tipo de células *in vitro* e *in vivo*, y se estima un mejor pronóstico en pacientes con esta enfermedad (Fujita, K. *et al.*, 2015; Zhang, Z.-Y. *et al.*, 2012). En CaCu, son pocos los estudios que se han publicado para Gal-9. Se ha reportado que esta glectina tiene menor expresión en el CaCu en comparación con tejido de cérvix sano, al igual que en lesiones premalignas: en las LIEAG hay una tendencia a menor expresión que en las LIEBG (Liang *et al.*, 2008). Además, puede tener un valor pronóstico en las pacientes con CaCu, donde hay una relación con mayor sobrevida en pacientes con tumores positivos a Gal-9 en comparación con las que presentan tumores negativos a la expresión de la proteína (Punt *et al.*, 2015).

1.3.3. Regulación de la expresión de Gal-9

Los cambios de expresión de Gal-9 han sido descritos en diferentes tipos de cáncer, pero hay pocos estudios sobre los mecanismos que pueden estar regulando su expresión durante la transformación maligna. Por ejemplo, en una línea celular de cáncer de hígado la transfección con miR-22 puede disminuir la expresión de Gal-9 (Yang, Q. *et al.*, 2015). Por otro lado, se sabe que citocinas como IFN- γ son capaces de inducir la expresión de Gale-9 en células endoteliales (Alam, S. *et al.*, 2011). La regulación de la expresión génica ocurre a diferentes niveles, desde modificaciones en la estructura de la cromatina, presencia o ausencia de factores de transcripción que modulan la actividad de un promotor en un tipo celular determinado, la estabilidad de un RNAm o la regulación negativa de la traducción mediante microRNAs, entre otros. El estudio de los mecanismos que modifican la cromatina ha adquirido relevancia en los últimos años, ya que se han observado alteraciones relacionadas con diferentes enfermedades, como el cáncer.

1.4. Mecanismos epigenéticos y sus alteraciones en el cáncer

En un principio, la epigenética puede ser definida como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica mediante cambios fenotípicos hereditables sin involucrar cambios en la secuencia del DNA; esto a través de modificaciones en la estructura de la cromatina. Dentro del estudio del cáncer, en los últimos años se ha determinado que existen alteraciones en los mecanismos epigenéticos en las células cancerosas, resaltando que estos procesos son importantes en la transcripción, reparación de daños al DNA y la replicación, entre otros (Dawson, M.A. & Kouzarides, T., 2012; Egger, G. *et al.*, 2004). La epigenética en el cáncer ha pasado a ser de interés clínico, debido a que su estudio nos permite caracterizar biomarcadores epigenéticos para la detección temprana del cáncer, la predicción de la respuesta a tratamientos y para la evaluación del pronóstico de los pacientes (Díaz-Lagares, A., 2018), incluyendo el CaCu (Dueñas-González, A. *et al.*, 2005). Por otro lado, se han identificado blancos terapéuticos basados en el estudio del epigenoma de la célula cancerosa (Dawson, M.A. & Kouzarides, T., 2012). Estos mecanismos epigenéticos pueden regular la estructura de la cromatina mediante: metilación del DNA, modificaciones de histonas y por acción de los complejos remodeladores de la cromatina.

1.4.1. Metilación del DNA

1.4.1.1. Definición y mecanismo de acción

La metilación del DNA es una de las primeras modificaciones epigenéticas descritas y la más estudiada. En el proceso de la metilación se adiciona un grupo metilo en una citosina en sitios CpG (Fig.5). Es una modificación sumamente ligada a la regulación de la expresión génica, observándose que en el 60 % de los promotores los sitios CpG conforman las islas CpG en mamíferos (Allis, C.D. *et al.*, 2007) como será explicado más adelante. Estos sitios CpG se encuentran en el surco mayor de la doble hélice del DNA, donde por lo general son regiones de unión a factores de la transcripción (FT) (Wade, P.A., 2001). Por lo tanto, la metilación del DNA puede evitar la unión de estos FT y, a su vez, permite el reclutamiento de otras proteínas que se encargan de detectar estas modificaciones para ejercer otras funciones como el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina y modificar la estructura de la cromatina (Blackledge, N.P. & Klose, R., 2011; Leighton, G. & Williams Jr, D.C., 2019).

Una de las técnicas más utilizadas para comprobar el estado de metilación en ciertas regiones es el tratamiento con bisulfito. La reacción con bisulfito consiste en una desaminación del grupo funcional posicionado en el carbono 4 de las citosinas, a excepción de las 5mC, donde el grupo metilo se encarga de proteger al grupo amino por lo que no se realiza ninguna modificación. Para analizar si existen sitios con metilación en el DNA se pueden realizar secuenciaciones de Sanger o NGS (New Generation Sequencing) posteriores al tratamiento con bisulfito (Xi, Y. & Li, W., 2009).

La reacción de adición de grupos metilo a las citosinas es catalizada por una familia de enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMT). Hasta el momento se han identificado dentro de esta familia cinco enzimas: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. La DNMT1, también conocida como DNMT de mantenimiento, se encarga de adicionar grupos en el DNA hemimetilado. Esta función es importante en la replicación del DNA por ser un proceso semiconservativo; basándose en el patrón de metilación en una de las cadenas, la DNMT1 agrega grupos metilo en la hebra complementaria (Edwards, J.R. *et al.*, 2017). Además, su función es importante en algunos mecanismos de reparación de daños al DNA (Mortusewicz, O. *et al.*, 2005; Schär, P. & Fritsch, O., 2011). La DNMT1, además de poseer un dominio catalítico, tiene un dominio regulador que difiere de las demás DNMTs denominado dominio PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) que actúa como un factor de procesividad en el DNA, al igual que la DNA polimerasa δ en células eucariotes (Vilkaitis, G. *et al.*, 2005). Por otro lado, la DNMT3A y la DNMT3B se conocen como DNMT *de novo* al crear nuevos patrones de metilación en sitios CpG; por esta razón, están más involucradas en el silenciamiento de la expresión de los genes en diferentes etapas del desarrollo (Smallwood, S.A. & Kelsey, G., 2012). Ambas son estructuralmente similares, sin embargo, se ha reportado que difieren en su preferencia por ciertas secuencias consenso en su sitio regulador para realizar la metilación *de novo* (Oka, M. *et al.*, 2006; Wienholz, B.L. *et al.*, 2010). La DNMT2 había sido poco estudiada debido a que solamente está conformada por un dominio catalítico (Allis *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se encontró que además de su actividad DNMT también está implicada en procesos de metilación del RNA, descubriéndose primero en ciertos tipos de RNAt (Jeltsch, A. *et al.*, 2017; Schaefer, M. & Lyko, F., 2010). Por último, a la DNMT3L no se le ha atribuido una función como metiltransferasa, sino como un factor estimulante de la metilación del DNA al actuar en conjunto con la DNMT3A y DNMT3B en la modulación de patrones de la metilación (Wienholz, B.L. *et al.*, 2010). Las DNMTs realizan la metilación del DNA en tres pasos: 1) hacen un giro de 180° a la citosina, 2) transfieren el grupo metilo en la posición 5 de la citosina a partir de una molécula de SAM (S-adenosil metionina), convirtiéndola en

SAH (S-adenosil homocisteína), y 3) la citosina metilada es colocada en su lugar de origen. En este punto, la citosina recibe el nombre de 5-metilcitosina (o 5mC) (Klimasauskas, S. *et al.*, 1994; Ponnaluri, V.C. *et al.*, 2018; Wu, J.C. & Santi, D., 1987).

La metilación del DNA es una reacción reversible catalizada por las enzimas hidroxilasas de translocación 10-11 (TET, *Ten-Eleven Translocation*, por sus siglas en inglés), también denominadas como dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OGDD, *2-oxoglutarate-dependent dioxygenases*). Reciben este nombre debido a que en pacientes con leucemia mieloide aguda encontraron una translocación t(10;11)(q22;q23) que hibrida al gen *MLL* (Leucemia de Linaje Mixto) con *TET1* (Lorsbach, R. *et al.*, 2003). La familia de las TETs está conformada por la TET1, TET2 y TET3, que comparten similitudes en el dominio catalítico al poseer sitios de unión a Fe(II) y 2-OG; por lo tanto, su actividad es dependiente de la presencia y unión de estos factores (Koivunen, P. & Laukka, T., 2018; Tan, A.Y. & Manley, J.L., 2009). Tienen sitios de unión a 5mC, y llevan a cabo reacciones de oxidación hasta llegar a sus productos oxidados: 5-hidroximetilcitosina (5hmC) como primer producto; y 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC), como productos subsecuentes.

Las TET modulan la desmetilación del DNA de manera “pasiva” y “activa”. La primera vía hace referencia a la pérdida de sitios metilados a través de procesos como división celular, recibiendo el nombre de “dilución de 5mC dependiente de la replicación”. Esto se debe a que las TET actúan en una de las dos hebras del DNA para catalizar la reacción de 5mC a 5hmC, y posteriormente en la replicación del DNA los patrones de metilación en 5mC solo se conservan en una sola cadena (Rasmussen, K.D. & Helin, K., 2016). Esta desmetilación es caracterizada por la acumulación del primer producto 5hmC. Por otro lado, la desmetilación activa del DNA se caracteriza por un reemplazo de 5mC y las formas oxidadas de la misma. Uno de los mecanismos propuestos es por la acción de la timina DNA glicosilasa (TDG) que forma parte del mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases (Wu, H. & Zhang, Y., 2014). Se ha visto efecto de la TDG sobre 5fC y 5caC, pero no sobre 5hmC, por lo que es necesario una modificación progresiva por las TET hacia 5hmC para llevar a cabo la desmetilación activa del DNA, como se muestra en la Fig. 5 (Rasmussen, K.D. & Helin, K., 2016).

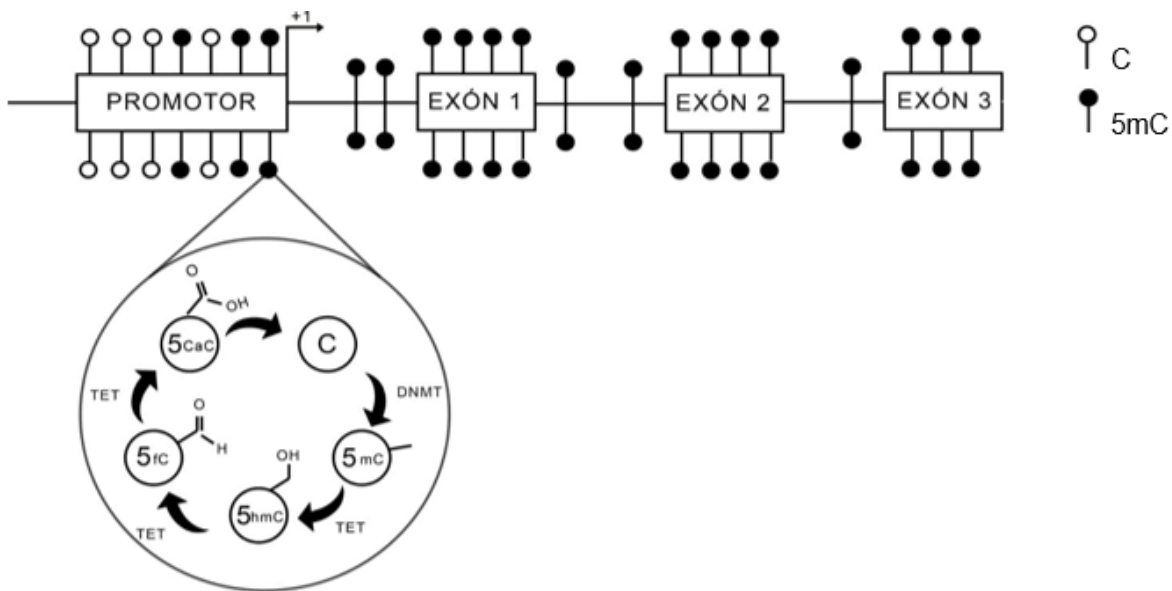


Figura 5. Mecanismo de metilación del DNA. Representación de un gen transcripcionalmente activo donde se muestra hipometilación en la región promotora característica de estos genes, patrones de metilación en el cuerpo del gen (en especial en exones) y en la parte inferior una representación del proceso de metilación y desmetilación del DNA. C: Citosina. 5mC: 5-metilCitosina. 5hmC: 5-hidroximetilcitosina. 5fC: 5-formilcitosina. 5CaC: 5-carboxilcitosina.

En el mecanismo de la metilación del DNA es de suma importancia la participación de un grupo de proteínas encargadas de detectar los patrones de metilación en el genoma. Estas proteínas pertenecen a la familia con dominio de unión a metilo (MBD, *Methyl-Binding Domain*). En un principio se identificó un complejo proteico denominado Proteína 1 de unión a metil-CpG (MeCP1, *Methyl-CpG-Binding Protein 1*) (Meehan, R.R. *et al.*, 1989). Después se identificó de manera individual a la MeCP2. Esta proteína se ha relacionado con la remodelación de la cromatina en la formación de heterocromatina principalmente, y se ha reportado que puede reconocer 5mC y 5hmC. Posterior al descubrimiento de la MeCP2, las siguientes proteínas MBD caracterizadas fueron nombradas como MBD1 hasta MBD6. Las MBD1-4 reconocen 5mC de manera preferencial, y las MBD2 y MBD3 también reconocen 5hmC, pero con menor afinidad (Du, Q. *et al.*, 2015). Cada una de estas proteínas cumplen funciones específicas al reconocer patrones de metilación. Por ejemplo, la MBD3 por lo general se encuentra como componente del complejo Desacetilasa y remodelador del nucleosoma (NuRD, Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex) que participa en la represión transcripcional (Loughran, S.J. *et al.*, 2017; Yildirim, O. *et al.*, 2011); la MBD4 tiene un dominio glicosilasa (T-DNA glycosylase) que cumple un rol en la reparación del

DNA cuando este se encuentra hemimetilado durante la replicación, removiendo timinas al tener interacciones timina-guanina en lugar de citosina-guanina (Zhang, W. *et al.*, 2011; Zhu, B. *et al.*, 2000). De igual manera se encuentran las proteínas SETDB1/2 que además de su dominio MBD, cuentan con un dominio SET que les confiere la actividad de metiltransferasa de histonas en residuos H3K9 (Lys9 de la histona H3), relacionado con la represión de la expresión génica (Ichimura, T. *et al.*, 2005; Loyola, A. *et al.*, 2009). Por último, se han caracterizado las BAZ2A y B que además del dominio MBD cuentan con un bromodominio, permitiéndoles unirse a residuos de histonas acetiladas (Du, Q. *et al.*, 2015).

1.4.1.2. Dinucleótidos e islas CpG

Como se mencionó anteriormente, la metilación del DNA ocurre en citosinas que se encuentran en sitios o dinucleótidos CpG. También se ha reportado que existen ciertas secuencias consenso a las que las DNMTs son afines para llevar a cabo la reacción de metilación de citosinas (Wienholz, B.L. *et al.*, 2010). Estos sitios para metilación se encuentran distribuidos principalmente en regiones satélites del DNA, transposones, regiones intergénicas, exones y, de manera muy importante, en promotores. En este último punto, la metilación del DNA cumple una función importante al ser uno de los reguladores de la expresión génica, es decir, al haber una hipermetilación en promotores hay una estrecha relación con represión transcripcional; contrariamente, cuando hay hipometilación. Debido a esto se estima que, en procesos evolutivos, se ha acumulado la concentración de dinucleótidos CpG en promotores de algunos genes recibiendo el nombre de “islas CpG” (Antequera, F., 2003; McLain, A.T. & Faulk, C., 2018; Su, Z. *et al.*, 2016).

Aproximadamente el 60 % de los promotores en el genoma humano presentan islas CpG, cuyas características principales son: 1) más del 50 % de la región tiene alto contenido de GC (aunque esto puede variar según lo reportado por Yu, N. *et al.* (2017)), y 2) son regiones mayores a 200 pb. La mayoría de los genes constitutivos presentan esta característica en sus promotores. El 40 % de los promotores restantes carecen de islas CpG y la metilación del DNA solo ocurre en dinucleótidos CpG, o regiones pequeñas llamadas cajas GC. La mayoría de los genes inducibles presentan esta característica en sus promotores. (Saxonov, S. *et al.*, 2006). La presencia de metilación en estos promotores regula la expresión de estos genes (Deng, G.-F. *et al.*, 2011; Miyajima, A. *et al.*, 2009). La repulsión de unión de FT a regiones promotoras es clave en la expresión génica, por ejemplo, Sp1 es un FT que se encuentra involucrado en la regulación de la expresión génica de muchos genes relacionados a procesos de crecimiento celular, diferenciación, apoptosis

e incluso carcinogénesis (Chu, S., 2012; Vizcaíno, C. *et al.*, 2015). Algunas cajas GC juegan un papel importante como elementos de respuesta a Sp1, por lo que es conocido que la metilación del DNA en estas regiones impide la unión de este FT y, por lo tanto, hay relación con supresión transcripcional (Clark, S.J. *et al.*, 1997; Gong, J. *et al.*, 2019; Jiang, D. *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha reportado lo contrario con Ap-1. Este es un complejo dimérico que puede estar formado por las proteínas de las familias Jun, Fos, ATF y MAF en forma de cierres de leucinas. El complejo de Ap-1 c-Jun/c-Fos puede responder al mismo elemento de respuesta de GCN4 que se denomina TRE (TPA-responsive element), el cual se ha relacionado con proliferación, sobrevivencia, diferenciación y transformación celular cuando Ap1 se encuentra unido al elemento. Sin embargo, la función depende del tipo celular y su estado de diferenciación, debido a que en otros estudios indican que puede relacionarse con la supresión de formación de tumores (Eferl, R. & Wagner, E.F., 2003). En cuanto a su relación con la metilación del DNA, se ha reportado que además de unirse a TRE, tiene afinidad por ciertas secuencias de DNA metiladas (Gustems, M. *et al.*, 2014).

1.4.1.3. Alteraciones en la metilación del DNA en el cáncer

Dentro de las anomalías que se describen en las células cancerosas, la metilación aberrante del DNA es una de las alteraciones clave para la transformación de éstas. En tumores en general, se han descrito dos fenómenos relacionados a la metilación aberrante del DNA: hipometilación global e hipermetilación regional del DNA (Klutstein, M. *et al.*, 2016). La hipometilación global del DNA hace referencia a la pérdida de patrones de metilación en el genoma en general, resultando en inestabilidad genómica al permitir translocaciones de transposones y rearrreglos de la cromatina (Klein Hesselink, E.N. *et al.*, 2018). También se ha reportado una asociación con la expresión de oncogenes (Van Tongelen, A. *et al.*, 2017). La hipermetilación regional del DNA es el segundo fenómeno relacionado a metilación aberrante del DNA, y se refiere principalmente a hipermetilación en promotores de genes clave como los genes supresores de tumores, como se ha reportado en distintos tipos de cáncer como: cáncer de mama (Rauscher, G.H. *et al.*, 2015; Zhang, J. *et al.*, 2017), pancreático (Henriksen, S.D. *et al.*, 2017) y colorrectal (Berman, B.P. *et al.*, 2012). Los cambios en la metilación del DNA en el cáncer han sido de importancia clínica debido a su potencial como biomarcadores tumorales en diferentes tipos de cáncer (Micevic, G. *et al.*, 2017; Tahara, T. & Arisawa, T., 2015; Tang, Q. *et al.*, 2016), pudiéndose utilizar diferentes tipos de muestra (dependiendo del tipo de cáncer) como: tejidos fijados

con formalina y embebido en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés), sangre periférica, saliva, orina, entre otros (Pan, Y. *et al.*, 2018).

Finalmente, la metilación aberrante del DNA en el cáncer es una alteración mediada por cambios de expresión de las DNMTs. Se han reportado mutaciones, por ejemplo, en DNMT1 en cáncer colorrectal causando una pérdida de su actividad catalítica y, por consecuencia, alteraciones en los patrones de metilación global (Kanai, Y. *et al.*, 2003). Sin embargo, muchos de los cambios de expresión se deben a polimorfismos en la región promotora que modifican su expresión, como se ha reportado para la DNMT3A en cáncer gástrico (Fan, H. *et al.*, 2010). Al tener en cuenta estas alteraciones, se han propuesto a las DNMTs como principales blancos terapéuticos que incluso ya se están probando en muchos tipos de cáncer junto con las terapias convencionales (Brueckner, B. & Lyko, F., 2004; Zhou, Z. *et al.*, 2018).

1.4.1.4. Metilación aberrante del DNA en el CaCu

En una clasificación molecular propuesta por la TCGA (The Cancer Genome Atlas), se hizo una caracterización de patrones de metilación del DNA en islas CpG en CaCu. Al final, se propusieron tres grupos basándose en su nivel de metilación en las islas CpG denominado CIMP (CpG island methylator phenotype): CIMP-alto, CIMP-medio y CIMP-bajo. CIMP-bajo coincide con el perfil de expresión de genes que participan en la Transición Epitelio-Mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), mientras que los CIMP-alto coinciden con la mayoría de muestras positivas a adenocarcinoma (Network, C.G.A.R., 2017). De este estudio se puede resaltar que las alteraciones en patrones de metilación del DNA se encuentran presentes en los diferentes tipos de CaCu.

Como se mencionó anteriormente, estos cambios en la metilación del DNA se deben a su vez a las alteraciones en la expresión de las DNMTs. Lo mismo se puede suponer en el CaCu. Aunque no hay reportes sobre mutaciones o polimorfismos de las DNMTs en el CaCu. Durzynska, J. *et al.* (2017) describieron que muchas de las alteraciones en la expresión y/o actividad de las DNMTs son resultado de la acción de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, principalmente de genotipos de alto riesgo. E6 del VPH-16 induce indirectamente la expresión de la DNMT1, al llevar a cabo la degradación de p53 ya que no puede unirse directamente a la DNMT1 (Yeung, A. *et al.*, 2010); mientras que E7 puede unirse directamente a la DNMT1 e inducir su actividad (Burgers, W.A. *et al.*, 2007). En cuanto a las DNMTs de metilación de novo, se ha estudiado que la presencia de E7 del

VPH-16 incrementa la expresión de la DNMT3A (Laurson, J. *et al.*, 2010); y E7 del VPH-18, la de la DNMT3B (Leonard, S.M. *et al.*, 2012).

1.4.2. Modificaciones de histonas

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, con carga altamente positiva y su y participan en la compactación del DNA. Estas proteínas se nombran como: H2A, H2B, H3 y H4 (sin tomar en cuenta las variantes de la H2A y H3). Al interaccionar dos dímeros de H2A y H2B con un tetrámero de H3 y H4, se conforma una unidad llamada octámero de histonas. Cada octámero es capaz de enrollar 146 pb de DNA, y hay una distancia de 54 pb (denominado DNA de unión) entre cada octámero; el complejo de octámero de histonas y DNA enrollado se denomina como “nucleosoma”, que a su vez son las unidades estructurales que conforman la cromatina. Cada histona que forma parte del nucleosoma puede sufrir ciertas modificaciones postraduccionales, o simplemente “modificaciones de histonas”, que van a ser de importancia en la modificación de la estructura de la cromatina. Estas modificaciones pueden ocurrir en los residuos más cercanos al extremo N-terminal, también conocidos como “cola de histonas”, aunque hay algunas modificaciones que ocurren más lejanas casi en el cuerpo del octámero (Lodish, H. *et al.*, 2008).

Hasta la fecha se han descrito distintas modificaciones que pueden ocurrir en las colas de las histonas principalmente. Las más conocidas son: metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. Aunque con el tiempo se han descrito más marcas como: ADP-ribosilación, algunas derivadas de la acetilación (crotonilación, propionilación, butirilación, formilación, hiroxilación), O-GlcNacilación (Chen, Q. *et al.*, 2013), serotonilación (Farrelly, L.A. *et al.*, 2019), lactilación (Izzo, L.T. & Wellen, K.E., 2019), entre otras.

Con la ayuda de otras modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA y complejos remodeladores de la cromatina, la estructura de la cromatina puede cambiar en función a las modificaciones de las histonas y esto depende de la marca que se encuentre presente en la cola de las histonas, y la posición que ocupe en la misma región. Por ejemplo, se han caracterizado algunas marcas en histonas relacionadas a la formación de heterocromatina (cromatina compactada o fibra de 30 nm) que no permite la transcripción génica: algunas formas mono, di y trimetiladas de H3K9me, H3K27me y H4K20me, ubiquitinación de H2AK119Ubi y sumoilación, son ejemplos de este tipo de marcas “represivas”. Por otro lado, hay algunas marcas de histonas relacionadas a la formación de

euromatina (cromatina relajada, o fibra de 11 nm): formas mono, di y trimetiladas de H3K4me, H3K36me y H3K79me, H2BK123Ubi, y marcas de acetilación (H2A, H2B, H3 y H4), son ejemplos de este tipo de marcas “activadoras” (Allis, C.D. *et al.*, 2007). En muchos casos, la presencia de distintas marcas de histonas en nucleosomas adyacentes a cierta región del genoma pueden influir en estos cambios en la cromatina; esto es a lo que se le denomina “teoría del código de histonas” (Fischle, W. *et al.*, 2015). Para el desarrollo de este proyecto, nos enfocaremos específicamente en las marcas de acetilación en histonas.

1.4.2.1. Acetilación de histonas

La acetilación de histonas es una de las modificaciones de histonas más comunes en genes transcripcionalmente activos y está altamente relacionada con la euromatina. Esta modificación inicia con la adición de un grupo acetilo en residuos de lisina (Lys o K) que ocurren en las colas de las histonas principalmente de la H3, aunque también hay residuos acetilados en H2A, H2B y H4. A diferencia de otras marcas como la metilación, la acetilación se caracteriza por causar una neutralización de las cargas positivas de las histonas, y reduce la fuerza de unión de esta carga con la carga negativa del DNA originada por los grupos fosfatos. Esto provoca que exista un rearrreglo del DNA que se encuentra alrededor del octámero de histonas, y causa una ligera descompactación de los nucleosomas, dando lugar a la euromatina (Allis, C.D. *et al.*, 2007; Eberharter, A. & Becker, P.B., 2002). Otro de los efectos de la acetilación de histonas es el reclutamiento de proteínas; por ejemplo, proteínas del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF que poseen bromodominios (dominio de reconocimiento de residuos de histonas acetilados) con los que pueden interactuar para ejercer su función en la descompactación de la cromatina (Ribeiro-Silva, C. *et al.*, 2019). Hay una estrecha relación entre la presencia de acetilación en las colas de histonas de H3 con cambios en la transcripción, en especial los residuos H3K9ac y H3K14ac que son activadores de la transcripción y se localizan adyacentes a los promotores, como se describirá más adelante. Sin embargo, estos cambios también son importantes durante la replicación del DNA, donde se han reportado más cambios de acetilación globales en H4 durante la fase S del ciclo celular, con una desacetilación en regiones de heterocromatina durante la fase G2 (Jasencakova, Z. *et al.*, 2001).

La acetilación de histonas es una modificación catalizada por las enzimas denominadas HAT (Histona Acetiltransferasas) o KAT (por su actividad sobre Lys), y tienen en común la capacidad de catalizar esta reacción a partir de la transferencia del grupo acetilo de la acetyl-CoA. Estas proteínas se dividen en seis grandes familias con sus

respectivos subtipos (Tabla 1). El nombre de cada familia fue asignado según la función en las que están involucradas, a excepción de las GNAT, MYST y p300/CBP. GNAT es una familia de HATs con actividad sobre H3 y H4, cuentan con un bromodominio para reconocer lisinas acetiladas, y se han relacionadas con activación transcripcional, reparación del DNA y ensamblaje de la cromatina (Salah Ud-Din *et al.*, 2016). MYST puede presentar un cromodominio (dominio organizador de cromatina, por sus siglas en inglés) que reconoce lisinas metiladas (Wapenaar, H. & Dekker, F.J., 2016). Por último, la familia p300/CBP son coactivadores transcripcionales que poseen un bromodominio y un dedo de zinc PHD (Homodominio de Plantas) involucrados en la regulación transcripcional. Estas proteínas pueden estar involucradas en vías de señalización como la Wnt (Li, J. *et al.*, 2007), y en la acetilación de otras proteínas como p53 (Brooks, C.L. & Gu, W., 2011); además de la actividad HAT, pueden catalizar la crotonilación para una mayor tasa transcripcional (Sabari, B.R. *et al.*, 2015). Esta es también una reacción reversible por acción de las Histonas Desacetilasas (HDACs), que se encargan de remover el grupo acetilo del residuo de Lys (Fig. 6). Existen cinco subgrupos en la familia de las HDACs: clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), clase IIa (HDAC4, 5, 7 y 9), clase IIb (HDAC6 y 10), clase III (SIRT1-7) y clase IV (HDAC11); las cuales están clasificadas de acuerdo a su homología con la histona deacetilasa Rpd3 de levadura. De estas enzimas, las de clase I son ubicuas, mientras que las demás clases son tejido específicas (Gregoret, I. *et al.*, 2004; Witt, O. *et al.*, 2009).

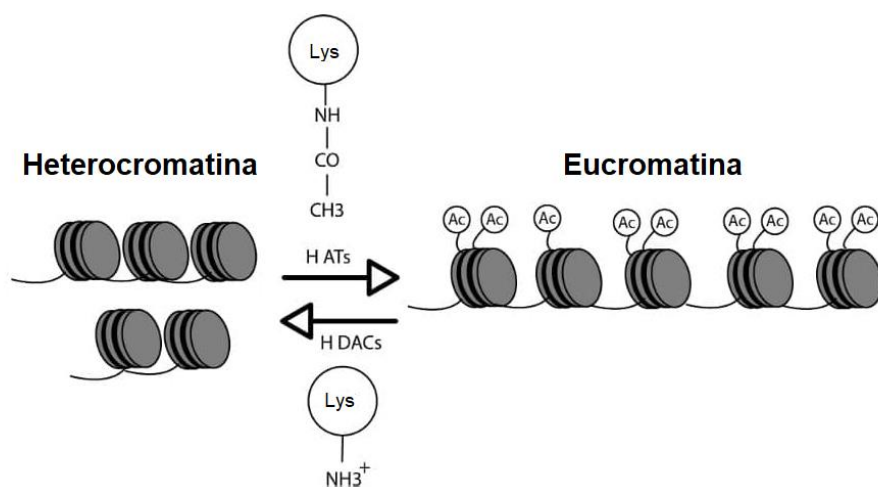


Figura 6. Mecanismo de acetilación de histonas. La ausencia del grupo acetilo (Ac) se relaciona con la conformación de la heterocromatina; la presencia de Ac se relaciona con la eucromatina.

1.4.2.1.1. Acetilación en H3K9ac y H3K14ac

Tanto H3K9ac como H3K14ac son marcas activadoras de acetilación que se encuentran predominantemente en genes activos. Las proteínas como TAF1 y BDF1 pueden formar parte del complejo TFIID, necesario para dar inicio a la transcripción, reconocen estas marcas para llevar a cabo su función (Allis, C.D. *et al.*, 2007). Este tipo de regulación de la expresión génica puede ser inducido desde distintos puntos. Por ejemplo, H3K9ac está presente en promotores activos junto con hipometilación del DNA regional (Li, C. *et al.*, 2019); una hipoacetilación H3K9ac repercute en la disminución de la expresión génica (Banerjee, A. *et al.*, 2017). Además, esta marca está implicada en respuesta a la expresión de genes relacionados al estrés fisiológico en modelos de plantas (Du, Z. *et al.*, 2013; Hu, Y. *et al.*, 2012), en la diferenciación de células troncales pluripotentes (Cui, P. *et al.*, 2020), en la regulación del reloj circadiano (Takahashi, J.S., 2015), y puede alterarse de manera global en respuesta a daño en el DNA (Tjeertes, J.V. *et al.*, 2009). La marca de acetilación H3K14ac también está implicada en otros procesos. Por ejemplo, el complejo remodelador de la estructura de la cromatina (Rsc, Remodel the Structure of Chromatin) en levaduras detecta esta marca por interacción con su bromodominio y participa en la reparación del daño al DNA (Chen, G. *et al.*, 2020; Duan, M.-R. & Smerdon, M.J., 2014; VanDemark, A.P. *et al.*, 2007), y en la activación de los orígenes de la replicación durante la fase S del ciclo celular (Feng, Y. *et al.*, 2016). La alteración en estas marcas de manera global ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer, ya que repercute en la expresión de genes relacionados con la progresión tumoral lo que resalta la importancia de su estudio en el cáncer.

Tabla 1. Familia de HATs. Modificado de Wapenaar, H. y Dekker, F.J. (2016).

Familia	Nombre del gen	Nombre común
Citoplasmáticas	KAT1	HAT1
	HAT4	NAA60
GNAT	KAT2A	Gcn5
	KAT2B	PCAF
MYST	KAT5	TIP60
	KAT6A	MOZ, MYST3
	KAT6B	MORF, MYST4
	KAT7	HBO1, MYST2
	KAT8	MOF, MYST1
p300/CBP	KAT3B	p300
	KAT3A	CBP
Coactivadores transcripcionales	KAT4	TAF1, TBP
	KAT12	TIFIIIC90
Coactivadores de receptores esteroideos	KAT13A	SRC1
	KAT13B	SCR3, AIB1, ACTR
	KAT13C	p600
	KAT13D	CLOCK

1.4.2.2. Alteraciones en la acetilación de histonas en el cáncer

La acetilación de histonas es una de las modificaciones epigenéticas que más se han estudiado y que se han reportado alteradas en el cáncer. En la regulación de la acetilación es necesaria la participación de las HATs y las HDACs en conjunto. En diferentes tipos de cáncer se han reportado alteraciones en la expresión de estos dos grupos de proteínas. Principalmente, mutaciones puntuales en las HDACs repercuten en la alteración en la actividad de éstas y en el silenciamiento de numerosos genes que participan en el control del desarrollo del fenotipo maligno de las células tumorales (Roper, S. & Esteller, M., 2007). Es por ello que las HDAC se consideraron como los primeros blancos terapéuticos utilizados para el tratamiento del cáncer en relación a la regulación del epigenoma en tumores sólidos y malignidades hematológicas (Huang, M. & Geng, M., 2017; Huang, Y. *et al.*, 2007; West, A.C. & Johnstone, R.W., 2014; Zhao, Y. *et al.*, 2014). Aunque no es tan común, en el cáncer también pueden verse sobreexpresadas ciertas proteínas con actividad de HAT, provocando que se induzca la expresión de oncogenes y generando un efecto en diversas vías de transducción de señales, como se ha reportado para el cáncer de mama (Guo, P. *et al.*, 2018).

Finalmente, las alteraciones en estas enzimas se ven reflejadas en las modificaciones en la acetilación de los residuos de histonas, siendo H3 y H4 las principales alteradas. En los estudios más recientes, se han detectado cambios en las acetilaciones globales en H3 y H4 en cáncer renal (Mosashvili, D. *et al.*, 2010); en H3K18ac y H4ac global en cáncer de vejiga (Ellinger, J. *et al.*, 2016); en H3K4ac, H3K9ac y H3K27ac en cáncer de mama (Judes, G. *et al.*, 2016; Judes, G. *et al.*, 2018); en H3K18ac y H4K12ac en cáncer pancreático (Juliano, C.N. *et al.*, 2016); entre otros.

1.4.2.2.1. Acetilación de histonas en el CaCu

En CaCu no hay muchos estudios sobre cambios en la acetilación de histonas en los tumores. Hasta ahora se han descrito alteraciones en la expresión y/o actividad de las HATs y HDACs, y muchas de estas son a causa de las oncoproteínas del VPH que pueden interactuar con p300/CBP, TIP60 y PCAF para reducir su actividad, repercutiendo en el silenciamiento de genes supresores de tumores (Durzynska, J. *et al.*, 2017). También se ha evidenciado que pueden modular la actividad de las enzimas HDAC1/2 que pueden formar parte del complejo NuRD para silenciamiento de la expresión de genes (Brehm, A. *et al.*, 1999). Debido a que hay mayor evidencia en la desregulación de la actividad de HDACs, en CaCu también se han propuesto diversos fármacos que pueden inhibir estas enzimas y reactivar la expresión de genes supresores de tumores (Chavez-Blanco, A. *et al.*, 2005; De La Cruz-Hernández, E. *et al.*, 2007; Feng, D. *et al.*, 2013).

En cuanto a afectaciones directamente sobre acetilación de residuos en particular, el primer estudio fue realizado en raspados cervicales de pacientes con lesiones NIC I, NIC II y NIC III, utilizando anticuerpos contra acetilación y fosforilación en H3. Los resultados muestran una asociación en la progresión de NIC II a NIC III con el aumento de estas dos modificaciones en H3 (Anton, M. *et al.*, 2004). En otro estudio se encontró que las pacientes con CaCu que presentan una menor expresión de H3K9ac tienen un mejor pronóstico de la enfermedad en comparación con las que tienen mayor expresión de la marca (Beyer, S. *et al.*, 2017), lo cual podría estar relacionado con la cantidad de genes que pueden estar alterados por la H3K9ac. Sin embargo, aún no hay reportes sobre genes que pueden estar alterados por estas marcas de acetilación en CaCu. Para H3K14ac aún no hay estudios en CaCu.

1.4.3. Complejos remodeladores de la cromatina

Para que las modificaciones como la metilación del DNA y las marcas en las histonas (como la acetilación) puedan contribuir en la estructura de la cromatina, es necesaria la participación de otras proteínas que detecten estos cambios y realicen un rearrreglo de la cromatina. Estas proteínas reciben el nombre de “complejos remodeladores de la cromatina”, ya que están compuestos de varias enzimas que en conjunto llevan a cabo la remodelación de la cromatina. Debido a lo que involucra un rearrreglo como éste, los complejos son dependientes de ATP, y se estima que se necesitan aproximadamente 4 moléculas de ATP para rearrreglar un solo nucleótido (Clapier, C.R. & Cairns, B.R., 2009). Con base en la homología que presentan los dominios ATPasa de estos complejos, se pueden distinguir cuatro complejos principales: SWI/SNF (*Switch/Sucrose non-fermentable*), ISWI (*Imitation SWI*), NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylation*) e INO80 (Complejo 80 que requiere Inositol); los cuales ejercen su función al detectar algunas marcas a través de sus cromodominios, bromodominios o MBD (Wang, G.G. *et al.*, 2007). Considerando que estos últimos dos dominios funcionan para reconocer acetilación de histonas y metilación del DNA, respectivamente, nos enfocaremos en los complejos SWI/SNF y NuRD en las siguientes secciones.

1.4.3.1. SWI/SNF

Este complejo recibe este nombre debido a los procesos en levaduras en los que fue descubierto: SWItching, referente al fenómeno “*Mating type switching*”; y “*Sucrose Non-Fermentable*”, referente a la fermentación de la sacarosa. Esta familia puede dividirse en BAF (*BRG/BRM-associated factors*) y PBAF (*polybromo-associated factors*) dependiendo de las subunidades que lo conformen. En mamíferos, BAF puede estar conformado por las ATPasas BRG o BRM, mientras que PBAF solo incluye a BRM (Mashtalir, N. *et al.*, 2018). La principal diferencia entre ambos grupos son las subunidades accesorias que, aunque son diferentes subunidades, tienen relación con proteínas que contienen predominantemente bromodominios y dedos de zinc PHD, por lo que pueden leer marcas de lisinas acetiladas (Hota, S.K. & Bruneau, B.G., 2016). Por otro lado, los complejos BAF están implicados en la activación de enhancers, en procesos de desarrollo y diferenciación en distintos tipos celulares; y PBAF está de igual forma implicado en la diferenciación (Hodges, C. *et al.*, 2016). Estos complejos llevan a cabo estas funciones a través de la creación de sitios accesibles a proteínas como las polimerasas, mediante: el desplazamiento del octámero de histonas en la misma región; y por la remoción de las

proteínas del octámero para participar en el reemplazo con variantes de histonas (Ribeiro-Silva, C. *et al.*, 2019). El papel que juega este complejo remodelador de la cromatina, es importante en diversos procesos como la transcripción (Lorch, Y. & Kornberg, R.D., 2017) y reparación de daños al DNA (Smith-Roe, S.L. *et al.*, 2015).

1.4.3.2. NuRD

Como el nombre de este complejo lo sugiere, NuRD participa en la remodelación de la cromatina y además cuenta con actividad deacetilasa, por lo que está relacionado con la compactación de la cromatina. Este complejo cuenta con distintas subunidades: CDH3/4 (Mi2 α/β) que contiene dos dedos de zinc PHD, dos cromodominios y el dominio ATPasa; HDAC1/2 para deacetilar; MBD2/3 para dirigirse a sitios CpG metilados; y otras proteínas accesorias como MTA1/2/3, p66 α/β , y RbAp46/48, que brindan especificidad para ciertas regiones genómicas (Lai, A.Y. & Wade, P.A., 2011; Torchy, M.P. *et al.*, 2015). Su función represora funciona al ser reclutado a sitios con hipermetilación regional (reconocido por el dominio MBD) y una posterior deacetilación de lisinas, repercutiendo en la modificación de la estructura de la cromatina. SWI/SNF y NuRD pueden jugar un papel antagonista en la remodelación de la cromatina (Bracken, A.P. *et al.*, 2019).

1.4.3.3. Alteraciones en SWI/SNF y NuRD en el cáncer

En la evolución del cáncer se ha identificado que existen alteraciones en las modificaciones de la estructura de la cromatina por desregulaciones de los complejos SWI/SNF y NuRD principalmente (Bracken *et al.*, 2019). En el análisis de Dawson, M.A. y Kouzarides, T. (2012), indican que SWI/SNF es un complejo importante en procesos de diferenciación celular, regulación de la progresión del ciclo celular, entre otros. Pero en el cáncer se han detectado mutaciones en proteínas que son parte del complejo, tanto en tumores sólidos como en malignidades hematológicas (Chapman, M.A. *et al.*, 2011; Gui, Y. *et al.*, 2011; Jones, S. *et al.*, 2010). De igual forma, se ha reportado que la sobreexpresión de la ATPasa BRG1 está relacionada con procesos como la activación de la vías de señalización WNT, lipogénesis y SHH, así como la supresión de E-cadherina, que repercute en la activación de la EMT en distintos tipos de tumores sólidos (Huang, L.-Y. *et al.*, 2018; Wu, Q. *et al.*, 2017)

Por otro lado, NuRD está implicado en la transcripción, el ensamblaje de la cromatina, progresión del ciclo celular y estabilidad genómica. En el desarrollo del cáncer,

NuRD puede promover diferentes procesos prooncogénicos; por ejemplo: puede ser reclutado por oncogenes a promotores de genes supresores de tumores y de diferenciación, para reprimir su expresión; puede verse involucrado en la activación de genes relacionados con metástasis, angiogénesis y el proceso EMT (transición epitelio-mesénquima), así como en la inactivación de genes relacionados al arresto del ciclo celular y apoptosis. Por otro lado, la presencia de hipermetilación regional de promotores de genes supresores de tumores, puede ser otro blanco de NuRD para reprimir la expresión génica por modificaciones en la cromatina (Lai, A.Y. & Wade, P.A., 2011). Como ya fue mencionado, estos complejos no participan en procesos independientes. Se necesita que ambos estén presentes (junto con otros complejos, como el Polycomb) para llevar a cabo funciones regulatorias. La pérdida de funciones de alguno de los componentes de estos complejos puede propiciar la expresión aberrante de genes relacionados a la proliferación, EMT, apoptosis, entre otros. Por lo cual, se han propuesto estos componentes como blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer (Bracken, A.P. *et al.*, 2019).

1.4.3.3.1. Alteraciones en SWI/SNF y NuRD en el CaCu

En el CaCu, se han detectado mutaciones en los componentes de los dos complejos SWI/SNF (proteínas BAF) y NuRD (dominio ATPasa CDH3/4) (Mayes, K. *et al.*, 2014), los cuales podrían ser blancos terapéuticos como se ha propuesto para otros tipos de cáncer. Además de estas mutaciones, se ha descrito que la oncoproteína E7 de los VPH de alto riesgo puede modular la actividad de las HDAC1/2 que forman parte del complejo NuRD (Brehm, A. *et al.*, 1999; Gupta, S.M. & Mania-Pramanik, J., 2019). Finalmente, la evidencia indica que los mecanismos aberrantes de metilación del DNA, acetilación de histonas y de complejos remodeladores de la cromatina podrían actuar en conjunto para llevar a cabo el silenciamiento de genes clave, y promover la progresión tumoral.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Liang, M. *et al.* (2008) reportaron que Gal-9 disminuye en tejidos de carcinoma escamoso de cérvix en comparación con biopsias de epitelio escamoso sano. Además, en muestras de pacientes con LIEAG tenían menor expresión de Gal-9 en comparación con muestras de LIEBG. Finalmente se asoció la disminución en el nivel de expresión de Gal-9 con el grado de transformación maligna. Punt, S. *et al.* (2015) reportaron que Gal-9 podría tener un valor pronóstico en pacientes con CaCu, donde hay una tendencia a una mayor supervivencia en pacientes con tumores positivos a Gal-9 en comparación con los pacientes con tumores que no tienen expresión de esta proteína.

Diferentes grupos de investigación han reportado la expresión de ocho variantes de RNAm para el gen *LGALS9*, de acuerdo con los 11 exones que conforman este gen. Gal-9LC es la variante más grande cuyo RNAm presenta los 11 exones, mientras que las Gal-9D5, D5/6, D6, D10, D6/10, D5/10 y D5/6/10 fueron nombradas de acuerdo con los exones de los que carecen (revisión de Hausschen *et al.*, 2013). En relación al CaCu, Máximo-Sánchez, D. (2016) encontró que en líneas celulares de CaCu SiHa, HeLa, C33A y CasKi hay una menor expresión de las variantes de RNAm de *LGALS9*, y menor presencia de las isoformas de la proteína en comparación con la línea celular no tumoral HaCaT de queratinocitos inmortalizados. Estos corresponden a resultados de CaCu *in vitro*, que podrían estar relacionados con los resultados que se han visto en pacientes con este tipo de cáncer.

En reportes sobre la regulación positiva de la expresión de Gal-9, Imaizumi, T. *et al.* (2002) reportaron que la vía de señalización del IFN- γ puede inducir la expresión de Gal-9 en células endoteliales de la vena umbilical. Esto repercute en un reclutamiento de eosinófilos. Por lo cual, Gal-9 estimulada por IFN- γ puede ser parte de la respuesta inmunitaria en este tipo celular. Asakura, H. *et al.* (2002) encontraron que los fibroblastos incubados con IFN- γ presentaban un aumento en la expresión de Gal-9, y que esto provocaba una mayor adhesión de células como eosinófilos, por lo que puede ser parte de la modulación en sitios de inflamación. Por otro lado, se encontró que en esta inducción con IFN- γ en células endoteliales, la proteína HDAC3 funcionaba como un puente entre la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) y el factor de respuesta a interferón (IRF3), permitiendo la fosforilación de IRF3 para translocarse al núcleo e inducir la expresión de Gal-9 (Alam, S. *et al.*, 2011).

Respecto a cambios epigenéticos en el gen *LGALS9* se han reportado dos estudios. En uno de ellos se relacionaron cambios en la metilación de DNA y marcas represivas de

histonas con respecto a la expresión de Gal-9 en cáncer colorrectal (CRC), en una región aproximadamente de 15 kb río arriba del inicio de la transcripción del gen *LGALS9*. Se encontró que en tumores de CRC no había cambios en el estado de metilación o la presencia de las marcas represivas H3K9me3 y H3K27me3 en comparación con tejido sano (Nair, V.S. *et al.*, 2018). Por otro lado, Zhang, L. *et al.* (2019) reportaron cambios en la metilación en el gen *LGALS9* en pacientes con CaCu en una región que se encuentra aproximadamente en 2 kb río abajo del inicio de la transcripción. Sin embargo, las regiones que se analizaron en estos dos estudios no se han caracterizado como reguladoras de la transcripción de *LGALS9*.

Yang, Q. *et al.* (2015) reportaron que la línea celular HepG2 de cáncer de hígado expresa el gen *LGALS9*, y hay presencia de la proteína en comparación con una línea celular control. En un cocultivo con células mononucleares de sangre periférica, se observó que Gal-9 juega un papel en la inducción de apoptosis en linfocitos y en el escape de la respuesta inmunitaria. Por otro lado, miR-22 se encuentra disminuido en esta línea celular. En una transfección de miR-22 en la línea HepG2, se observó la disminución de la expresión de Gal-9 repercutiendo en procesos de apoptosis y proliferación en esta línea celular tumoral, por lo cual, la expresión del gen *LGALS9* puede ser regulada de manera postranscripcional.

Aparicio-Flores, J. (2019) identificó mediante análisis *in silico* la posible región promotora de *LGALS9*, además de identificar los posibles elementos de respuesta tomando desde el residuo -2000 río arriba del inicio de la transcripción. Posteriormente, se confirmó por ensayos *in vitro* que la región ubicada aproximadamente desde -500 río arriba del inicio de la transcripción posee actividad de promotor, por lo que esta región es con la que se trabajó en este proyecto.

En resumen, la expresión de Gal-9 está alterada en diferentes tipos de cáncer incluyendo al CaCu. Algunas evidencias muestran las posibles vías de señalización que regulan la expresión de Gal-9 en otros tipos celulares. Sin embargo, no se ha reportado algún mecanismo por el que Gal-9 disminuya su expresión en el CaCu. Teniendo en cuenta que la expresión de diversos genes puede ser modificada por mecanismos epigenéticos durante la transformación maligna. Es de interés conocer si los cambios de expresión del gen *LGALS9* en CaCu es resultado de mecanismos epigenéticos tales como la metilación del promotor o cambios en la acetilación de histonas adyacentes a dicha región.

3. JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un problema grave de salud pública en México, ocupando el tercer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad por cáncer en la mujer. A pesar de que existen métodos de tamizaje para la detección temprana de la enfermedad, un número importante de casos es detectado en estadios avanzados.

El estudio de diversas proteínas clave en la progresión de procesos tumorales malignos en pacientes con CaCu, como lo es la Gal-9, permitirá ampliar el conocimiento sobre la biología del tumor. Los antecedentes muestran que su expresión en CaCu está asociada a la progresión y el pronóstico de las pacientes. Estudiar si la expresión del gen *LGALS9* es regulada por mecanismos epigenéticos en su región promotora, como la metilación del DNA y las marcas de histonas H3K9ac y H3K14ac (presentes en promotores activos), en este tipo de tumores permitirá profundizar en el conocimiento sobre su regulación, así como en la identificación de posibles biomarcadores tumorales asociados a marcas epigenéticas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gal-9 juega un papel importante en diferentes funciones celulares como: adhesión célula-célula, y célula-MEC, modulación de vías de señalización y transducción de señales, así como en el *splicing*. En el cáncer, las alteraciones en estas funciones repercuten en procesos como apoptosis, migración, metástasis y angiogénesis. Asimismo, se ha reportado la asociación de la baja o nula expresión de Gal-9 con un mal pronóstico en CaCu.

En distintos tipos de cáncer se ha determinado que existen alteraciones en mecanismos epigenéticos, como hipermetilación del DNA y alteraciones en la acetilación de histonas (como la H3) en promotores, relacionadas con el silenciamiento de genes clave como los genes supresores de tumores. Sin embargo, no se conoce si estas alteraciones tienen un efecto sobre la actividad del promotor del gen de *LGALS9* y ejercen un efecto sobre la expresión de Gal-9 en CaCu. Debido a esto, surgen las preguntas:

- ¿Existen modificaciones en la metilación del DNA en el promotor del gen *LGALS9* y en la acetilación de histonas H3 adyacentes a dicha región en líneas celulares y en biopsias de CaCu?
- ¿Las modificaciones epigenéticas estudiadas se relacionan con el nivel de expresión de Gal-9 en las líneas celulares y las biopsias de CaCu?

5. HIPÓTESIS

En líneas celulares y en biopsias de CaCu existe una disminución en la expresión de Gal-9 que está relacionada con un aumento en la metilación del promotor del gen *LGALS9* y una disminución en acetilación de histonas H3 adyacentes a dicha región en.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

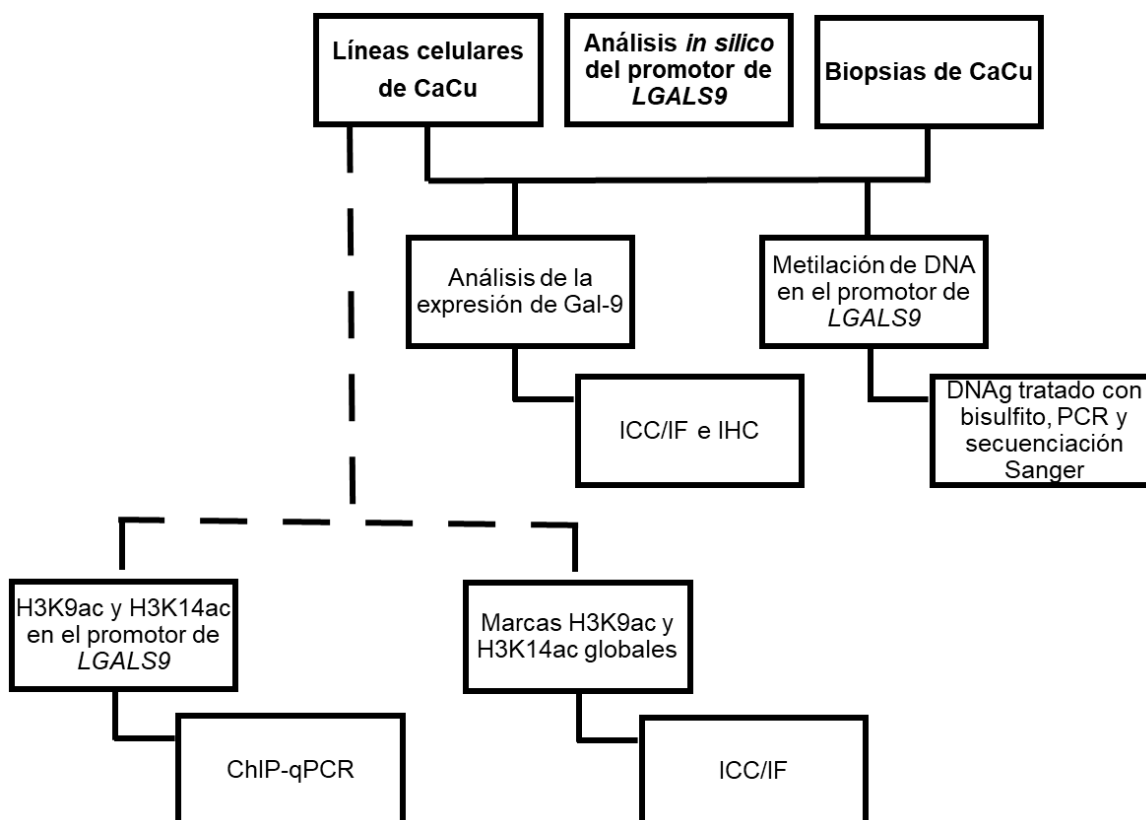
- Determinar modificaciones epigenéticas en el promotor del gen de galectina-9 en células de cáncer de cérvix y relacionarlo con su nivel de expresión

Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* la secuencia de la región promotora de *LGALS9* e identificar posibles sitios CpG para la metilación.
2. Identificar el nivel de expresión y la localización celular de Gal-9 en líneas celulares de CaCu.
3. Determinar el estado de metilación del promotor de *LGALS9* en las líneas celulares y relacionarlo con el nivel de expresión.
4. Determinar la presencia de acetilación en H3K9 y H3K14 adyacentes al promotor de *LGALS9* en las líneas celulares y relacionarla con el nivel de expresión.
5. Identificar el nivel y el patrón de expresión de Gal-9 en biopsias de pacientes con CaCu.
6. Determinar el estado de metilación en el promotor de *LGALS9* en las biopsias y relacionarlo con el nivel de expresión.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Diseño experimental



7.2. Análisis *in silico*

7.2.1. Análisis del promotor de *LGALS9* y determinación de sitios CpG

La identificación *in silico* de la región promotora utilizando la base de datos EPD (Eucaryotic Promoter Database), así como la identificación *in silico* de posibles elementos de respuesta fue reportada previamente por nuestro grupo de investigación (Aparicio-Flores, J., 2019; Caporal-Hernández, L., 2019). La actividad de la región promotora identificada fue confirmada mediante ensayos *in vitro* (Aparicio-Flores, 2019). A partir de la secuencia identificada como promotor de *LGALS9* se identificaron sitios CpG de manera individual. Para detectar presencia de islas CpG en la región promotora del gen *LGALS9* se utilizó la herramienta en línea DBCAT (DataBase of CpG Islands And Analytical Tool; <http://dbcata.cgm.ntu.edu.tw/>). Posteriormente, se utilizó nuevamente el programa EPD para

la identificación de cajas GC las cuales son secuencias potenciales para la metilación del DNA. Por último, se hizo una comparación entre los elementos de respuesta a Sp1 y AP-1 (debido a su relación con la metilación del DNA, como se mencionó previamente), los dinucleótidos CpG y las cajas GC identificadas en este proyecto.

7.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos

Una vez que se determinaron los sitios CpG para el promotor del gen *LGALS9*, se procedió al diseño de oligonucleótidos. Se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos: uno para la amplificación de fragmentos de aproximadamente 200 pb alrededor de los sitios CpG identificados *in silico*, tomando en cuenta las modificaciones que ocurren en el DNA por el tratamiento con bisulfito, como será explicado más adelante; y otro juego de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de aproximadamente 200 pb en diferentes regiones del promotor de *LGALS9*. Para el diseño de oligonucleótidos (Tabla 2), se utilizaron diferentes herramientas en conjunto: OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich® (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>), OligoAnalyzer Tool de IDT™ (Integrated DNA Technologies), y el programa PerlPrimer v1.1.21. En la Fig. 7 se muestra la localización de todos los oligonucleótidos que fueron utilizados para este proyecto, tomando en cuenta la región promotora confirmada para *LGALS9* como fue descrito anteriormente.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificación del promotor de *LGALS9*.

Nombre de oligonucleótido sentido	Secuencia (5' → 3')	Nombre de oligonucleótido antisentido	Secuencia (5' → 3')	Producto (pb)
Set de Oligos para DNA modificado con bisulfito				
PG9ME_F5	GTGTAGAAAATAAGGATGGAGAAGA	PG9ME_R5	CACAACCTAATTCATAACCACCTAAAC	248
PG9ME_F6	GTTTAGGTGGTTATGAATTAGTTGTG	PG9ME_R6	CCTAAACATACTTAACCACAAAATCC	171
PG9ME_F7	GGATTTTGTGGTTAAGTATGTTTAGG	PG9ME_R7	CCAATAACCTTTCCCTCCTCCCTCT	168
PG9ME_F8	AGAGGGAGGAGGGAAAGTTATTGG	PG9ME_R8	CTAAAAACCACTAAAAACCATCTCTCCAC	261
Set de Oligos para DNA no modificado				
PG9Ac_F1	CCAGCCTCTCAAAGACTCCTTCC	PG9Ac_R1	CAGCTTTACTCATCATTGCCCCAG	279
PG9Ac_F6	CATAAAGTTCAGGCGGCCACG	PG9Ac_R6	CTGTGTGTCCTAAGCATGCTTGG	185

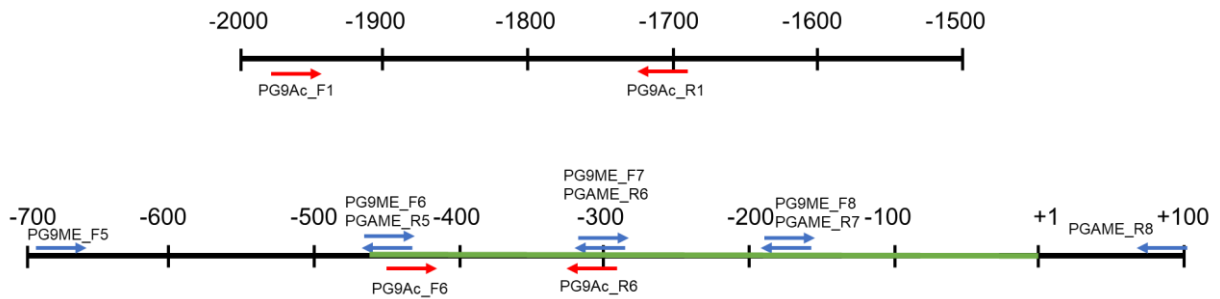


Figura 7. Mapa de ubicación de oligonucleótidos diseñados. Se ubican en regiones río arriba del inicio de la transcripción del gen *LGALS9*. Las flechas en azul representan el juego de oligonucleótidos diseñados para DNA modificado. Las flechas en rojo representan el juego de oligonucleótidos diseñados para DNA no modificado. La región resaltada en verde representa al promotor de *LGALS9* confirmado *in vitro* por nuestro grupo de investigación. Las flechas muestran el sentido con el que fueron diseñados los oligonucleótidos: apuntando a la derecha representan a los sentidos; apuntando a la izquierda, a los antisentido.

7.3. Modelos de estudio

7.3.1. Cultivo celular

Para evaluar la expresión de Gal-9, metilación de DNA y las marcas de acetilación en el promotor de *LGALS9*, se utilizaron líneas celulares derivadas de tumores de CaCu: SiHa (carcinoma escamoso de cérvix, con el genoma del VPH-16 y HeLa (adenocarcinoma, con VPH-18); la línea celular HaCaT (de queratinocitos inmortalizados de humano) fue utilizada como control no relacionada a cáncer. Las líneas celulares C33A (carcinoma escamoso de cérvix, negativo a VPH) y CaSki (carcinoma escamoso de cérvix, con VPH-16) fueron utilizadas únicamente en los ensayos de metilación del DNA. Estas líneas celulares fueron cultivadas con el medio DMEM (Dubecco's Modified Eagle's Medium), a excepción de CaSki que se cultivó con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium). Se adicionó 10% de suero fetal bovino (SFB).

7.3.2. Biopsias de pacientes con CaCu

Se incluyeron 33 biopsias de mujeres con diagnóstico de CaCu, así como 6 biopsias de mujeres con diagnóstico de lesiones premalignas, las cuales se encontraban fijadas en formalina y embebidas en parafina. El rango de edad fue de 18 a 75 años. Las pacientes fueron invitadas a participar y firmaron la carta de consentimiento informado, señalando en ella que aceptaban que su muestra fuera utilizada en proyectos de investigación. Las

muestras se obtuvieron en el Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, UMAE del IMSS, para el proyecto titulado “Expresión de Galectina-9 en cáncer cervicouterino: marcador predictivo de respuesta al tratamiento y supervivencia” con número de registro en la Comisión Nacional de Investigación Científica R-2017-785-119.

7.4. Nivel de expresión y localización celular de Gal-9

7.4.1. Inmunocitoquímica por inmunofluorescencia (ICC/IF)

Para determinar los niveles de expresión y la localización celular de Gal-9 en las líneas celulares (HaCaT, SiHa y HeLa), así como la determinación de marcas globales de acetilación de histonas H3K9ac y H3K14ac, se realizó la técnica de ICC/IF, siguiendo el protocolo de la casa comercial Abcam con algunas modificaciones que se señalan a continuación. Primero, se sembró un total de 40,000 células HaCaT, 20,000 células SiHa y 20,000 células HeLa en diferentes pozos en laminillas con 8 pozos Lab-Tek® Chamber Slide™ system, considerando que en distintos pozos de cada línea celular sembrada se inmunodetectarán: Gal-9, H3K9ac, H3K14ac, y un control de unión inespecífica del anticuerpo secundario. Después de 24 h de incubación, se retiró el medio de cultivo de cada pozo, y cada uno fue lavado tres veces con suficiente PBS 1X estéril (buffer salino de fosfatos: 130 mM de cloruro de sodio, 3 mM de cloruro de magnesio, 8.1 mM de fosfato de sodio, 1.3 mM de fosfato de potasio, a pH 7.2). Posterior a esto, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol al 100 % por 5 min a T.A. (temperatura ambiente); después, se lavaron tres veces más con PBS 1X frío en agitación.

Para el bloqueo de uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se incubó en una solución de BSA (albúmina sérica bovina) al 1% en PBS por 1 h a T.A. Se decantó el exceso de la solución y las células se dejaron incubando a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario contra Gal-9 de la casa comercial Abcam (ab69630) a una dilución de 1:400. Todas las diluciones fueron realizadas con la misma solución con la que se realizó el bloqueo. En el caso del control inespecífico, se dejó la misma solución de bloqueo. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS 1X frío en agitación.

Después, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario (incluyendo al del control inespecífico) por 2 h a T.A., que en este caso fue un anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor® 488 de la casa comercial Abcam (ab150077) a una dilución 1:1000. Se retiró el anticuerpo secundario y cada pozo fue lavado con PBS 1X frío. Para la tinción nuclear, las células fueron incubadas con 0.1 µg/mL de DAPI Stain (Cell Signaling

No. Cat. 4083S) por 1 min. Se retiró la solución y se lavaron con PBS 1X frío. Para montar las laminillas, se retiró la base que separaba los pozos, se colocó suficiente medio de montaje VectaShield® de la casa comercial VectorLabs y se colocó un cubreobjetos. Las laminillas se almacenaron a 4°C.

Para la inmunodetección se capturaron imágenes utilizando un microscopio ZEISS de epifluorescencia, y creando secciones ópticas de fluorescencia con ApoTome.2 en cinco planos focales de las células en estudio. El equipo fue manejado utilizando el programa ZEN 2.6 Lite de ZEISS Microscopy. Se utilizaron los canales específicos para las tinciones con Alexa Fluor 488® y DAPI. Las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia se realizaron mediante el programa ZEN 2.6 Lite. Las unidades de intensidad de fluorescencia para la inmunodetección de Gal-9 fueron normalizadas al restar la intensidad detectada con el control inespecífico.

7.4.2. Inmunohistoquímica (IHC)

Para determinar los niveles de expresión y la localización de Gal-9 en biopsias de CaCu, se utilizó la técnica de IHC. La inmunodetección fue realizada mediante un ensayo colorimétrico. Se utilizaron laminillas de la casa comercial Thermo-Fisher (No. Cat. 2951-001T), tratadas con una solución de APES al 2 % (3-aminopropiltriétoxosilano) de la casa comercial SigmaAldrich®, sumergiéndolas por 1 min en movimiento. Se pasaron a metanol al 100 % y se incubaron 1 min agitando. Posteriormente se lavaron dos veces por 1 min con agua destilada en agitación. Por último, se dejaron secar a 37 °C toda la noche por 24 h. Se realizaron cortes de 4 µm de los bloques de biopsias utilizando el microtomo LEICA RM2155, los cuales se dejaron extender en un baño maría a 40 °C. Posteriormente, se colocaron en las laminillas previamente tratadas con APES.

Después de la colocación de los cortes, las laminillas se dejaron 2 h a 60 °C para fundir la parafina, y rápidamente se realizaron pasos de desparafinación e hidratación de los tejidos: 3 cambios en Xileno por 10 min, 3 cambios en etanol absoluto por 5 min, 2 cambios de etanol al 96 % por 5 min, un cambio de etanol al 80 % por 5 min, y se dejaron en agua destilada. Se realizó un paso de recuperación antigénica, para lo cual se sumergieron las laminillas en buffer de citratos (10 mM de citrato de sodio, pH 6.0) en baño maría a 90 °C durante 15 min. Después, se realizó un bloqueo de peroxidasa endógena utilizando una solución al 0.3 % de peróxido de hidrógeno en PBS por 5 min. Se enjuagaron con PBS 1X, y se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas del anticuerpo primario con

BSA al 1 % en PBS 1X durante 2 h a T.A. Se quitó el exceso de la solución de bloqueo y se realizó una incubación en cámara húmeda a 4 °C toda la noche con el mismo anticuerpo primario contra Gal-9 que se utilizó para las ICC/IF, pero a una dilución de 4 µg/mL (1:250), utilizando la solución de bloqueo como diluyente. En este caso, también se utilizó un control de inespecificidad para cada tejido, el cual se incubó solamente con la solución de bloqueo sin anticuerpo primario.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS 1X, y se dejó una segunda incubación por 1 h T.A. en cámara húmeda con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de la casa comercial Abcam (ab6728) a una dilución 1:1000. Se realizaron nuevamente dos lavados con PBS 1X, y se procedió al revelado de la marca específica. Todas las laminillas se incubaron con DAB (3,3-diaminobenzidina) de Vector SK-4100, donde se observó un cambio de coloración café en las muestras donde se había colocado el anticuerpo primario. Después de 10 min, se retiró el exceso y se realizaron dos lavados con PBS 1X. Rápidamente se pasó a contrateñir con hematoxilina de la casa comercial Merk (No. Cat. 105174) durante 10 s, seguido de un lavado con agua corriente para quitar el exceso del colorante. Se realizaron pasos para deshidratar las muestras: dos cambios con etanol al 96 %, dos cambios con etanol absoluto y dos cambios con xileno; cada cambio consta de 10 inmersiones en cada solución. Al final, se quitó el exceso de solución de cada laminilla, y se colocó el medio de montaje VectaMount de la casa comercial VectorLabs (H-5000).

Cada laminilla fue analizada por microscopía óptica. Además, fueron escaneadas a 200X utilizando el equipo VENTANA DP 200 de Roche. Utilizando el programa ImageViewer MFC del mismo equipo, se identificaron las regiones correspondientes a CaCu, las cuales fueron ajustadas a 100X para la cuantificación de la intensidad de la marca relacionada a la expresión de Gal-9. Estas imágenes fueron analizadas con el programa ImagePro®, donde se seleccionaron cinco áreas de cada imagen y se reveló un valor de intensidad relacionada a la marca de expresión de Gal-9.

7.5. Estado de metilación del DNA en el promotor de *LGALS9*

7.5.1. Aislamiento de DNA total en líneas celulares

Las líneas celulares HaCaT, SiHa, HeLa, CaSki y C33A se cultivaron en placas P100 como fue descrito anteriormente, hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Estas fueron lavadas tres veces con PBS 1X, despegadas con tripsina y resuspendidas en PBS 1X en tubos de

2 mL y se centrifugaron a $\geq 10\ 000$ x g por 10 min a T.A. Del botón de células de cada línea, se realizó el aislamiento de DNA total utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification de la casa comercial Promega. Se agregaron 300 μ L de Nuclei Lysis solution y se resuspendieron hasta deshacer el botón. Posteriormente, se agregaron 3 μ L de RNasa y se mezcló por una leve inversión del tubo. Se realizaron incubaciones de 30 min a 37 °C, y las muestras se dejaron enfriando por 5 min a T.A.

Después, se agregaron 200 μ L de Solución para Precipitar Proteínas a cada tubo y se agitaron en vórtex por 20 s. Se dejaron incubando por 5 min en hielo. Se realizó una centrifugación a $\geq 10\ 000$ x g por 4 min a T.A. Con cuidado, se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo de 1.5 mL. Se agregaron 600 μ L de isopropanol, y se mezcló suavemente por inversión hasta que se vio un cambio de solubilidad del DNA por presencia de un ligero precipitado (hebras de DNA). Los tubos fueron centrifugados a $\geq 10\ 000$ x g por 1 min a T.A. Se decantó el sobrenadante, y se agregaron 600 μ L de etanol al 70 % y se mezcló suavemente el botón para lavar el DNA. Se realizó otra centrifugación a $\geq 10\ 000$ x g por 1 min a T.A. Se retiró el etanol y el botón se dejó secando por 15 min al invertir el tubo. Finalmente, cada botón fue resuspendido en 50 μ L de Solución de rehidratación de DNA. El DNA se cuantificó por nanofotometría con el equipo IMPLEN 360.

7.5.2. Aislamiento de DNA total en biopsias de CaCu

A partir de cada biopsia se realizaron 8 cortes de 10 μ m, y fueron colocados en tubos de 1.5 mL, se agregaron 320 μ L de Solución de desparafinación de QIAGEN y se mezcló en vórtex durante 10 s. Las muestras fueron incubadas a 56 °C por 3 min, y luego se dejaron enfriar a T.A. Posteriormente se utilizó el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue para el aislamiento del DNA total de las biopsias. A cada muestra se agregaron 180 μ L de buffer ATL y se mezcló en vórtex. Se hizo una centrifugación de 11 000 x g por 1 min a T.A. Se agregaron 20 μ L de proteinasa K a la fase clara que se formó después de la primera centrifugación, y se mezcló suavemente por pipeteo. Se hizo una primera incubación a 56 °C por 1 h. Después, otra incubación a 90 °C por 1 h, y después se hizo una corta centrifugación para bajar las posibles gotas que pudieron haber quedado en la tapa. La fase clara (o lisado) se transfiere a un nuevo tubo de 2 mL.

A partir de este punto, se utilizó el equipo QIAcube de QIAGEN. Primero, se programó para que ejecutara el programa de la versión V1 del kit QIAamp® DNA FFPE Tissue a un volumen de elución final de 40 μ L. Los reactivos (buffer AL, etanol absoluto,

buffer AW1, AW2 y ATE), puntas con filtro especiales para QIAcube, muestras y tubos para elución fueron colocados de acuerdo con el protocolo de QIAGEN. El DNA eluido fue cuantificado por nanofotometría.

7.5.3. Verificación de la integridad del DNA aislado

Para verificar la integridad del DNA purificado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed de Sigma-Adrich®, donde se corrieron 100 ng de cada muestra de DNA a 70 V durante 1 h. Al final se observó el gel en un transiluminador. Posterior a esto, se hizo una comprobación del DNA aislado mediante PCR punto final donde se agregaron: 5 µL de Master Mix 2X de Promega®, 1 µL de los oligonucleótidos PG9Ac_F1 y PG9Ac_R1 a 10 µM, un volumen necesario para amplificar 50 ng de DNA, en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 30 s; y una extensión final de 72 °C por 5 min. La amplificación se comprobó corriendo los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed, junto con un marcador de 100 pb, y se observó en un transiluminador.

7.5.4. Tratamiento con bisulfito

Para comprobar el estado de metilación del DNA en el promotor de *LGALS9* se utilizó la técnica de tratamiento de DNA total con bisulfito, para posteriormente realizar amplificaciones por PCR de punto final y secuenciación de Sanger. Para llevar a cabo la reacción con bisulfito se utilizó el kit EZ DNA Methylation-Gold™ Zymo Research. Se tomó lo equivalente a 2 µg de DNA total de cada muestra y se llevó a un volumen final de 20 µL. Después, se agregaron 130 µL del reactivo de conversión CT, y se hicieron las incubaciones en un termociclador: 98 °C por 10 min, 64 °C por 2.5 h, y se almacenaron las muestras a 4 °C por un máximo de 20 h hasta su uso.

Se agregaron 600 µL de buffer M-Binding a la columna Zymo-Spin™ IC en su respectivo tubo colector. Se colocó el volumen correspondiente a la incubación del DNA total con bisulfito en la misma columna, y se mezcló por inversión varias veces. Se hizo un paso de centrifugación a $\geq 10\ 000 \times g$ por 30 s a T.A., y se descargó el desecho del tubo colector. Se hizo un lavado a la columna con el DNA unido con 100 µL de buffer M-Wash centrifugando a $\geq 10\ 000 \times g$ por 30 s a T.A. Después, se agregaron 200 µL de buffer M-Desulphonation a la columna y se dejó reposar por 20 min a T.A., y se procedió a centrifugar

a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s T.A. Para lavar, se agregaron 200 μ L de buffer M-Wash a la columna y se centrifugó a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s T.A. Este paso se repitió una vez más. Para eluir, se añadieron 20 μ L de buffer M-Elution. Las muestras fueron almacenadas a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso.

7.5.5. Amplificación, purificación y secuenciación de productos

Se procedió a la amplificación de productos por PCR punto final, utilizando el juego de oligonucleótidos para DNA modificado que se muestra en la Tabla 2. Estos oligonucleótidos están diseñados para amplificar cuatro fragmentos de la región del promotor confirmado de *LGALS9*. Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera: 12.5 μ L de Master Mix 2X (Promega®), 1 μ L de cada oligonucleótido sentido y antisentido a 10 μ M, 4 μ L del DNA modificado con bisulfito, a un volumen final de 25 μ L con agua estéril libre de nucleasas; finalmente se realizaron cuatro reacciones de cada DNA tratado. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 $^\circ\text{C}$ por 10 min, 40 ciclos de 95 $^\circ\text{C}$ por 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ por 30 s y 72 $^\circ\text{C}$ por 30 s, y 72 $^\circ\text{C}$ por 5 min como extensión final. Se agregó un marcador de 100 pb, y se corrieron 5 μ L de cada reacción en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed, y se corroboró la presencia de las bandas en un transiluminador. Una vez que se comprobó que amplificaron estas bandas, se realizó una reamplificación: 25 μ L de Master Mix 2X (Promega®), 2 μ L de cada oligonucleótido a 10 μ M, 5 μ L de la primera reacción, a un volumen final de 50 μ L. Dicha reamplificación se realizó para obtener mayor cantidad de producto para secuenciación. Se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente para amplificar y para observar las bandas.

Ambas reacciones se juntaron en un solo tubo, y se procedió a la purificación de productos de PCR. Se utilizó el kit QIAquick® PCR Purification de QIAGEN para este procedimiento. Se agregaron 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de producto que se juntó y se mezcló. Se pasó a la columna del kit, y se hizo una centrifugación a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s a T.A., y se descartó el desecho. Para lavar se agregaron 750 μ L de buffer PE a la columna y se centrifugó a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s a T.A., y se descartó el desecho. Para remover el exceso de buffer de lavado, se hizo otra centrifugación a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s a T.A. Se colocó la columna en otro tubo de 1.5 μ L, se le agregaron 20 μ L para elución y se centrifugó a $\geq 10\ 000$ x g por 30 s a T.A. Cada producto fue cuantificado por nanofotometría.

Un total de 250 ng a una concentración de 25 ng/ μ L fueron enviados al servicio de secuenciación en LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad) del Cinvestav. Para la secuenciación, se utilizaron los oligonucleótidos: PG9Me_F5, PG9Me_R6, PG9Me_F7 y PG9Me_R8, según correspondían al producto amplificado de cada muestra. Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa Chromas, y se realizaron los alineamientos múltiples con la herramienta Clustal Omega de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las comparaciones fueron realizadas alineando las secuencias obtenidas con la secuencia consenso del promotor de *LGALS9* obtenida de EPD y de la base de datos Gene del NCBI. Posterior a la identificación de los sitios metilados, se calculó el porcentaje de metilación según los sitios modificados: Número de sitios metilados/Número total de sitios*100.

7.6. H3K9ac y H3K14ac en líneas celulares

7.6.1. Procedimiento del ChIP

7.6.1.1. Curva de sonicación

Para comprobar la presencia de las marcas H3K9ac y H3K14ac en las líneas celulares HaCaT, SiHa y HeLa, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Primeramente, se hizo una curva de sonicación para establecer las condiciones de sonicación que permitan obtener fragmentos de aproximadamente 500 pb para facilitar la inmunoprecipitación. Se probaron tres condiciones diferentes de sonicación. Para esto, se cultivaron cuatro cajas P100 de células HaCaT a una confluencia del 90 % para cada condición, con 15 mL de medio de cultivo en cada caja. Las células fueron fijadas a una concentración final del 1 % de FA (formaldehído) en agua estéril, se mezcló suavemente y se incubó por 10 min a T.A. Después, se utilizaron los reactivos del kit Chromatin Immunoprecipitation plus Sonication de Cell Signaling (No. Cat. 56383). Se agregaron 1.3 mL de solución de glicina 10X a cada placa, se mezclan y se dejan incubar por 5 min a T.A. Se removió el medio y se lavaron las células dos veces con suficiente PBS 1X frío. Se agregaron 500 μ L de PBS+PIC a 1X (coctel de inhibidor de proteasas) en frío a cada placa, se rasparon las células y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL; tomando en cuenta las cuatro cajas de HaCaT, al final se obtuvo una muestra de aproximadamente 2 mL en tubos cónicos de 15 mL. Las células fijadas se centrifugaron a 1000 x g por 5 min a 4 °C. Después se removió el PBS, y se resuspendieron en 1 mL de buffer de lisis celular de sonicación para ChIP 1X + PIC. Se incubaron en hielo por 10 min, y se hizo otra centrifugación a 5 000

x g por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL del mismo buffer, y las células fueron incubadas en hielo por 5 min. Se centrifugó a 5 000 x g por 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de buffer de lisis nuclear para ChIP. Se incubaron en hielo por 10 min, y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL.

Se procedió a la curva de sonicación probando las tres condiciones: 6 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF, 8 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF, y ciclos de sonicación de 8 min de 1"ON/1"OFF. Después, las muestras fueron sometidas a una centrifugación de 21,000 x g por 10 min a 4 °C para eliminar los posibles desechos celulares ajenos a la cromatina que se quiere recuperar. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL; se transfirieron 50 µL del sonificado a un nuevo tubo de 1.5 mL y lo demás fue almacenado a -80 °C. A los últimos 50 µL se les agregó 100 µL de agua estéril libre de nucleasas, 6 µL de cloruro de sodio 5 M y 2 µL de RNAsa incluido en el kit. Se mezcló en vórtex y se hizo una incubación a 37 °C por 30 min. Pasado el tiempo, se agregaron 2 µL de proteinasa K, se mezcló con vórtex y se incubó a 65 °C por 2 h. Se procedió a realizar la purificación del DNA. Se agregaron 750 µL de buffer de unión a DNA a la muestra y se mezcló en vórtex. Se transfirieron 450 µL de cada muestra a la columna proporcionada por el kit y se hizo una centrifugación de 11,000 x g por 30 segundos a T.A., después se agregó el resto de la muestra y se repitió la centrifugación. Se eliminó el desecho de la columna y se lavó con 750 µL de buffer de lavado de DNA, para después centrifugar nuevamente a 11 000 x g por 30 segundos; para eliminar el exceso de buffer de lavado, se repitió la centrifugación. Se descartó el tubo colector, y se colocó un tubo estéril de 1.5 mL. Se agregaron 50 µL de buffer de elución para DNA. Del eluido, se tomaron 10 µL y se corrieron en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed, junto con el marcador de 100 pb, y se observó el gel en un transiluminador. De esta manera se comprobó si los fragmentos se encontraban del tamaño adecuado.

7.6.1.2. ChIP

Una vez que se encontró el tamaño adecuado de los fragmentos de cromatina (8 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF), se procedió a realizar el ensayo del ChIP. Para realizarlo, se repitió la metodología descrita para la curva de sonicación, pero ahora con las tres líneas celulares: HaCaT, SiHa y HeLa. Después de verificar el tamaño adecuado del sonificado, se hizo una cuantificación por nanofotometría. Con este valor se calculó la cantidad de cromatina total de forma indirecta, después de aislar el DNA. Para cada ensayo se utilizaron

5 µg de cromatina. En este paso se utilizaron los siguientes anticuerpos: contra H3K9ac de la casa comercial Cell Signaling (No. Cat. 9649); H3K14ac de la casa comercial Cell Signaling (No. Cat. 7627); contra la histona H3 (No. Cat. 4620) como control positivo; y un anticuerpo IgG normal de conejo como control negativo o mock (No. Cat. 2729). Finalmente, se hicieron las siguientes IPs: H3K9ac y H3K14ac para HaCaT, SiHa y HeLa; control positivo y negativo en una de las líneas celulares al azar. Considerando esto, se separó el volumen correspondiente a 5 µg de cromatina en diferentes tubos de cada línea celular y se llevó a un volumen final de 500 µL con buffer ChIP 1X + PIC. En este punto, se separaron 10 µL de la cromatina diluida de cada línea celular en tubos de 1.5 mL, y se almacenaron a -20°C; este separado es un control para calcular cromatina total, y se denominará como "input 2 %". A cada IP correspondiente se le agregaron: 10 µL anti-H3K9ac, 10 µL de anti-H3K14ac, 10 µL de anti-H3 y 2 µL de IgG normal de conejo. Se dejaron incubando a 4 °C en agitación toda la noche.

Al día siguiente, las perlas magnéticas grado ChIP con proteína G acoplada se resuspendieron en vórtex, y rápidamente se agregaron 30 µL a cada tubo de reacción incubando por 2 h en rotación a 4 °C. Las perlas magnéticas fueron precipitadas en un separador magnético (Magnetic Separation Rack de Cell Signaling). Se esperó 1 min para aclarar la solución y se removió el sobrenadante. Las perlas fueron lavadas agregando 1 mL de buffer de lavado de baja sal y se incubaron a 4 °C por 5 min en agitación. Se repitió el paso de recuperación para eliminar el sobrenadante, y se hicieron un total de tres lavados. Después, se agregó a las perlas 1 mL de buffer de lavado de alta sal y se hizo una incubación a 4 °C por 5 min. Se separaron las perlas como se explicó anteriormente, y se pasaron rápidamente al paso de elución.

Se añadieron 150 µL del buffer de elución para ChIP a los controles input 2 %, y se dejaron a T.A.; igual se agregaron 150 µL del mismo buffer a todos los tubos de IP. Estos se sometieron a elución después de incubarse por 30 min a 65 °C en vórtex leve utilizando un thermomixer. Se centrifugaron todos los tubos a 10,000 x g por 10 s a T.A. para remover el vapor de la tapa de los microtubos. Se precipitaron las perlas con el separador magnético, y la cromatina eluida (sobrenadante) fue transferida a un nuevo tubo. A todos los tubos, incluyendo a los controles input, se les agregaron 6 µL de NaCl 5 M y 2 µL de proteinasa K. Se dejaron incubando 2 h a 65 °C. Se procedió a la purificación del DNA por columna, como fue descrito anteriormente en el apartado 7.5.1.

7.6.1.3. Cuantificación por qPCR

Para cuantificar las marcas de acetilación H3K9 y H3K14 adyacentes al promotor del gen de *LGALS9* en las tres líneas celulares, se procedió como se menciona a continuación. Previo a la cuantificación, se realizó una curva estándar con los oligonucleótidos PG9Ac_F6 y PG9Ac_R6. Cada reacción para qPCR fue preparada de la siguiente manera: 5 μ L de SYBR Green Master Mix de Thermo-Fisher, 1 μ L de cada oligonucleótido a una concentración de 1 μ M, 1 μ L de plantilla, a un volumen final de 10 μ L. La curva estándar se hizo con diluciones seriadas a partir de cualquier input 2 % al azar: Input sin diluir, y diluciones 1:5, 1:25, 1:125; una reacción con las IP del control positivo y negativo; así como un control sin plantilla (NTC) como control de contaminación. Cada reacción fue preparada por triplicado. Las reacciones fueron amplificadas con el equipo StepOne™ system de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 30 s; y una extensión final de a 72 °C por 5 min, con una curva de disociación de 60 °C hasta 95 °C para comprobar un único producto. A partir de los ciclos umbral (CT) se calculó la curva estándar y la eficiencia de reacción.

Una vez comprobada la eficiencia, se realizó la cuantificación de la presencia de las marcas. Se realizó por triplicado cada reacción: H3K9ac, H3K14ac e Input 2 % de HaCaT, SiHa y HeLa; H3, IgG y NTC. Al obtener los valores de CT, se utilizó la siguiente fórmula para la cuantificación: $2\% \times 2^{(CT \text{ del input } 2\% - CT \text{ de cada IP})}$. Todas las reacciones se hicieron por triplicado, y se realizaron tres ensayos de cuantificación para la validación de los resultados.

7.6.2. H3K9ac y H3K14ac globales en líneas celulares por inmunfluorescencia

Los niveles globales de H3K9ac y H3K14ac se determinaron en las líneas HaCaT, SiHa y HeLa por la técnica ICC/IF como se describió anteriormente para el análisis de expresión de Gal-9 en líneas celulares. En este caso, se utilizaron los mismos anticuerpos anti-H3K9ac y anti-H3K14ac que fueron utilizados en el ChIP. Los dos anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:400 con la solución de bloqueo. Se utilizó el mismo anticuerpo secundario que se mencionó para evaluar la expresión de Gal-9 en líneas celulares. De igual manera que en el caso de Gal-9, se cuantificó la intensidad de las marcas.

7.7. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía con Tukey post-hoc test para evidenciar diferencias en: la expresión de Gal-9 en las líneas celulares; la presencia de H3K9ac y H3K14ac en el promotor de *LGALS9*; y las marcas globales de H3K9ac y H3K14ac en las líneas celulares. Para los análisis estadísticos de la expresión de Gal-9 en tejidos de CaCu, se utilizó Mann-Whitney (equivalente a la t de Student en la estadística no paramétrica). Para determinar diferencias en el estado de metilación en diferentes grupos separados, se utilizó la prueba Chi-square for tren. Por último, se calculó la correlación de r de Spearman para evidenciar la correlación entre el % de metilación y la expresión de Gal-9. Las pruebas estadísticas y los gráficos fueron obtenidos con el programa Prism v.5 de GraphPad.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN I: Resultados de análisis *in silico*

8.1. Sitios CpG en el promotor de *LGALS9*

Para la identificación de islas CpG se tomó la región de -2000 pb del inicio de la transcripción que incluye al promotor de *LGALS9* (Fig. 8). Los resultados obtenidos de la DBCAT demostraron que no hay presencia de islas CpG que cumplan con las características clásicas: 50 % o más de sitios CpG en una región de al menos 200 pb. Como ya fue mencionado anteriormente, aproximadamente del 60 % de los promotores en una célula eucariota cumple con las características mínimas determinantes para considerar a una isla CpG (Antequera, F., 2003; Su, Z. *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Weber, M. *et al.* (2007) se encontró que los promotores pueden ser clasificados según el contenido de sitios CpG, en: promotor con CpG alto (HCP), promotor con CpG intermedio (ICP) y promotor de CpG bajo (LCP). Como el nombre de la clasificación lo sugiere, existen promotores que no contienen una cantidad alta de sitios CpG. Por otro lado, en el mismo estudio se describió que los genes transcripcionalmente activos tienen presente en su región promotora la marca H3K4me2 y que esto está relacionado con la activación transcripcional del gen. En otro estudio se determinó que por lo general los genes constitutivos (o *housekeeping*) son HCP, y normalmente las islas CpG de estos genes se encuentran inactivas (es decir, no metiladas); mientras que los genes con promotores con ICP y LPC en su mayoría pueden clasificarse como inducibles o tejido-específicos (Zhang, L. *et al.*, 2020). Gal-9 es una proteína que modifica su nivel de expresión en diferentes tipos de cáncer (Thijssen, V.L. *et al.*, 2015), que puede ser modificada durante la modulación de la respuesta inmune (Liang, C.-C. *et al.*, 2018; Zhu, C. *et al.*, 2005) lo que sugiere que el gen *LGALS9* es inducible.

La base de datos EPD mostró una región ubicada entre las posiciones -50 y +10 del gen *LGALS9* como posible *core* del promotor de este gen, es decir, la región mínima necesaria para formar el complejo de inicio de la transcripción (Danino, Y.M. *et al.*, 2015). Debido a que los resultados mostrados por Aparicio-Flores (2019) indican que hay actividad de promotor desde aproximadamente la posición -500 pb, y a los reportes que indican que hay presencia de elementos reguladores de la transcripción génica río arriba del *core* de los promotores (Haberle, V. & Stark, A., 2018), se optó por tomar desde -500 y +50 pb para los posteriores análisis. Por lo tanto, la presencia de dinucleótidos CpG se identificaron en las posiciones: -477, -471, -394, -333, -81, -23, +21 y +36 (Fig. 8). Además, se ha reportado que las cajas GC pueden ser sitios susceptibles a la metilación cuando poseen

dinucleótidos CpG (Miyajima, A. *et al.*, 2009). Por lo tanto, mediante la base de datos EPD se identificaron cajas GC en las posiciones: -447, -400, -289, -206, -189, -163, +17, +35. Adicionalmente, se revisaron los posibles elementos de respuesta reportados por Aparicio-Flores, J. (2019) para identificar si algunos de ellos se sobreponían con los sitios CpG identificados (Fig. 8).

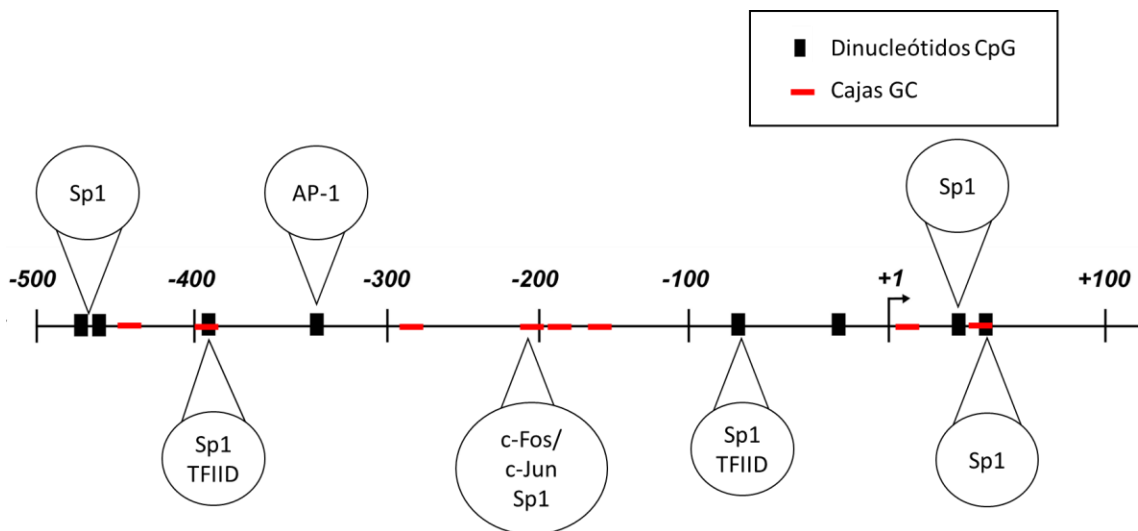


Figura 8. Esquema de sitios CpG susceptibles a metilación del DNA en el promotor de *LGALS9*. En este esquema se muestran los resultados *in silico* de una región que comprende desde -500 a +100 pb del gen *LGALS9*, como posible promotor de este gen. Se encontraron sitios CpG en las posiciones: -477, -471, -394, -333, -81, -23, +21 y +36. Se identificaron cajas GC en las posiciones: -447, -400, -289, -206, -189, -163, +17, +35. A su vez, se observó que estos sitios coinciden con elementos de respuesta a los factores de transcripción Sp1 y AP-1, así como la secuencia consenso para unión del TFIID.

Como se puede apreciar en la Fig. 8, se encuentran elementos de respuesta para los FT: AP-1 (dímero de c-Fos/c-Jun) y Sp1. Para Sp1 existen diversos reportes donde se indica que la metilación del DNA podría impedir la unión de este FT a su elemento de respuesta. En un primer reporte, Macleod, D. *et al.* (1994) muestran que Sp1 se une a su elemento de respuesta en el promotor del gen *APRT* de ratón, para prevenir la metilación del DNA en islas CpG; una delección o mutagénesis de los sitios de unión a Sp1 promueve la metilación *de novo* en las islas CpG. En otro reporte Zhu, W.-G. *et al.* (2003) encontraron que en el promotor del gen que codifica para la proteína p21, la metilación en los elementos de respuesta a Sp1/Sp3 no interfiere con la capacidad de unión del FT al DNA, sin embargo,

la presencia de metilación en regiones de los extremos del sitio de unión de Sp1/Sp3 impide dicha interacción, esto realizado en la línea celular H719 de cáncer de pulmón. A su vez, Liu, X. *et al.* (2016) encontraron que en el promotor del gen *CRYAA*, que codifica para la proteína estructural α -cristalina del epitelio ocular, la hipermetilación del DNA impide la capacidad de unión de Sp1, y no se lleva a cabo la activación transcripcional del gen. Nuestros resultados muestran que existen al menos cuatro elementos de respuesta a Sp1 en el promotor, que pudieran ser claves en la regulación de la transcripción de *LGALS9*.

En cuanto a AP-1, se observaron dos posibles sitios de unión: uno ubicado en la posición -333 pb de un sitio CpG, y otro en la posición -206 pb donde se encuentra una caja GC. Al analizar esta secuencia, a pesar de haber encontrado una caja GC mediante la base de datos, no se observa algún dinucleótido CpG por lo que se esperaría que no hubiera metilación en este sitio. Sin embargo, en una revisión de Yang, J. *et al.* (2019) se menciona que en dinucleótidos TpG pueden ocurrir sustituciones que al final se identificarían como CpG, formando así un sitio de reconocimiento por las DNMTs. Por lo cual, un complejo AP-1 podría unirse a este dinucleótido en presencia o ausencia de metilación. Por otro lado, se ha reportado que el complejo c-Fos/c-Jun (AP-1) puede unirse a sitios CpG en presencia o ausencia de metilación, ejerciendo un efecto activador (Gustems, M. *et al.*, 2014). Además, se ha descrito que AP-1 es importante en procesos para la diferenciación de monocitos o en la reprogramación de células pluripotentes en ratones. Mediante ensayos de cromatina accesible a transposasa (ATAC-seq) y CHIP-seq para determinar marcas activadoras como H3K27ac se ha identificado que este FT puede unirse a potenciadores (*enhancers*) de genes de respuesta tardía y de identidad celular, lo cual es importante en procesos de diferenciación y reprogramación (Madrigal, P. & Alasoo, K., 2018); esto también se ha estudiado en otros tipos de cáncer, como el pancreático (Roe, J.-S. *et al.*, 2017). El estudio de AP-1 podría ser de importancia para el estudio de la progresión del cáncer.

SECCIÓN II: Resultados en líneas celulares de CaCu

8.2. Nivel y patrón de expresión de Gal-9 en líneas celulares de CaCu

Los resultados previos del grupo de investigación revelaron que los niveles de RNAm de *LGALS9* por qPCR, así como la presencia de la proteína por WB (*Western blot*), son menores en las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C33A (tumorales) con respecto a la línea celular HaCaT (no tumoral) (Máximo-Sánchez, 2016). En este trabajo se evaluó la expresión de Gal-9 mediante ensayos de ICC/IF en las líneas celulares HaCaT, SiHa (carcinoma escamoso de cérvix) y HeLa (adenocarcinoma) que nos permite observar la localización intracelular y los niveles de expresión de la proteína de Gal-9 en las tres líneas celulares. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia permitió comparar con los niveles de proteína identificados por WB. La Fig. 9 muestra los resultados para estas dos cuestiones.

En la Fig. 9A, se muestran los resultados obtenidos en las células HaCaT en las que la presencia de Gal-9 se observa tanto en el citoplasma como en el núcleo, observándose una mayor señal de la proteína en el núcleo. Respecto a las células SiHa, la presencia de Gal-9 es prácticamente indetectable, observándose de manera muy tenue en algunas regiones de los núcleos. Por último, en la línea celular HeLa los resultados muestran la intensidad de la marca de Gal-9 es menor que en HaCaT, la presencia de la proteína se observa solo en los núcleos y no en el citoplasma, además de que la presencia de la proteína se observa como un puntillero muy intenso. En la Fig. 9B se muestran los resultados de la cuantificación de la intensidad en unidades normalizadas de fluorescencia para Gal-9; la expresión de la proteína es mayor en las células HaCaT que en las SiHa y HeLa, como lo reportó Máximo-Sánchez, D. (2016) en los ensayos de western blot.

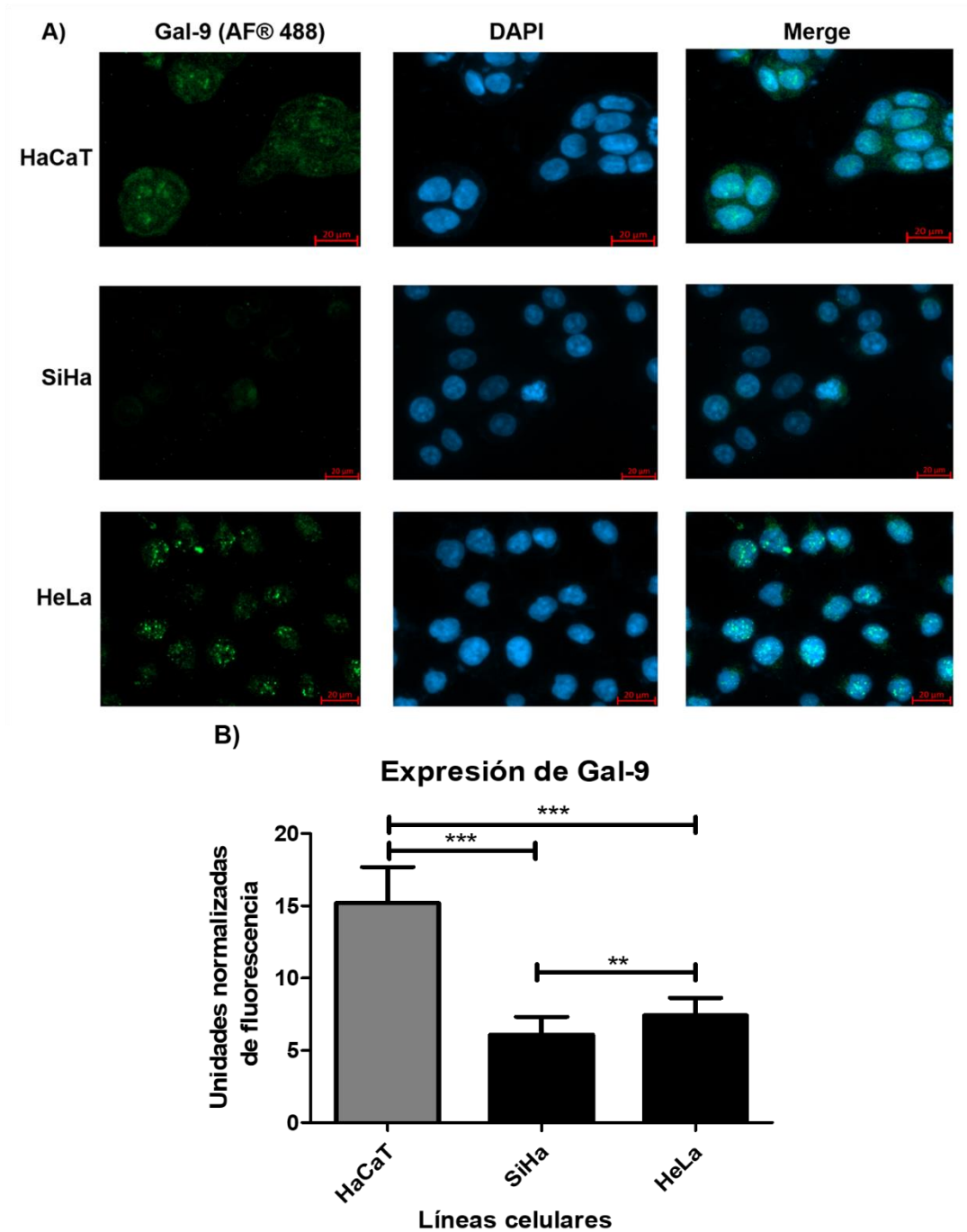


Figura 9. Expresión de Gal-9 en las líneas celulares HaCaT, SiHa y HeLa. A) Imágenes de ICC/IF donde se muestra la expresión de Gal-9 (marcas en verde), una tinción con DAPI para núcleos (en azul), y una sobreposición (indicado como “Merge”). Barra de escala a 20 μm . B) Resultados de la cuantificación de la expresión de Gal-9 donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (ANOVA de una vía, Tukey post-hoc test, $P < 0.05$).

Se han descrito diversas funciones para Gal-9, las cuales dependen de su ubicación: matriz extracelular, citoplasma y núcleo. En la línea celular HaCaT se ve una fuerte expresión en el citoplasma, y podría encontrarse también en la membrana celular. La localización celular de Gal-9 está relacionada con las funciones que desempeña, en cuanto a sus funciones extracelulares, se ha descrito que Gal-9 es capaz de reconocer estructuras glicánicas en la superficie celular y ejercer un rol importante en procesos de adhesión celular (Heusschen, R. *et al.*, 2013; Yang, R.-Y. *et al.*, 2008). Otro papel importante de Gal-9 es en la modulación de vías de señalización en algunos tipos celulares al interactuar con receptores de membrana (Kobayashi, T. *et al.*, 2010; Tanikawa, R. *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no ha sido aún estudiado en las líneas celulares derivadas de CaCu. Las células HaCaT que crecen en cúmulos expresan Gal-9, sugiriendo que la proteína está participando en estos procesos de adhesión celular. Lo contrario se observa en células SiHa y HeLa que tienden a crecer de manera aislada y la expresión de Gal-9 se limita solamente al núcleo. Por lo tanto, se podría pensar que no juega un papel en la adhesión celular en estos tipos celulares.

Con respecto a las funciones intracelulares, hay algunos reportes que indican el papel de las galectinas en el citoplasma. Pueden modular: crecimiento celular, apoptosis y progresión del ciclo celular (Liu, F.-T. & Rabinovich, G.A., 2005), a partir de la unión de las galectinas con proteínas que se encargan de regular estos procesos (Liu, F.-T. *et al.*, 2002; Wang, J.L. *et al.*, 2004). Para Gal-9 hay algunos que muestran que pueden modular apoptosis en otros tipos celulares, como en linfocitos T (Kashio, Y. *et al.*, 2003) y en fibroblastos en un modelo de artritis reumatoide (Pearson, M.J. *et al.*, 2018). Esto puede relacionarse con lo que se observó en células HaCaT: Gal-9 podría estar presente en el citoplasma participando en la regulación de estos procesos que se acaban de mencionar. En contraste, en las líneas celulares SiHa y HeLa, es posible que la pérdida del control del ciclo celular y de la regulación de la apoptosis que caracterizan a las células tumorales esté relacionada con la pérdida de expresión de Gal-9 en el citoplasma. En cuanto a las funciones nucleares, se ha visto que algunas galectinas tienen un papel en el procesamiento del pre-RNA al interactuar con ribonucleoproteínas que participan en el *splicing* del RNA (Johannes, L. *et al.*, 2018; Leffler, H. *et al.*, 2002), Gal-9 también puede participar en estos mecanismos. Además, Matsuura, A. *et al.* (2009) reportaron que Gal-9 puede interactuar con NF-IL6 (factor nuclear para la expresión de IL-6) al translocarse al núcleo, e inducir la expresión de esta citocina. Posiblemente Gal-9 nuclear cumple funciones en el *splicing* en las células HaCaT, SiHa y HeLa. Es necesario investigar si puede unirse a otro factor además del NF-IL6 para la expresión de los genes.

Adicionalmente, Gal-9 puede participar en el mantenimiento de la rigidez de la membrana plasmática en células dendríticas (Cano, L.Q. *et al.*, 2019), pero no se ha comprobado en otro tipo celular.

Existen otros reportes donde se han estudiado cambios de localización anormales de algunas galectinas en el cáncer. El primer reporte fue realizado por Honjo, Y. *et al.* (2000), quienes reportaron una translocación de Gal-3 del núcleo al citoplasma en pacientes con carcinoma de lengua y está relacionado a un mal pronóstico; de igual forma, esto fue estudiado en melanoma (Brown, E.R. *et al.*, 2012). Los cambios de localización también han sido reportados para Gal-7 en carcinoma de esófago (Zhu, X. *et al.*, 2010). Esto podría estar relacionado con lo observado en las líneas celulares de CaCu, así las células HaCaT presentan un patrón de expresión de Gal-9 en núcleo y citoplasma, mientras que en las SiHa y HeLa solo se observa en el núcleo, pero con una menor expresión. Sin embargo, los estudios que se mencionaron fueron realizados en pacientes con cáncer; se tendría que comprobar que en pacientes con CaCu puede existir también ese cambio de localización.

Los estudios actuales sobre la expresión de Gal-9 en el cáncer se basan en relacionar dicha expresión con diversos factores, como el pronóstico de los pacientes que padecen esta enfermedad. En general, diversos reportes en pacientes indican que la disminución de Gal-9 está relacionada con un mal pronóstico en: cáncer urotelial (Liu, Y. *et al.*, 2017), cáncer gástrico (Jiang, J. *et al.*, 2013), cáncer de mama (Irie, A. *et al.*, 2005), e incluso en CaCu (Liang, M. *et al.*, 2008; Punt, S. *et al.*, 2015). Los experimentos aquí reportados por ICC/IF en células HaCaT, SiHa y HeLa se relacionan con los mostrados previamente en nuestro grupo de investigación, y a la vez lo que se ha reportado para pacientes con CaCu (Liang *et al.*, 2008).

8.3. Estado de metilación en el promotor de *LGALS9* en líneas celulares de CaCu

En la Fig. 10 se representan los resultados obtenidos para el estado de metilación de los sitios CpG del promotor del gen *LGALS9* en las líneas celulares de CaCu (SiHa, HeLa, C33A y CasKi) y HaCaT como control. La metilación se detectó en los sitios ubicados en -394 pb tanto en líneas celulares tumorales como en HaCaT. En la posición +36 pb se detectó presencia de metilación únicamente en células HaCaT y HeLa, además de un sitio CpG metilado en la posición -81 pb en esta última línea celular. Por lo cual, no se encontró un patrón de metilación específico en las líneas celulares tumorales en comparación con la

línea celular control HaCaT. De acuerdo con los antecedentes del grupo de investigación, la línea HaCaT presenta mayores niveles de expresión de Gal-9 en comparación con las líneas celulares tumorales. Considerando ambos resultados, es posible que la metilación en el promotor del gen *LGALS9* no participa en la regulación de su expresión. En los resultados de Nair, V.S. *et al.* (2018) se analiza el patrón de metilación en la región de 15 kb río arriba del inicio de la transcripción de *LGALS9* en CRC. Los resultados mostraron que, en esta región que no ha sido caracterizada como reguladora de la transcripción de Gal-9, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre el nivel de metilación en tumores de CRC en comparación con tejido adyacente en ausencia de células transformadas. Por otra parte, Wu, M.-M. *et al.* (2017) realizaron esta misma técnica en el gen *LGALS4* que codifica para Gal-4, donde amplificaron 15 sitios CpG en esta región promotora en muestras de carcinoma urotelial. Al encontrar diferencias en la metilación en dos de estos sitios, realizaron una PCR metil específica (MS-PCR) y evidenciaron que hay cambios específicos en sitios de metilación relacionados a la progresión tumoral. Se podría aplicar la técnica de MS-PCR para cuantificar los niveles de metilación en los dos residuos del promotor *LGALS9* y evidenciar si la metilación específica es mayor en las líneas celulares tumorales y se relaciona con el nivel de expresión de *LGALS9*.

	Sitios de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i>							
Líneas celulares	-477	-471	-394	-333	-81	-23	+21	+36
HaCaT								
SiHa								
HeLa								
C33A								
CasKi								

Figura 10. Estado de metilación en el promotor de *LGALS9* en líneas celulares de CaCu. Como control no tumoral se utilizó la línea celular HaCaT. Los cuadros en negro representan sitios donde se encontró metilación en CpG. Se observa únicamente presencia de esta modificación en las posiciones -394 pb, -81 pb y +36 pb.

Debido a que no se encontraron diferencias en el número de sitios metilados en las líneas celulares tumorales en comparación con HaCaT, es posible que la regulación de la expresión de *LGALS9* se deba a la unión específica de ciertos FT. Según lo que se muestra en la Fig. 8, estos sitios coinciden con los elementos de respuesta para Sp1. En estos resultados, no se identificaron sitios metilados en los elementos de respuesta a AP-1 como se había sugerido en la Fig. 8. Sp1 es un factor de transcripción que puede unirse a elementos de respuesta en cajas GC, aunque también se ha demostrado cierta afinidad por cajas CT y cajas GT. Está descrito que en las cajas GC pueden encontrarse sitios CpG que pueden ser regulados por la metilación del DNA. Sp1 es un FT que cumple funciones en diferentes procesos celulares en la activación de genes blancos involucrados en procesos relacionados al cáncer: protumorales, al activar genes involucrados en la progresión del ciclo celular, estimulación de la fase S, sobrevivencia celular, angiogénesis, invasión, metástasis, crecimiento celular e inestabilidad genómica; antitumorales, al activar genes involucrados en el arresto del ciclo celular, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, apoptosis y supresión de metástasis. Estas funciones dependen, en parte, de las modificaciones postraduccionales en Sp1 como: fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, glicosilación (O-GlcNAc; N-Acetilglucosamina ligada a oxígeno) y poliADP-ribosilación; y de transactivación con otras proteínas como c-Jun y Ap2 (Wierstra, I., 2008). Hay varios estudios que reportan que la hipermetilación evita la unión de Sp1 a elementos de respuesta. Dong, Z. *et al.* (2019) encontraron en carcinoma escamoso de esófago, que Sp1, se relaciona a la activación transcripcional de los genes supresores de tumores SEMA3B y el RNA largo no codificante (RNAInc) SEMA3B-AS1, sin embargo, en presencia de metilación de los elementos de respuesta a Sp1, hay una baja actividad transcripcional. En un estudio similar en músculo esquelético, se encontró que Sp1, entre otros FT, pueden regular la transcripción del gen *TNNI1* y que la metilación del DNA evita la unión de estos FT (Ji, G.-G. *et al.*, 2019). Es necesario comprobar que este FT se puede unir al promotor de *LGALS9* mediante un ensayo de ChIP.

8.4. Ensayo de ChIP

8.4.1. Curva de sonicación para ChIP

Para el análisis de ChIP es importante obtener los fragmentos de cromatina de tamaño recomendado en un intervalo de 200 y 1000 pb (Lee, J.B. & Keung, A.J., 2018). En la Fig. 11 se observan los fragmentos de cada condición de sonicación, y todos oscilan entre las 200 y 1000 pb. Dado el tamaño requerido para los fragmentos, con el fin de aumentar la

sensibilidad de la precipitación, se optó por utilizar las condiciones de 8 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF, donde se encuentran fragmentos de cromatina de aproximadamente 250 pb (Fig. 11).

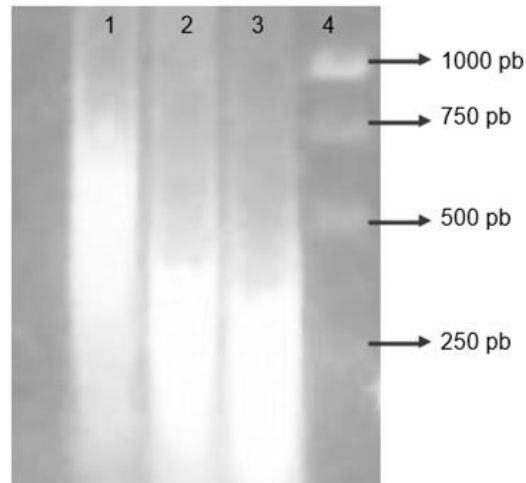


Figura 11. Curva de sonicación. Carril 1: 6 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF. Carril 2: 8 ciclos de sonicación 15"ON/60"OFF. Carril 3: ciclos de sonicación de 8 min de 1"ON/1"OFF. Carril 4: 1 kb Ladder.

8.4.2. H3K9ac en el promotor del gen *LGALS9* y global en líneas celulares

Los resultados del análisis de la acetilación de H3K9 en las líneas celulares se muestran en la figura 12. Los resultados de cuantificación por qPCR de la presencia de H3K9ac en HaCaT, SiHa y HeLa adyacentes al promotor de *LGALS9*, se muestran en la Fig. 12A, donde es evidente que existen bajos niveles de H3K9ac en las líneas celulares tumorales en comparación con la no tumoral. Se ha descrito que H3K9ac es una marca de histonas relacionada a la activación transcripcional, encontrándose predominantemente en regiones promotoras. Esta marca de acetilación está implicada en la activación de una gran variedad de genes, por ejemplo, Takahashi, J.S. (2015) reportó que H3K9ac junto con H3K4me3 y H3K27ac tienen un papel importante en la activación de genes implicados en el ciclo circadiano en mamíferos (Zhu, Q. & Belden, W.J., 2020). Por lo que puede ser un residuo clave en la activación de la transcripción en HaCaT. Por otro lado, se sabe que esta lisina 9 de la H3 también puede ser un sitio para una trimetilación (H3K9me3) y que tiene un papel

represivo de la transcripción cuando se encuentra en promotores, y cuando se encuentra en el cuerpo del gen en compactación de la cromatina, puesto que participa en el reclutamiento de la HP1 (Proteína 1 de la Heterocromatina) (Audia, J.E. & Campbell, R.M., 2016). Debido a la evidencia de la relación entre la marca activadora (acetilación) y la marca represiva (trimetilación) en H3K9me3 (Addison, W.N. *et al.*, 2014; Karmodiya, K. *et al.*, 2012; Wang, B. *et al.*, 2019), es probable que en las líneas tumorales se encuentren estas marcas represivas. Sin embargo, es necesario realizar un ChIP con un anti-H3K9me3 y ver los niveles en estas tres líneas celulares en el promotor del gen *LGALS9*.

Después de verificar el estado de acetilación en H3K9ac del promotor de *LGALS9* y comprobar que esta marca activadora se encuentra disminuida en SiHa y HeLa, en comparación con HaCaT, fue de interés conocer si además se pudiese encontrar afectada esta marca de acetilación de manera global. Por lo tanto, se realizó una ICC/IF de esta marca de manera global. En la figura 12B se muestran las imágenes de la ICC/IF, y en la figura 12C se muestran los resultados de la cuantificación de intensidad de fluorescencia. Las marcas se encuentran exclusivamente en el núcleo en los tres tipos celulares, y de manera semicuantitativa se identificó que HaCaT presenta niveles más altos de H3K9ac global que HeLa y SiHa, respectivamente.

En otros tipos de cáncer se ha identificado que existen alteraciones de las marcas globales de H3K9ac que se relacionan con la progresión de los tumores. Webber, L.P. *et al.* (2017) reportaron que una hipoacetilación en H3K9 se relacionaba a un mal pronóstico en carcinoma oral de células escamosas, y que estos cambios pueden repercutir en procesos como proliferación celular y EMT; una relación similar se encontró en cáncer de ovario (Li, L. *et al.*, 2007; Zhen, L. *et al.*, 2010) y cáncer de mama (Judes, G. *et al.*, 2016). La disminución de H3K9ac global en células SiHa y HeLa sugiere una relación con los estudios mencionados previamente donde reportan el mismo cambio. Sin embargo, en estudios realizados en CaCu se identificó que en los pacientes con peor pronóstico hay un aumento de H3K9ac global (Beyer, S. *et al.*, 2017). Es posible que la diferencia sea debido a las diferencias del modelo utilizado en este estudio con el utilizado por Beyer *et al.* (2017).

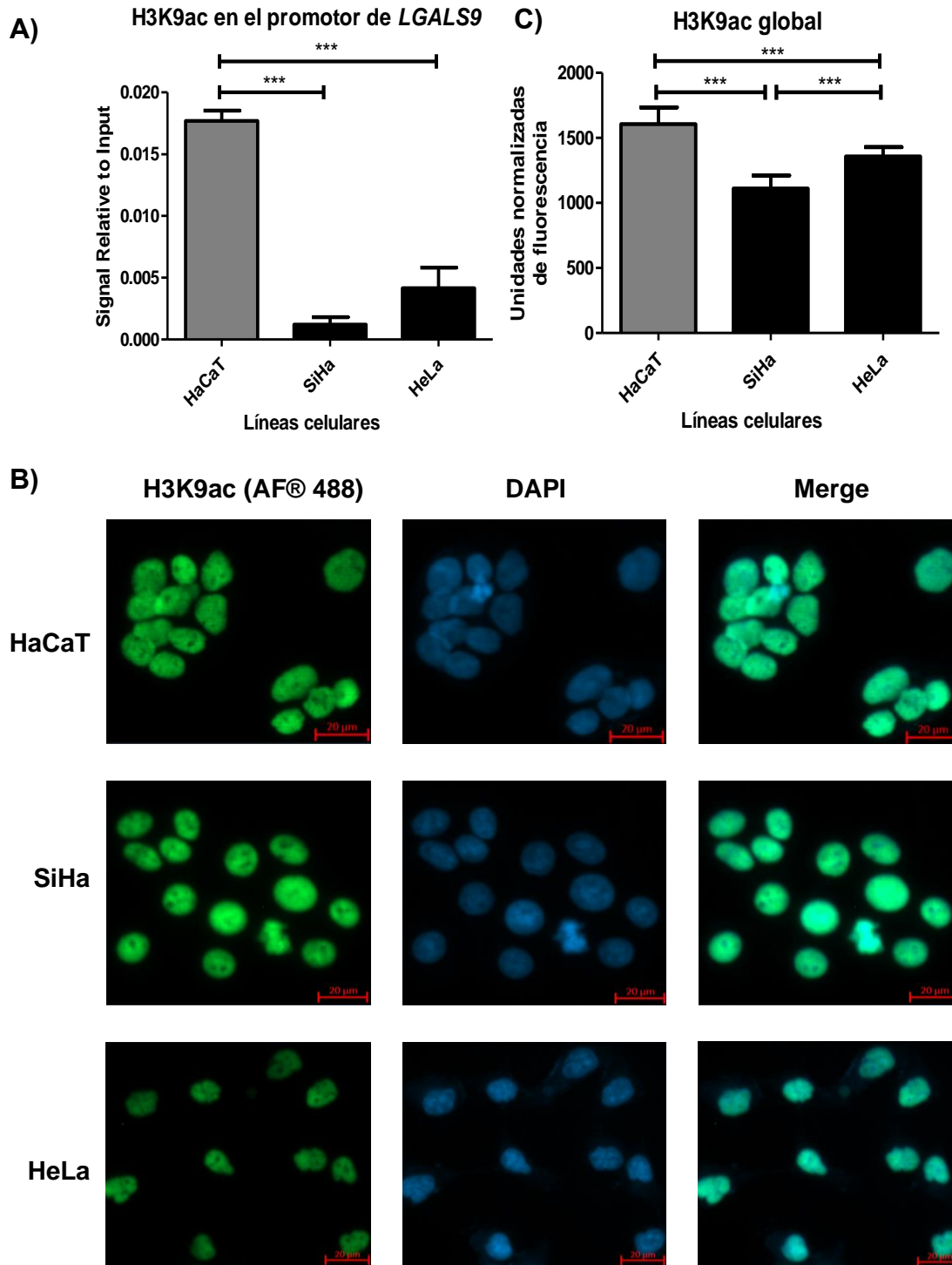


Figura 12. Estado de acetilación H3K9ac. A) Modificación H3K9ac específica adyacente al promotor de *LGALS9* por ChIP, donde se indica mayor acetilación en HaCaT. B) Imágenes de ICC/IF de H3K9ac global (marcas en verde) en HaCaT, SiHa y HeLa, tinción nuclear con DAPI (marcas en azul) y sobreposición de ambas (merge). Barra de escala a 20 μm C) Cuantificación de la intensidad de la marca H3K9ac, la cual es mayor en HaCaT, seguido de HeLa y SiHa, con diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, Tukey post-hoc test, $P < 0.05$).

En ambos casos, las células SiHa y HeLa presentaron disminución en H3K9ac en comparación con las HaCaT. Como se describió en apartados anteriores, las modificaciones de acetilación son llevadas a cabo por dos familias de enzimas: HATs y HDACs. H3K9ac es una marca que se ha descrito que puede ser regulada por vías de señalización como NF- κ B y TNF al activar a las HATs encargadas de esta modificación (Wang, B. *et al.*, 2019); pero a la vez se ha reportado que la desregulación de otras vías de señalización como Ras-ERK1/2 pueden contribuir al desarrollo de CRC por la modulación de H3K9ac al degradar a la enzima PCAF encargada de esta acetilación (Tian, P. *et al.*, 2018), así como también se ha reportado en carcinoma hepatocelular (Zeng, S. *et al.*, 2017; Zhang, T. *et al.*, 2017). En CaCu, la oncoproteína E7 de VPH de alto riesgo puede alterar la actividad de la enzima PCAF, pudiendo llevarla a degradación (Avvakumov, N. *et al.*, 2003; Durzynska, J. *et al.*, 2017; Huang, S.-M. & McCance, D., 2002); además de tener la capacidad de interactuar con las HDAC1 y 2, componentes del complejo NuRD modulando la actividad del mismo (Brehm, A. *et al.*, 1999). Debido a la relación que hay entre las desregulaciones de HATs y HDACs en el cáncer, es probable que éstas influyan en las alteraciones que se encontraron en este estudio.

8.4.3. Acetilación H3K14ac en el promotor del gen *LGALS9* y global en líneas celulares

Los resultados del análisis de H3K14ac en las líneas celulares se muestran en la Fig. 13. En la Fig. 13A se grafica la cuantificación por qPCR de la presencia de H3K14ac en células HaCaT, SiHa y HeLa en el promotor de *LGALS9*, donde es evidente que existen bajos niveles de acetilación H3K14ac en las líneas celulares tumorales en comparación con la no tumoral. H3K14ac es una marca de acetilación de suma importancia para la transcripción de los genes. Se ha determinado que la presencia de H3K14ac junto con H3K9ac y H3S10pho en regiones promotoras, es importante para el reclutamiento del complejo TFIID (van Nuland, R. *et al.*, 2013), así como del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF por la modificación H4K8ac (Agalioti, T. *et al.*, 2002). La regulación de H3K14ac es importante también para la inducción de la expresión de diversos genes relacionados a estrés (Johnsson, A. *et al.*, 2009), e incluso es importante en la activación de las funciones supresoras de tumores de PBRM1 (Polybromo1) al reconocer esta marca en carcinoma de riñón (Liao, L. *et al.*, 2019). En resumen, esta marca es activadora para la transcripción génica, y debido a que se encuentra disminuida en el promotor de *LGALS9* en las líneas

celulares tumorales SiHa y HeLa, es posible que esté relacionada con la disminución de la expresión de Gal-9.

Al igual que se hizo con la marca global H3K9ac en el apartado anterior, también fue de interés evaluar el estado de acetilación H3K14ac global en las células SiHa y HeLa en comparación con las HaCaT mediante ICC/IF. En la Fig. 13B se muestran las imágenes obtenidas, y en la Fig. 13C, los resultados de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia. En este caso, las células SiHa presentaron niveles más bajos del estado global de H3K14ac en comparación con las HaCaT; por otro lado, HeLa fue la línea celular que tuvo mayor presencia de esta marca global. A diferencia de H3K9ac, solamente hay un reporte donde se evaluó la marca global de H3K14ac en cáncer de ovario, quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el cáncer en comparación con células no tumorales (Zhen, L. *et al.*, 2010). Tampoco se conocen mecanismos por los que H3K14ac puede encontrarse alterado. Sin embargo, Li, Y. *et al.* (2019) reportaron que la vía de señalización Ras-ERK1/2 puede modular la disminución global de H3K14ac indirectamente, ya que se promueve la degradación de la HAT TIP60 en melanoma intraocular. No se ha descrito hasta ahora si las vías de señalización desreguladas en CaCu pueden alterar enzimas encargadas de llevar a cabo esta marca, pero existe evidencia de que las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo pueden alterar la actividad de las enzimas p300/CBP (Patel, D. *et al.*, 1999; Thomas, M.C. & Chiang, C.-M., 2005; Zimmermann, H. *et al.*, 1999), TIP60 (Jha, S. *et al.*, 2010; Subbaiah, V.K. *et al.*, 2016) y PCAF (Avvakumov, N. *et al.*, 2003; Huang, S.-M. & McCance, D., 2002), que pueden acetilar a H3K14. Estos antecedentes podrían explicar la disminución global de H3K14ac en células SiHa. En los resultados de células HeLa no se refleja en la disminución que se encontró en las células SiHa. Ambas pertenecen a tipos celulares diferentes: SiHa son células de carcinoma escamoso, y HeLa, de adenocarcinoma de cérvix. Así, a pesar de que ambas son células cancerosas, diferencias moleculares (Network, C.G.A.R., 2017).

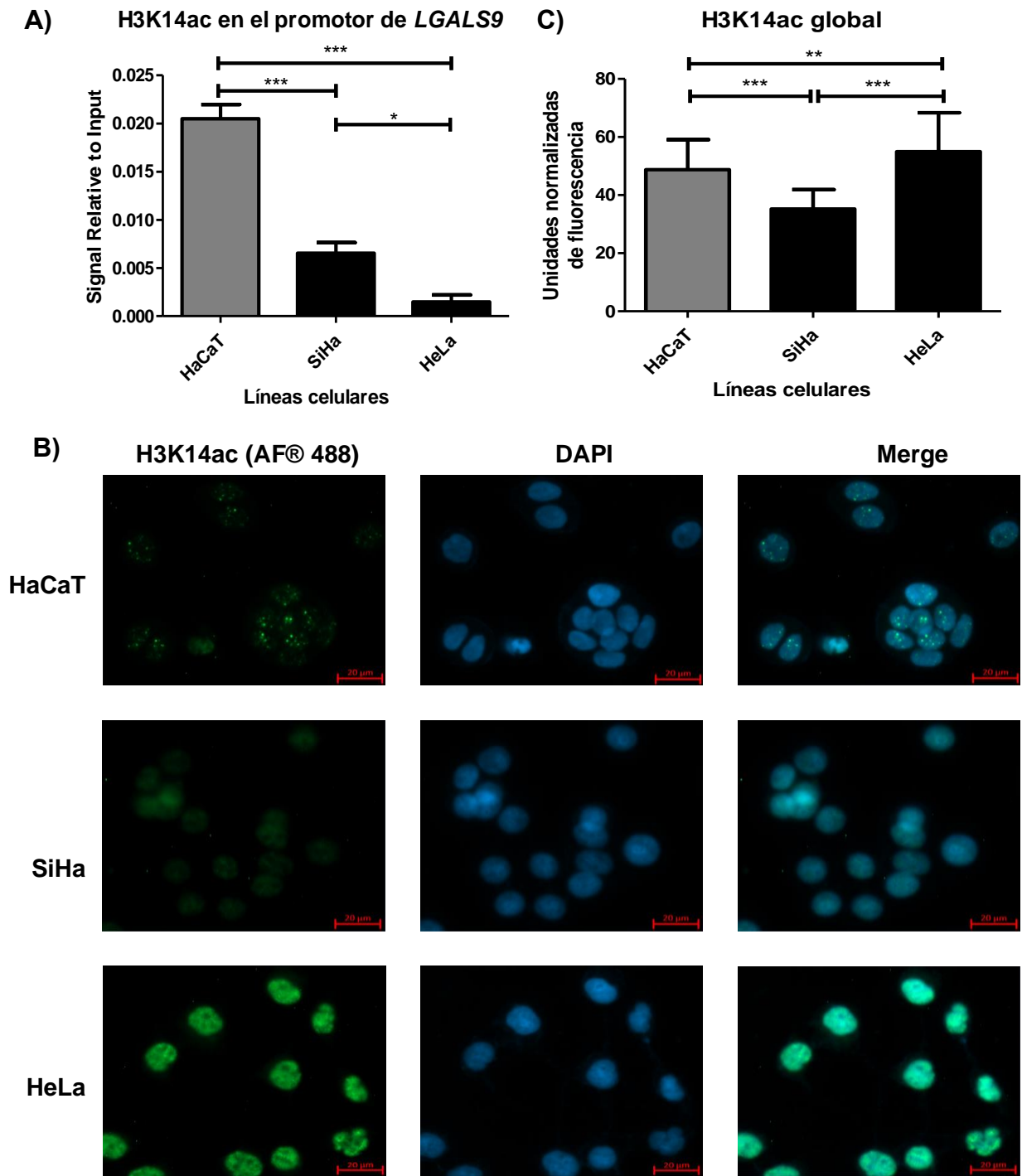


Figura 13. Estado de acetilación H3K14ac. A) Modificación H3K14ac específica adyacente al promotor de *LGALS9* por ChIP, donde se indica mayor acetilación en HaCaT. B) Imágenes de ICC/IF de H3K14ac global (marcas en verde) en HaCaT, SiHa y HeLa, tinción nuclear con DAPI (marcas en azul) y sobreposición de ambas (merge). Barra de escala a 20 μm . C) Cuantificación de la intensidad de la marca H3K14ac, la cual es mayor en HeLa, seguido de HaCaT y SiHa, con diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, Tukey post-hoc test, $P < 0.05$).

8.4.4. Relación entre H3K9ac y H3K14ac en líneas celulares

Se ha reportado que H3K9ac es una marca activadora que se encuentra presente en promotores activos. De igual forma H3K14ac se encuentra en estas regiones, pero hay numerosos reportes que indican el papel de esta modificación en conjunto con otras marcas, y que las combinaciones repercuten en diferentes procesos. Por ejemplo, Klein, B.J. *et al.* (2019) indicaron que las modificaciones H3K23ac y H3K14ac pueden coexistir en el mismo locus, y que la enzima MORF (encargada de la actividad HAT en H3K23ac) puede detectar la marca de crotonilación H3K14Cr, promoviendo la acetilación H3K23ac, lo cual repercute en una tasa de transcripción más alta. Por otro lado, Li, N. *et al.* (2016) identificaron que las marcas H3K4me1-H3K14ac pueden ser marcas leídas por ZMYND8, jugando así un papel correpressor transcripcional de JARID1D (desmetilasa de H3K4) para antagonizar genes relacionados a metástasis. Sin embargo, muchas de las relaciones estudiadas en H3K14ac han sido en conjunto con modificaciones de metilación y acetilación en H3K9. Por ejemplo, el marcaje de regiones bivalentes por H3K9me3 (marca represora, relacionada a la heterocromatina) y H3K14ac mediado por SETDB1 (Jurkowska, R.Z. *et al.*, 2017; Price, A.J. *et al.*, 2019). Diversos reportes indican la relación de H3K9ac y H3K14ac con la transcripción génica (Agalioti, T. *et al.*, 2002; van Nuland, R. *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Karmodiya, K. *et al.* (2012) se identificó por técnicas de CHIP-seq que H3K9ac y H3K14ac eran marcas abundantes en elementos reguladores como promotores activos y *enhancers*, por otro lado, en promotores inducibles inactivos prevalecía H3K14ac en ausencia de H3K9ac.

Tomando en cuenta este último reporte se hizo un análisis de H3K14ac en relación con H3K9ac como se muestra en la Fig. 14. Las células HaCaT y HeLa presentaron una relación más cercana a 1 en ambas marcas, mientras que en las SiHa la relación difiere de 1 porque tiene una menor presencia de H3K9ac. Junto con los datos de la expresión de Gal-9, se dedujo que el promotor en las células HaCaT tiene un comportamiento de promotor activo, y en las SiHa de promotor inactivo. Haciendo una relación con la expresión de Gal-9, los resultados en este análisis para las células HeLa difieren de un promotor activo o inactivo como en el caso de las HaCaT y SiHa. Por lo tanto, es posible que el promotor de *LGALS9* en esta línea celular se ajuste más a un promotor bivalente, el cual tiene la característica de presentar marcas activadoras y represivas y tienen una baja tasa transcripcional. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis, es necesario realizar más ensayos de CHIP utilizando anticuerpos contra marcas represivas, como H3K9me3.

H3K14ac/H3K9ac en el promotor de *LGALS9*

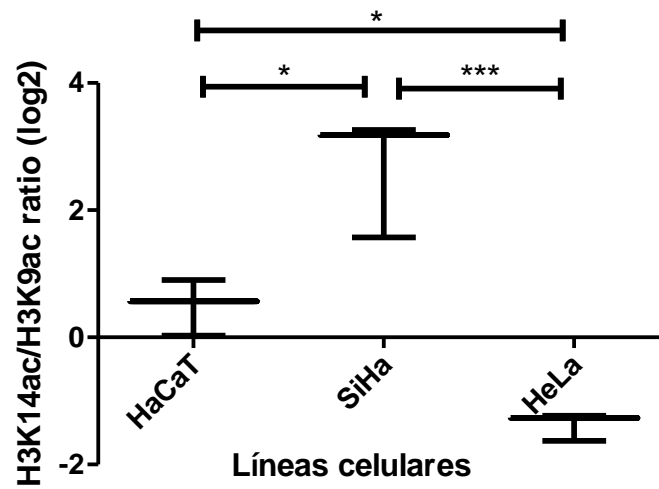


Figura 14. Relación H3K14ac/H3K9ac en el promotor de *LGALS9*. La relación en HaCaT y HeLa se acerca más 1, mientras que la de SiHa aparenta una menor proporción de H3K9ac. ANOVA de una vía, Tukey post-hoc test, $P < 0.05$.

SECCIÓN III. Resultados en biopsias de CaCu

8.5. Datos clínico-patológicos de las pacientes con CaCu

Posteriormente, para el análisis en de la expresión de Gal-9 en biopsias de pacientes con CaCu se incluyeron 38 muestras. Para cada muestra se indicaron una serie de características clínico-patológicas, las cuales fueron posteriormente agrupadas en: tipo histológico, si el tumor correspondía a tipo queratinizante o no queratinizante y estadio de la enfermedad según la clasificación FIGO. La razón principal de evaluar la expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu fue utilizar estos datos para posteriormente relacionarlos con el estado de metilación en *LGALS9*, sin embargo, fue posible también hacer otros tipos de análisis en relación con las características de las muestras analizadas. Los resultados para estas dos cuestiones se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características clínico-patológicas de las muestras de las pacientes con CaCu, y valores de expresión de Gal-9 en cada subgrupo. Número de pacientes (n) en cada grupo, y los valores de expresión de Gal-9 por IHC en cada grupo.

Características	Expresión de Gal-9 en tejidos (unidades de intensidad)			
	n	Mediana	Intervalo	P
Tipo histológico				
- Carcinoma escamoso	29	33.51	0.10-138.09	0.0165
- Adenocarcinoma	2	0.40	0.3-0.5	
- Lesiones premalignas	7	89.38	58.22-136.85	
Sub-clasificación del carcinoma escamoso				
- Queratinizante	3	123.94	109.80-138.08	0.0275
- No queratinizante	21	28.68	0.106-106.53	
Estadificación FIGO				
- I/II	15	42.07	0.01-106.54	0.7603
- III/IV	10	17.96	0.23-138.08	
- No clasificable	6			

El número de muestras con diagnóstico de carcinoma escamoso de cérvix fue mayor debido a la prevalencia que existe de este tipo de cáncer con respecto a la de adenocarcinoma (OMS, 2018). En la subclasificación del carcinoma escamoso, solo se incluyeron en queratinizante y no queratinizante las muestras que previamente fueron

descritas en patología. En el caso de las muestras clasificadas por la estadificación FIGO, se contaron con pocas en estadio I y IV. Considerando esto y las similitudes que se presentan en los estadios I y II, a diferencia de los estadios III y IV (donde hay una mayor invasión a órganos cercanos, y metástasis), en análisis posteriores se agruparán las muestras en I/II y III/IV. Existe un número de pacientes que no tienen reportado el estadio de la enfermedad, estas no se consideraron en los análisis que involucran los estadios de la enfermedad. Con respecto a las muestras que se obtuvieron con diagnóstico de LEIBG y LEIAG fueron clasificadas dentro del mismo grupo como lesiones premalignas.

8.6. Nivel y patrón de expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu y lesiones premalignas

El análisis de expresión de Gal-9 en lesiones premalignas muestra que esta proteína se expresa en el epitelio escamoso estratificado, sin embargo, el nivel de expresión varía con respecto al grado de diferenciación celular (Fig. 15). En las células que conforman la lámina basal no se detectó la presencia de Gal-9. En la capa de células parabasales se observa la expresión de la proteína. En las células que conforman el estrato intermedio del ectocérvix se observa una baja presencia de la proteína, mientras que en el estrato superior se encuentra más expresión de Gal-9 (Fig. 15). Es importante resaltar que en las lesiones premalignas la expresión de Gal-9 es predominantemente citoplásmica, mostrando ausencia de la proteína en los núcleos de las células. En el estroma se encontró una expresión muy baja, siendo casi nula en los tejidos que se analizaron para este grupo. Los valores de intensidad de expresión en el epitelio de lesiones premalignas se muestran en la Tabla 3.

En las biopsias de las pacientes con CaCu, una de las características histológicas es la disrupción de las células de la lámina basal e invasión de las células tumorales al estroma, así como una desorganización de las células que conforman el epitelio escamoso estratificado de tal manera que en muchos tumores no se distingue la estratificación del epitelio. Gal-9 solo se detectó en el citoplasma y en regiones donde parece haber delimitación entre las células. Lo anterior nos llama la atención ya que en las líneas celulares tumorales observamos la localización en núcleo. La localización de Gal-9 en citoplasma y entre las células tumorales puede estar relacionada con funciones de adhesión celular (Friedrichs, J. *et al.*, 2007) y como quimioatrayente de eosinófilos en la vigilancia

inmunológica (Hirashima, M., 2000; Sakkal, S. *et al.*, 2016) y como reguladora en procesos como apoptosis (Vladoiu, M.C. *et al.*, 2014). Es necesario realizar más investigación para determinar las funciones de Gal-9 en las diferentes ubicaciones donde se ha encontrado expresión de la proteína en CaCu.

Al determinar los niveles de expresión en estas muestras, se encontró que hay biopsias donde la expresión de Gal-9 es muy intensa y otros donde es muy baja o nula (Fig. 16). Posteriormente se evaluaron los niveles de la expresión de Gal-9 para todas las muestras, considerando la intensidad de tinción de cinco campos por muestra y sacando un promedio. Finalmente se calculó la intensidad media de todas las muestras con diagnóstico de CaCu analizadas (47.8 unidades de intensidad). Las muestras con intensidades mayor a la media se agruparon como Gal-9(+); y las que se encontraban debajo del valor, como Gal-9(-). No se encontró ninguna muestra que tuviera un valor cercano a la media, por lo que no se identificó un grupo con nivel de expresión intermedio. En el primer grupo, se encontró una expresión intensa de Gal-9 en las células epiteliales, y en algunos casos fue posible observar la expresión de la proteína en lo que conforma las células estromales (Fig. 16). En el grupo Gal-9(-) la expresión de esta galectina se encontró prácticamente ausente tanto en epitelio como en el estroma. Dentro de las muestras que se incluyeron en el grupo de Gal-9(-), quedaron agrupados los adenocarcinomas (Tabla 3) ya que presentaron una nula expresión de la proteína.

En la Fig. 17A se muestra un análisis estadístico donde se comparó la intensidad de expresión de Gal-9 en las lesiones en comparación con las muestras de CaCu. Se observan diferencias estadísticamente significativas que indican que hay menos expresión en el CaCu que en las lesiones. Esto se relaciona a lo reportado para CaCu (Liang, M. *et al.*, 2008). Debido a que se contaban con muy pocas muestras de adenocarcinomas, no se realizó un análisis estadístico donde se compare la expresión de Gal-9 en lesiones premalignas, carcinoma escamoso de cérvix y adenocarcinomas; sino que estas últimas dos fueron incluidas en un solo grupo de "CaCu".

Para evaluar si el nivel de expresión se relacionaba con el estadio de la enfermedad se agruparon las muestras en dos grupos: el primero contenía las muestras de estadio I y II y el segundo las muestras de estadio III y IV. En la Fig. 17B se muestra el resultado de la expresión de Gal-9 por estadios de CaCu. En este análisis se observó una tendencia de disminución de la expresión de la proteína en relación con el estadio, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, es importante aumentar el número de muestras por grupo para poder determinar si hay una relación entre

el nivel de expresión y el estadio clínico, o bien, si esa relación no se presenta con la progresión de la enfermedad. Punt, S. *et al.* (2015) observaron que en CaCu hay una tendencia a una mayor supervivencia en pacientes Gal-9(+) en comparación con Gal-9(-). En otros tipos de cáncer se ha visto que la disminución de Gal-9 se relaciona a un mal pronóstico y favorece procesos como la metástasis (Irie, A. *et al.*, 2005; Jiang, J. *et al.*, 2013; Kageshita, T. *et al.*, 2002; Sideras, K. *et al.*, 2017).

Lesiones premalignas

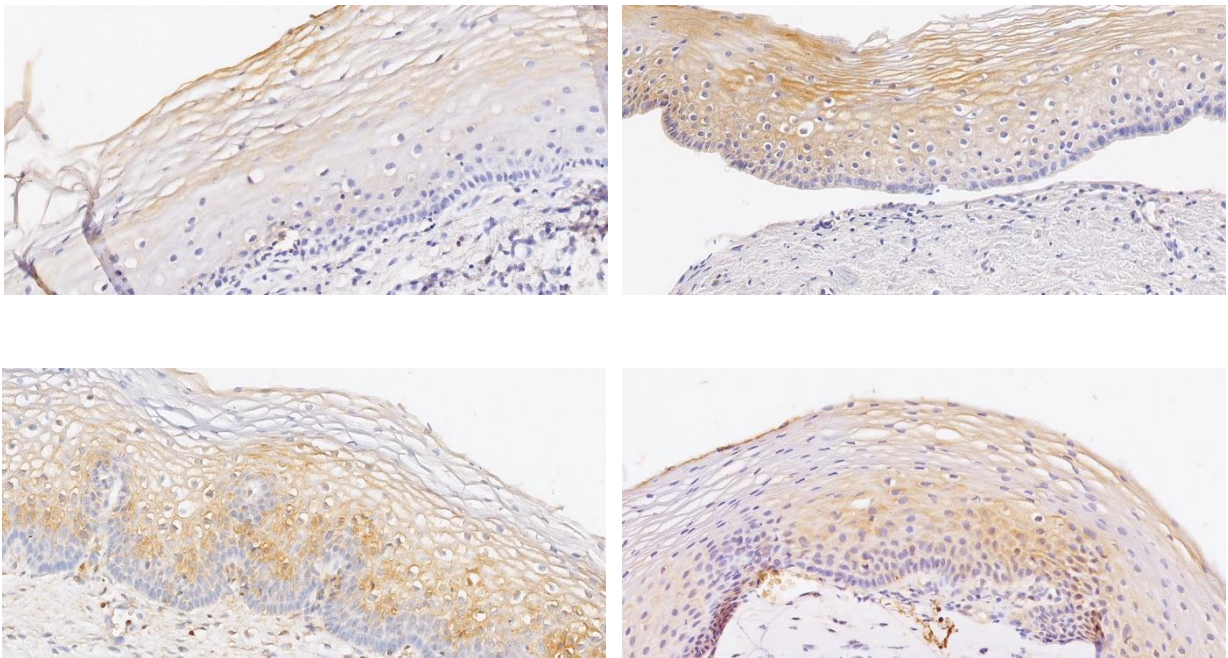
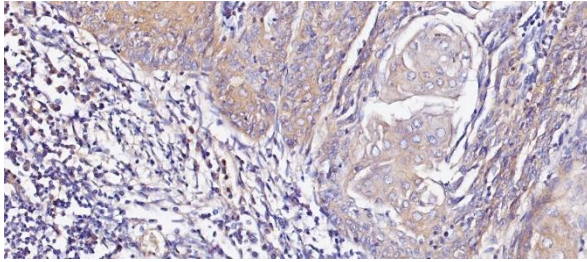


Figura 15. Imágenes representativas que muestran la expresión de Gal-9 en biopsias con diagnóstico de LEIBG. La coloración en café muestra la expresión de Gal-9, la coloración azul muestra la contraindicación de núcleos con hematoxilina (amplificación 200X).

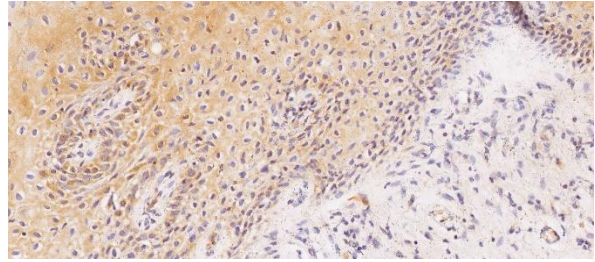
También evaluamos si existía una asociación entre el nivel de expresión de Gal-9 con la subclasificación de los tumores en queratinizante y no queratinizante, en la Fig. 17C se muestran los resultados donde se aprecia una mayor expresión de Gal-9 en los tumores queratinizantes en comparación con los no queratinizantes. Network, C.G.A.R. (2017)

utilizaron diferentes herramientas de secuenciación de nueva generación (*New Generation sequencing* o NGS) para determinar patrones moleculares en los tumores de pacientes con CaCu. Con base a las diferencias de los tumores, encontraron que se podían distinguir tres grandes grupos: carcinoma escamoso de cérvix queratinizante, no queratinizante y adenocarcinoma. Entre las diferencias de los dos tipos de carcinoma escamoso, encontraron que los tumores queratinizantes presentan un grupo de genes con expresión diferencial, que se caracteriza por la presencia de los microRNAs miR-99a-5p y miR-203a, los cuales juegan un papel como supresores de tumores en CaCu. Además, encontraron que los tumores no queratinizantes tienen una alta expresión de un grupo de genes relacionados a proteínas involucradas con la EMT. Esto podría estar implicado con un mayor potencial de invasión con respecto a los tumores queratinizantes. Es posible que dentro de los diferentes grupos que se pueden identificar en estos dos tipos de tumores, se encuentre relacionado el gen *LGALS9*, lo que podría estar implicado en la evolución del CaCu. Nuestros resultados resaltan la importancia de analizar un mayor número de muestras de tumores queratinizantes para comprobar esta relación. Actualmente la separación en estos dos grupos de carcinoma escamoso no es tomada en cuenta para determinar el tratamiento de las pacientes con CaCu; ni siquiera se utiliza un tratamiento diferente entre carcinomas escamosos y adenocarcinomas de cérvix.

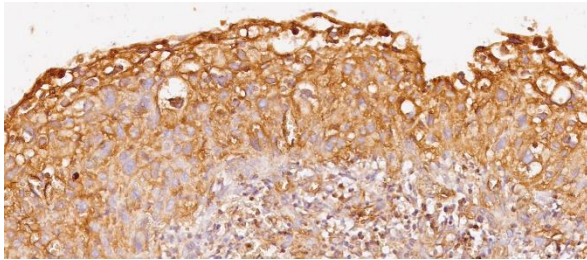
Tumores Gal-9(+)



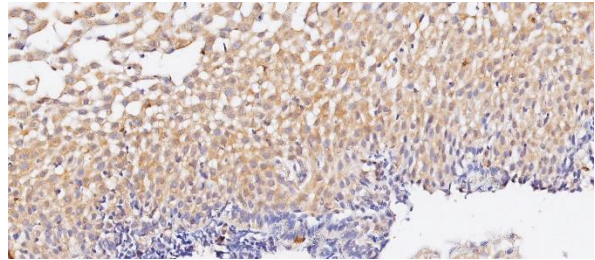
Carcinoma escamoso de cérvix, no queratinizante



Carcinoma escamoso de cérvix, estadio IIB

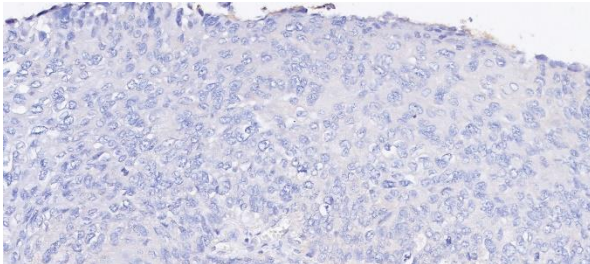


Carcinoma escamoso de cérvix queratinizante, estadio IIIB

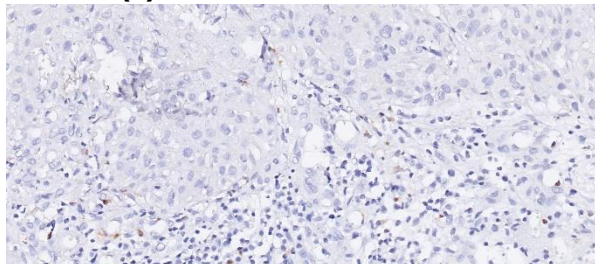


Carcinoma escamoso de cérvix, estadio IVB

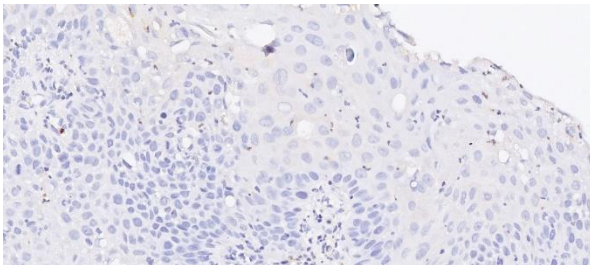
Tumores Gal-9(-)



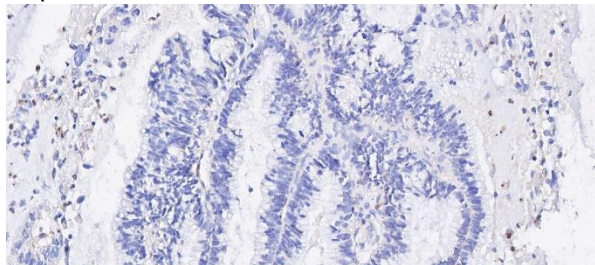
Carcinoma escamoso de cérvix no queratinizante, estadio IIA



Carcinoma escamoso de cérvix no queratinizante, IIB



Carcinoma escamoso de cérvix no queratinizante, estadio IIIB



Adenocarcinoma, estadio IIIB

Figura 16. Imágenes representativas que muestran la expresión de Gal-9 en biopsias de pacientes con CaCu. La coloración en café muestra la expresión de Gal-9, la coloración azul muestra la contratinción de núcleos con hematoxilina. Las biopsias de adenocarcinomas se agruparon en los tumores Gal-9(-), y se muestra una imagen representativa en dicho grupo (amplificación 200X).

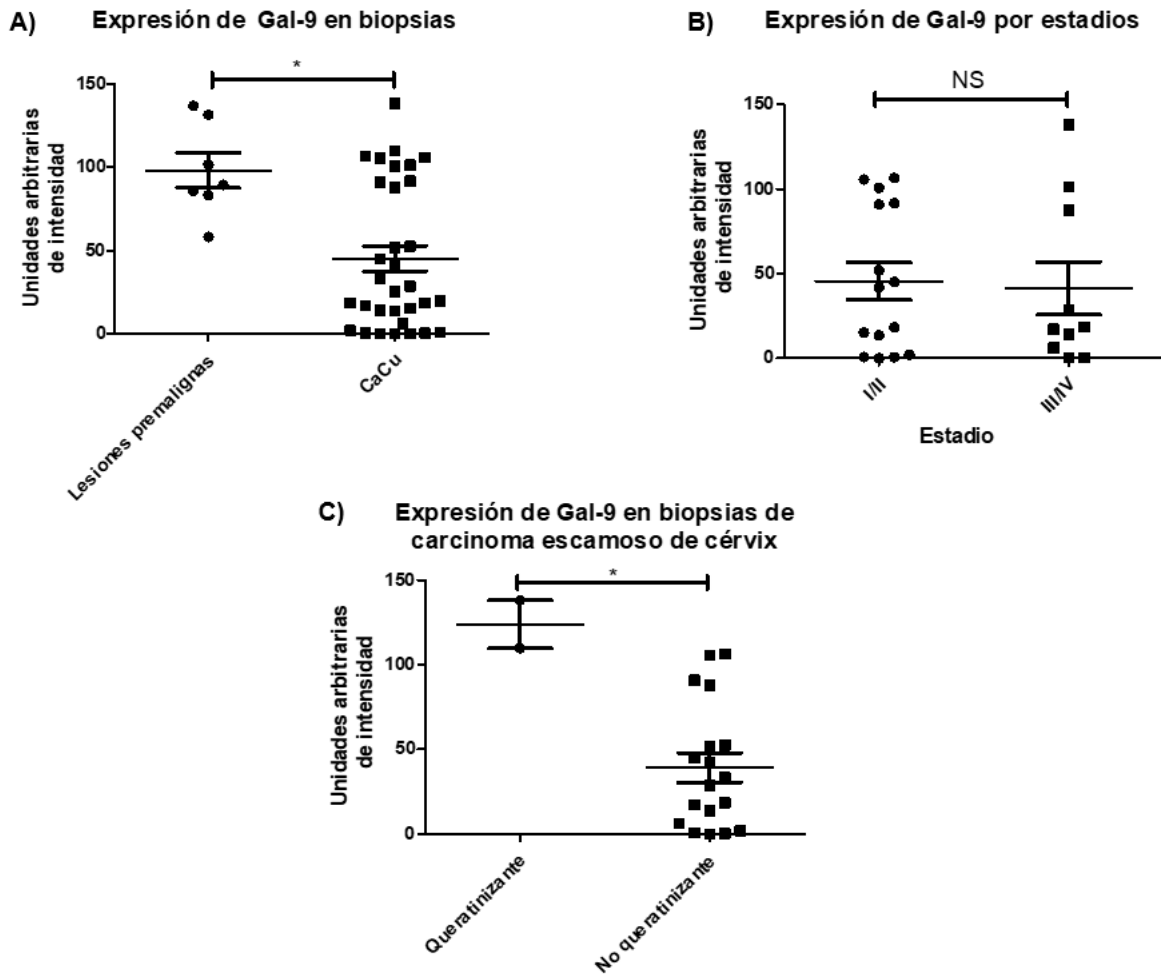


Figura 17. Análisis estadístico de la expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu. A) Comparación de la expresión de Gal-9 en lesiones premalignas con las biopsias de CaCu, donde hay mayor presencia de Gal-9 en el primer grupo. B) Comparación de la expresión de Gal-9 por estadios I/II y III/IV, donde no hay diferencias significativas. C) Comparación de la expresión de Gal-9 en la subclasificación de los carcinomas escamosos de cérvix, observando que los tejidos con mayor expresión se encuentran en los carcinomas queratinizantes. Mann-Whitney test; $P < 0.05$.

8.7. Estado de metilación en el promotor de *LGALS9* en biopsias de CaCu

A partir de los dos grupos Gal-9(+) y Gal-9(-) que se identificaron en el apartado anterior, se procedió a analizar patrones de metilación en el promotor de *LGALS9* en estas biopsias para verificar si existían alteraciones en la metilación del DNA que se relacionen con la alta o nula expresión de la proteína. En la Fig. 18A se observan los patrones de metilación por

sitios en diferentes muestras que pertenecen a los grupos Gal-9(+) y Gal-9(-). Hay una aparente relación en la metilación entre ambos grupos: en las muestras de pacientes Gal-9(+) se identificó un único sitio 5mC en el CpG ubicado en -394 pb; mientras que en tres de las seis muestras incluidas de pacientes Gal-9(-) se encontró presencia de metilación en -394, -81, -21 y +36. Al ver que solamente sucedió en la mitad de las muestras incluidas en Gal-9(-) para este objetivo, no es posible asegurar que sea un patrón definitivo en este grupo de pacientes (Fig. 18A). Es necesario realizar un análisis con un mayor número de muestras. Mediante la prueba estadística Chi cuadrada para tendencia, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en relación con el número de sitios con metilación entre ambos grupos. Por otro lado, en la Fig. 18B se muestra la correlación entre el % de metilación y el nivel de expresión que se obtuvo por unidades de intensidad en las IHC. En este caso, se observó únicamente una tendencia a una correlación negativa: las muestras con mayor expresión de Gal-9 tienden a tener menos sitios CpG metilados. Sin embargo, la prueba de correlación de Spearman indicó que no hay diferencias significativas. Nair, V.S. *et al.* (2018) reportaron que no había diferencias en el estado de metilación de *LGALS9* en CRC. Sin embargo, la región amplificada por esta técnica es en un sitio ubicado en aproximadamente 15 kb río arriba del inicio de la transcripción del gen, por lo que podría no estar relacionado directamente con la expresión de Gal-9. Por otro lado, Zhang, L. *et al.* (2019) reportaron que había cambios en la metilación sitio específica de *LGALS9* en CaCu mediante la técnica MS-PCR, en una región que se encuentra 2 kb río abajo del inicio de la transcripción. Estas dos diferentes regiones analizadas por estos grupos de investigación no han sido caracterizadas como reguladoras de la transcripción de *LGALS9*.

Retomando los resultados del análisis *in silico*, los sitios -394, -81, +21 y +36 coinciden con los elementos de respuesta a Sp1. Como se discutió anteriormente, Sp1 es un FT cuya unión al DNA puede ser evitada por la metilación del DNA y, por lo tanto, la tasa de transcripción disminuye como se ha descrito para diversos genes (Jiang, D. *et al.*, 2018); al tener en cuenta que estos tumores tienen alta tasa de expresión, el posible impedimento de unión de Sp1 que pudiera causar la metilación no se relaciona con la expresión de Gal-9. Por otro lado, los análisis *in silico* que se mencionaron anteriormente muestran que existen elementos de respuesta para el FT AP-1, donde uno de ellos coincide con un sitio CpG. A pesar de que no se encontró metilación en los elementos de respuesta para AP-1, se sabe que este FT podría unirse a su elemento de respuesta en presencia o ausencia de metilación (Yang, J. *et al.*, 2019). La regulación de la expresión del gen *LGALS9* podría ser regulada de igual manera por AP-1.

A)

		Sitios de metilación en el promotor de <i>LGALS9</i>							
		-477	-471	-394	-333	-81	-23	+21	+36
Gal-9(+)									
	1			■					
	68			■					
	106			■					
	126			■					
	176			■					
Gal-9(-)									
	12			■				■	
	83			■				■	
	145			■				■	
	175			■		■			■
	192			■		■			■
	194			■					

B) **Correlación entre % de metilación con expresión de Gal-9 en biopsias**

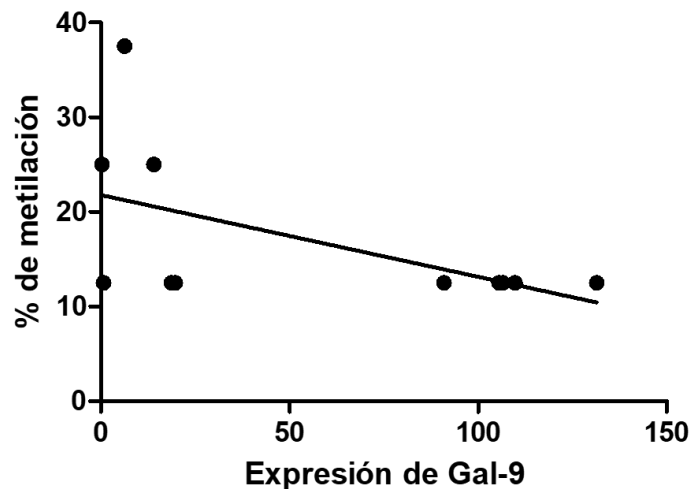


Figura 18. Sitios de metilación en el promotor de *LGALS9* en biopsias de CaCu Gal-9(+) y Gal-9(-). A) Los cuadros en negro representan sitios donde se encontró metilación en CpG. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (prueba Chi cuadrada para tendencia, $p > 0.05$). B) Correlación entre % de metilación en el promotor de *LGALS9* y nivel de expresión de Gal-9 en biopsias de CaCu. No hay diferencias estadísticamente significativas (correlación de Spearman, $p=0.08$).

Para este estudio, y como fue mencionado en materiales y métodos, se utilizaron muestras de DNA total tratadas con bisulfito a partir de las biopsias incluidas en parafina. Debido a que la cantidad de muestra de biopsia es limitada, para cada aislamiento de DNA total se incluyeron cortes del tejido total. Por lo tanto, es posible que en cada aislamiento había presencia de las células epiteliales y de células estromales. Debido al patrón de expresión diferente que existe en estos dos tipos celulares, es posible que la regulación epigenética sea diferente también en estos dos tipos celulares. Es necesario utilizar técnicas más exactas, como una microdissección láser donde se delimite únicamente el área de células epiteliales transformadas y evaluar el estado de metilación de *LGALS9* únicamente en estas zonas. Por otro lado, tanto en los resultados de líneas celulares como de muestras de pacientes con CaCu, hay algunos sitios como el -400 pb que se repite en todos los casos, por lo cual se podría utilizar un método para cuantificar el nivel de metilación específico en sitios individuales por la técnica MS-PCR.

9. CONCLUSIONES

Gal-9 es una proteína cuya expresión puede verse alterada en el cáncer, y a pesar de la importancia en sus funciones, no hay reportes que indiquen el mecanismo por el cual su expresión se encuentra desregulada. Este estudio permitió indagar si existen alteraciones epigenéticas en el promotor de *LGALS9* relacionadas con la expresión de la proteína.

Debido a la relación de la hipermetilación del DNA en promotores con la represión de la expresión génica, se esperaba que el número de sitios CpG metilados fuera mayor en las líneas celulares tumorales en comparación con HaCaT. Sin embargo, los resultados sugieren que la metilación del DNA no influye en la regulación de este gen. Por otro lado, H3K9ac y H3K14ac tienen relación con la activación transcripcional cuando se encuentran presentes en promotores. En relación con los resultados mostrados, es posible que la disminución de estas dos marcas de acetilación en SiHa y en HeLa se relacionen con la baja expresión de la proteína. Además, se encontró que estas marcas están alteradas de manera global, lo cual podría sugerir alteraciones en la actividad y/o expresión de las enzimas HAT y HDAC.

Los resultados de expresión de Gal-9 en las biopsias de pacientes, muestran resultados que divergen, observando grupos de muestras con alta expresión y grupos con muy baja o nula expresión. El promedio de los niveles de expresión muestra una disminución en la expresión con respecto a lesiones premalignas. Debido a que no hay relación de la expresión de Gal-9 con la etapa tumoral, es posible que la baja expresión de esta proteína esté relacionada con el mal pronóstico en las pacientes con CaCu como han reportado otros grupos de investigación. Además, se encontraron diferencias en la expresión de Gal-9 en carcinomas escamosos queratinizantes y no queratinizantes, donde se encontró menor expresión en el último grupo. A pesar de que se han reportado diferencias moleculares entre ambos grupos con implicaciones biológicas, aún no se ha profundizado en las implicaciones clínicas en estos tumores. Por los resultados obtenidos, es posible que Gal-9 esté relacionado con estas características, encontrándose menor en el carcinoma escamoso no queratinizante y a la vez relacionado con el mal pronóstico en las pacientes con CaCu. La metilación en el promotor de *LGALS9* en las muestras de pacientes no se relaciona con la expresión de la proteína. Sin embargo, es necesario utilizar técnicas más sensibles que nos permitan corroborar este resultado. Finalmente, debido a que los resultados obtenidos en las líneas celulares respecto a las marcas de acetilación se relacionan con la expresión de Gal-9, es necesario estudiarlas en las muestras de pacientes con cáncer, para determinar si este mecanismo juega un papel importante en la regulación de la expresión del gen *LGALS9* en este modelo.

10. PERSPECTIVAS

- Comprobar el porcentaje de metilación en sitios CpG en específico por MS-PCR y ver si hay diferencias en líneas celulares y biopsias de CaCu (de alta y baja expresión de Gal-9), y un mayor número de muestras en este último.
 - Utilizar microdissección láser para delimitar el área del tumor en las biopsias y hacer más específica la detección.
- Comprobar si Sp1 y c-Fos/c-Jun se unen al promotor de *LGALS9*, y si juegan un papel importante en la regulación de la expresión de este gen.
- Verificar el estado de acetilación H3K9ac y H3K14ac en el promotor de *LGALS9* en biopsias, y ver si se relacionan con el nivel de expresión.
- Analizar un panel mayor de marcas de histonas activadoras y represivas en el gen, y determinar si hay presencia de otras regiones como *enhancers*.
- Determinar cambios en la expresión de enzimas reguladoras del epigenoma en el CaCu.

11. REFERENCIAS

- Addison, W.N., Fu, M.M., Yang, H.X., Lin, Z., Nagano, K., Gori, F., & Baron, R. (2014). Direct transcriptional repression of Zfp423 by Zfp521 mediates a bone morphogenic protein-dependent osteoblast versus adipocyte lineage commitment switch. *Molecular and cellular biology*, 34(16), 3076-3085.
- Advedissian, T., Deshayes, F., Poirier, F., Grandjean, C., & Viguier, M. (2015). Les galectines-Des lectines pas comme les autres. *médecine/sciences*, 31(5), 499-505.
- Agalioti, T., Chen, G., & Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, 111(3), 381-392.
- Alam, S., Li, H., Margariti, A., Martin, D., Zampetaki, A., Habi, O., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., & Zeng, L. (2011). Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 44211-44217.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., & Caparros, M.-L. (2007). *Epigenetics*: CSHL Press.
- Anónimo. (2019). Síntomas y prevención de enfermedades cervicales, from <https://zodiacc.ru/info/diskarioz-cto-jeto/>
- Antequera, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(8), 1647-1658.
- Anton, M., Horký, M., Kuchtickova, S., Vojtěšek, B., & Blaha, O. (2004). Immunohistochemical detection of acetylation and phosphorylation of histone H3 in cervical smears. *Ceska gynekologie*, 69(1), 3-6.
- Aparicio-Flores, J. (2019). *Identificación, caracterización y evaluación de la actividad del promotor del gen LGALS9*.
- Asakura, H., Kashio, Y., Nakamura, K., Seki, M., Dai, S., Shirato, Y., Abedin, M.J., Yoshida, N., Nishi, N., & Imaizumi, T. (2002). Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN- γ -induced galectin-9. *The Journal of Immunology*, 169(10), 5912-5918.
- Audia, J.E., & Campbell, R.M. (2016). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(4), a019521.
- Avvakumov, N., Torchia, J., & Mymryk, J.S. (2003). Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene*, 22(25), 3833-3841.
- Balan, V., Nangia-Makker, P., & Raz, A. (2010). Galectins as cancer biomarkers. *Cancers*, 2(2), 592-610.
- Banerjee, A., Sanyal, S., Dutta, S., Chakraborty, P., Das, P.P., Jana, K., Vasudevan, M., Das, C., & Dasgupta, D. (2017). The plant alkaloid chelerythrine binds to chromatin, alters H3K9Ac and modulates global gene expression. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(7), 1491-1499.
- Bartolazzi, A. (2018). *Galectins in Cancer and Translational Medicine: From Bench to Bedside*: Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Berman, B.P., Weisenberger, D.J., Aman, J.F., Hinoue, T., Ramjan, Z., Liu, Y., Noushmehr, H., Lange, C.P., van Dijk, C.M., & Tollenaar, R.A. (2012). Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nature genetics*, 44(1), 40.
- Beyer, S., Zhu, J., Mayr, D., Kuhn, C., Schulze, S., Hofmann, S., Dannecker, C., Jeschke, U., & Kost, B.P. (2017). Histone H3 acetyl K9 and histone H3 tri methyl K4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 477.
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D.N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 143, 22-36.
- Bhatla, N., Berek, J.S., Fredes, M.C., Denny, L.A., Grenman, S., Karunaratne, K., Kehoe, S.T., Konishi, I., Olawaiye, A.B., & Prat, J. (2019). Revised FIGO staging for

- carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 145(1), 129-135.
- Blackledge, N.P., & Klose, R. (2011). CpG island chromatin: a platform for gene regulation. *Epigenetics*, 6(2), 147-152.
- Bracken, A.P., Brien, G.L., & Verrijzer, C.P. (2019). Dangerous liaisons: interplay between SWI/SNF, NuRD, and Polycomb in chromatin regulation and cancer. *Genes & development*, 33(15-16), 936-959.
- Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., & Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO journal*, 18(9), 2449-2458.
- Brooks, C.L., & Gu, W. (2011). The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein & cell*, 2(6), 456-462.
- Brown, E.R., Doig, T., Anderson, N., Brenn, T., Doherty, V., Xu, Y., Bartlett, J.M., Smyth, J.F., & Melton, D.W. (2012). Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *European Journal of Cancer*, 48(6), 865-874.
- Brueckner, B., & Lyko, F. (2004). DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 25(11), 551-554.
- Burgers, W.A., Blanchon, L., Pradhan, S., De Launoit, Y., Kouzarides, T., & Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*, 26(11), 1650-1655.
- Cano, L.Q., Tagit, O., Dolen, Y., van Duffelen, A., Dieltjes, S., Buschow, S.I., Niki, T., Hirashima, M., Joosten, B., & van den Dries, K. (2019). Intracellular Galectin-9 controls dendritic cell function by maintaining plasma membrane rigidity. *IScience*, 22, 240-255.
- Caporal-Hernández, L. (2019). *Análisis de expresión de glicogenes modulados por la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo*.
- Castillo, M., Astudillo, A., Clavero, O., Velasco, J., Ibáñez, R., & de Sanjose, S. (2016). Poor cervical Cancer screening attendance and false negatives. A call for organized screening. *PloS one*, 11(8).
- Clapier, C.R., & Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, 273-304.
- Clark, S.J., Harrison, J., & Molloy, P.L. (1997). Sp1 binding is inhibited by mCpmCpG methylation. *Gene*, 195(1), 67-71.
- Concha, M. (2007). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Revista chilena de infectología*, 24(3), 209-214.
- Cui, P., Zhang, P., Zhang, Y., Sun, L., Cui, G., Guo, X., Wang, H., Zhang, X., Shi, Y., & Yu, Z. (2020). HIF-1 α /Act16a/H3K9ac axis is critical for pluripotency and lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells. *The FASEB Journal*.
- Curado, M.-P., Edwards, B., Shin, H.R., Storm, H., Ferlay, J., Heanue, M., & Boyle, P. (2007). *Cancer incidence in five continents, Volume IX*: IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Cyriac, S., Sagar, T., Rajendranath, R., & Rathnam, K. (2008). Hypereosinophilia in hodgkin lymphoma. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 24(2), 67.
- Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.-P., Ahmann, G.J., & Adli, M. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471(7339), 467-472.
- Chavez-Blanco, A., Segura-Pacheco, B., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Cetina, L., Candelaria, M., Cantu, D., Gonzalez-Fierro, A., Garcia-Lopez, P., & Zambrano, P. (2005). Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. *Molecular cancer*, 4(1), 22.

- Chelimo, C., Wouldes, T.A., Cameron, L.D., & Elwood, J.M. (2013). Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*, *66*(3), 207-217.
- Chen, G., Li, W., Yan, F., Wang, D., & Chen, Y. (2020). The Structural Basis for Specific Recognition of H3K14 Acetylation by Sth1 in the RSC Chromatin Remodeling Complex. *Structure*, *28*(1), 111-118. e113.
- Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., & Yu, X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, *493*(7433), 561-564.
- Chetry, M., Song, Y., Pan, C., Li, R., Zhang, J., & Zhu, X. (2020). Effects of Galectin-1 on Biological Behavior in Cervical Cancer. *Journal of Cancer*, *11*(6), 1584.
- Chou, F.-C., Chen, H.-Y., Kuo, C.-C., & Sytwu, H.-K. (2018). Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, *19*(2), 430.
- Chowand, L.T., & Broker, T.R. (2007). Human papillomavirus transcription *The papillomaviruses* (pp. 109-144): Springer.
- Chu, S. (2012). Transcriptional regulation by post-transcriptional modification—role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity. *Gene*, *508*(1), 1-8.
- Danino, Y.M., Even, D., Ideses, D., & Juven-Gershon, T. (2015). The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1849*(8), 1116-1131.
- Dawson, M.A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, *150*(1), 12-27.
- De La Cruz-Hernández, E., Pérez-Cárdenas, E., Contreras-Paredes, A., Cantú, D., Mohar, A., Lizano, M., & Dueñas-González, A. (2007). The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virology journal*, *4*(1), 18.
- Deng, G.-F., Qin, J.-M., Sun, X.-S., Kuang, Z.-Y., Su, T., Zhao, Q.-H., Shi, Y.-W., Liu, X.-R., Yu, M.-J., & Yi, Y.-H. (2011). Promoter analysis of mouse Scn3a gene and regulation of the promoter activity by GC box and CpG methylation. *Journal of Molecular Neuroscience*, *44*(2), 115-121.
- Díaz-Lagares, A. (2018). Biomarcadores epigenéticos en cáncer: un pilar de la oncología de precisión. *GENÉTICA MÉDICA Y GENÓMICA*.
- Dings, R.P., Miller, M.C., Griffin, R.J., & Mayo, K.H. (2018). Galectins as molecular targets for therapeutic intervention. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 905.
- Dong, Z., Liang, X., Wu, X., Kang, X., Guo, Y., Shen, S., Liang, J., & Guo, W. (2019). Promoter hypermethylation-mediated downregulation of tumor suppressor gene SEMA3B and lncRNA SEMA3B-AS1 correlates with progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical & experimental metastasis*, *36*(3), 225-241.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, *25*, 2-23.
- Du, Q., Luu, P.-L., Stirzaker, C., & Clark, S.J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*, *7*(6), 1051-1073.
- Du, Z., Li, H., Wei, Q., Zhao, X., Wang, C., Zhu, Q., Yi, X., Xu, W., Liu, X.S., & Jin, W. (2013). Genome-wide analysis of histone modifications: H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, and H3K27ac in *Oryza sativa* L. Japonica. *Molecular plant*, *6*(5), 1463-1472.
- Duan, M.-R., & Smerdon, M.J. (2014). Histone H3 lysine 14 (H3K14) acetylation facilitates DNA repair in a positioned nucleosome by stabilizing the binding of the chromatin Remodeler RSC (Remodels Structure of Chromatin). *Journal of Biological Chemistry*, *289*(12), 8353-8363.
- Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., & Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular cancer*, *4*(1), 38.

- Durzynska, J., Lesniewicz, K., & Poreba, E. (2017). Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, 36-50.
- Eberharter, A., & Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*, 3(3), 224-229.
- Edwards, J.R., Yarychkivska, O., Boulard, M., & Bestor, T.H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & chromatin*, 10(1), 23.
- Eferl, R., & Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 859-868.
- Egede, J., Ajah, L., Ibekwe, P., Agwu, U., Nwizu, E., & Iyare, F. (2018). Comparison of the Accuracy of Papanicolaou Test Cytology, Visual Inspection With Acetic Acid, and Visual Inspection With Lugol Iodine in Screening for Cervical Neoplasia in Southeast Nigeria. *Journal of global oncology*, 4, 1-9.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-463.
- Ellinger, J., Schneider, A.-C., Bachmann, A., Kristiansen, G., MÜLLER, S.C., & ROGENHOFER, S. (2016). Evaluation of global histone acetylation levels in bladder cancer patients. *Anticancer research*, 36(8), 3961-3964.
- Fan, H., Liu, D., Qiu, X., Qiao, F., Wu, Q., Su, X., Zhang, F., Song, Y., Zhao, Z., & Xie, W. (2010). A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. *BMC medicine*, 8(1), 12.
- Farrelly, L.A., Thompson, R.E., Zhao, S., Lepack, A.E., Lyu, Y., Bhanu, N.V., Zhang, B., Loh, Y.-H.E., Ramakrishnan, A., & Vadodaria, K.C. (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature*, 567(7749), 535-539.
- Feng, D., Wu, J., Tian, Y., Zhou, H., Zhou, Y., Hu, W., Zhao, W., Wei, H., Ling, B., & Ma, C. (2013). Targeting of histone deacetylases to reactivate tumour suppressor genes and its therapeutic potential in a human cervical cancer xenograft model. *PloS one*, 8(11).
- Feng, Y., Vlassis, A., Roques, C., Lalonde, M.E., González-Aguilera, C., Lambert, J.P., Lee, S.B., Zhao, X., Alabert, C., & Johansen, J.V. (2016). BRPF3-HBO1 regulates replication origin activation and histone H3K14 acetylation. *The EMBO journal*, 35(2), 176-192.
- Fields, B., Knipe, D., & Howley, P. (2013). Fields virology 6th ed. *JIC...[et al.]*. David M. Knipe, Peter M. Howley.
- Fischle, W., Mootz, H.D., & Schwarzer, D. (2015). Synthetic histone code. *Current opinion in chemical biology*, 28, 131-140.
- Friedrichs, J., Torkko, J.M., Helenius, J., Teräväinen, T.P., Füllekrug, J., Muller, D.J., Simons, K., & Manninen, A. (2007). Contributions of galectin-3 and-9 to epithelial cell adhesion analyzed by single cell force spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29375-29383.
- Fujita, K., Iwama, H., Sakamoto, T., Okura, R., Kobayashi, K., Takano, J., Katsura, A., Tatsuta, M., Maeda, E., & Mimura, S. (2015). Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo. *International journal of oncology*, 46(6), 2419-2430.
- Gong, J., Sheng, W., Ma, D., Huang, G., & Liu, F. (2019). DNA methylation status of TBX20 in patients with tetralogy of Fallot. *BMC medical genomics*, 12(1), 75.
- Gregoret, I., Lee, Y.-M., & Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology*, 338(1), 17-31.
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., & Zhou, L. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics*, 43(9), 875-878.

- Guo, P., Chen, W., Li, H., Li, M., & Li, L. (2018). The histone acetylation modifications of breast cancer and their therapeutic implications. *Pathology & Oncology Research*, 24(4), 807-813.
- Gupta, S.M., & Mania-Pramanik, J. (2019). Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *Journal of biomedical science*, 26(1), 28.
- Gustems, M., Woellmer, A., Rothbauer, U., Eck, S.H., Wieland, T., Lutter, D., & Hammerschmidt, W. (2014). c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs. *Nucleic acids research*, 42(5), 3059-3072.
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(10), 621-637.
- Henriksen, S.D., Madsen, P.H., Larsen, A.C., Johansen, M.B., Pedersen, I.S., Krarup, H., & Thorlacius-Ussing, O. (2017). Promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma staging. *International journal of cancer*, 141(12), 2489-2497.
- Heusschen, R., Griffioen, A.W., & Thijssen, V.L. (2013). Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1836(1), 177-185.
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., & Muller, W.E. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572(2-3), 232-254.
- Hirashima, M. (2000). Ecalectin/galectin-9, a novel eosinophil chemoattractant: its function and production. *International archives of allergy and immunology*, 122(Suppl. 1), 6-9.
- Hirbe, A.C., & Gutmann, D.H. (2019). Understanding a complicated Gal-1: Oxford University Press US.
- Hodges, C., Kirkland, J.G., & Crabtree, G.R. (2016). The many roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF complexes in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a026930.
- Honjo, Y., Inohara, H., Akahani, S., Yoshii, T., Takenaka, Y., Yoshida, J.-i., Hattori, K., Tomiyama, Y., Raz, A., & Kubo, T. (2000). Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6(12), 4635-4640.
- Hota, S.K., & Bruneau, B.G. (2016). ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development. *Development*, 143(16), 2882-2897.
- Hu, Y., Zhang, L., He, S., Huang, M., Tan, J., Zhao, L., Yan, S., Li, H., Zhou, K., & Liang, Y. (2012). Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac. *Plant, cell & environment*, 35(12), 2130-2142.
- Huang, L.-Y., Zhao, J., Chen, H., Wan, L., Inuzuka, H., Guo, J., Fu, X., Zhai, Y., Lu, Z., & Wang, X. (2018). SCF FBW7-mediated degradation of BRG1 suppresses gastric cancer metastasis. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Huang, M., & Geng, M. (2017). Exploiting histone deacetylases for cancer therapy: from hematological malignancies to solid tumors. *Science China Life Sciences*, 60(1), 94-97.
- Huang, S.-M., & McCance, D. (2002). Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *Journal of virology*, 76(17), 8710-8721.
- Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., & Tan, S.-L. (2007). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology*, 364(1), 1-9.

- Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., & Nakao, M. (2005). Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13928-13935.
- Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N., Fujimoto, K., Tanji, K., & Shibata, T. (2002). Interferon- γ stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of leukocyte biology*, *72*(3), 486-491.
- INEGI. (2016), from <http://www3.inegi.org.mx/>
- Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Liu, D., Shirato, Y., Seki, M., Nishi, N., Nakamura, T., & Yokomise, H. (2005). Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *11*(8), 2962-2968.
- Izzo, L.T., & Wellen, K.E. (2019). Histone lactylation links metabolism and gene regulation: Nature Publishing Group.
- Jasencakova, Z., Meister, A., & Schubert, I. (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma*, *110*(2), 83-92.
- Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T.P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., & Helm, M. (2017). Mechanism and biological role of Dnmt2 in nucleic acid methylation. *RNA biology*, *14*(9), 1108-1123.
- Jha, S., Pol, S.V., Banerjee, N.S., Dutta, A.B., Chow, L.T., & Dutta, A. (2010). Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway. *Molecular cell*, *38*(5), 700-711.
- Ji, G.-G., Shu, J.-T., Zhang, M., Ju, X.-J., Shan, Y.-J., Liu, Y.-F., & Tu, Y.-J. (2019). Transcriptional regulatory region and DNA methylation analysis of TNNI1 gene promoters in Gaoyou duck skeletal muscle (*Anas platyrhynchos domestica*). *British poultry science*, *60*(3), 202-208.
- Jiang, D., He, Z., Wang, C., Zhou, Y., Li, F., Pu, W., Zhang, X., Feng, X., Zhang, M., & Yecheng, X. (2018). Epigenetic silencing of ZNF132 mediated by methylation-sensitive Sp1 binding promotes cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell death & disease*, *10*(1), 1-13.
- Jiang, J., Jin, M.-S., Kong, F., Cao, D., Ma, H.-X., Jia, Z., Wang, Y.-P., Suo, J., & Cao, X. (2013). Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PloS one*, *8*(12).
- Johannes, L., Jacob, R., & Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *Journal of cell science*, *131*(9).
- Johnsson, A., Durand-Dubief, M., Xue-Franzén, Y., Rönnerblad, M., Ekwall, K., & Wright, A. (2009). HAT-HDAC interplay modulates global histone H3K14 acetylation in gene-coding regions during stress. *EMBO reports*, *10*(9), 1009-1014.
- Jones, S., Wang, T.-L., Shih, I.-M., Mao, T.-L., Nakayama, K., Roden, R., Glas, R., Slamon, D., Diaz, L.A., & Vogelstein, B. (2010). Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*, *330*(6001), 228-231.
- Judes, G., Dagdemir, A., Karsli-Ceppioglu, S., Lebert, A., Echegut, M., Ngollo, M., Bignon, Y.-J., Penault-Llorca, F., & Bernard-Gallon, D. (2016). H3K4 acetylation, H3K9 acetylation and H3K27 methylation in breast tumor molecular subtypes. *Epigenomics*, *8*(7), 909-924.
- Judes, G., Dubois, L., Rifai, K., Idrissou, M., Mishellany, F., Pajon, A., Besse, S., Daures, M., Degoul, F., & Bignon, Y.-J. (2018). TIP60: an actor in acetylation of H3K4 and tumor development in breast cancer. *Epigenomics*, *10*(11), 1415-1430.
- Juliano, C.N., Izetti, P., Pereira, M.P., dos Santos, A.P., Bravosi, C.P., Abujamra, A.L., Prolla, P.A., Osvaldt, A.B., & Edelweiss, M.I. (2016). H4K12 and H3K18 acetylation associates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *24*(5), 337-344.

- Jurkowska, R.Z., Qin, S., Kungulovski, G., Tempel, W., Liu, Y., Bashtrykov, P., Stiefelmaier, J., Jurkowski, T.P., Kudithipudi, S., & Weirich, S. (2017). H3K14ac is linked to methylation of H3K9 by the triple Tudor domain of SETDB1. *Nature communications*, 8(1), 1-13.
- Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M.J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., & Hirashima, M. (2002). Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *International journal of cancer*, 99(6), 809-816.
- Kanai, Y., Ushijima, S., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., & Hirohashi, S. (2003). Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer letters*, 192(1), 75-82.
- Karmodiya, K., Krebs, A.R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., & Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC genomics*, 13(1), 424.
- Kashio, Y., Nakamura, K., Abedin, M.J., Seki, M., Nishi, N., Yoshida, N., Nakamura, T., & Hirashima, M. (2003). Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *The Journal of Immunology*, 170(7), 3631-3636.
- Klein, B.J., Jang, S.M., Lachance, C., Mi, W., Lyu, J., Sakuraba, S., Krajewski, K., Wang, W.W., Sidoli, S., & Liu, J. (2019). Histone H3K23-specific acetylation by MORF is coupled to H3K14 acylation. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- Klein Hesselink, E.N., Zafon, C., Villalmanzo, N., Iglesias, C., van Hemel, B.M., Klein Hesselink, M.S., Montero-Conde, C., Buj, R., Mauricio, D., & Peinado, M.A. (2018). Increased global DNA hypomethylation in distant metastatic and dedifferentiated thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(2), 397-406.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., & Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, 76(2), 357-369.
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., & Cedar, H. (2016). DNA methylation in cancer and aging. *Cancer research*, 76(12), 3446-3450.
- Kobayashi, T., Kuroda, J., Ashihara, E., Oomizu, S., Terui, Y., Taniyama, A., Adachi, S., Takagi, T., Yamamoto, M., & Sasaki, N. (2010). Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia*, 24(4), 843.
- Koivunen, P., & Laukka, T. (2018). The TET enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(8), 1339-1348.
- Koss, L.G. (1989). The Papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. *Jama*, 261(5), 737-743.
- Kovács-Sólyom, F., Blaskó, A., Fajka-Boja, R., Katona, R.L., Végh, L., Novák, J., Szebeni, G.J., Krenács, L., Uher, F., & Tubak, V. (2010). Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunology letters*, 127(2), 108-118.
- Lai, A.Y., & Wade, P.A. (2011). Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 588-596.
- Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K., & Raj, K. (2010). Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis*, 31(5), 918-926.
- Lee, J.B., & Keung, A.J. (2018). Chromatin Immunoprecipitation in Human and Yeast Cells *Epigenome Editing* (pp. 257-269): Springer.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., & Poirier, F. (2002). Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal*, 19(7-9), 433-440.
- Leighton, G., & Williams Jr, D.C. (2019). The Methyl-CpG Binding Domain 2 and 3 proteins and formation of the Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex. *Journal of molecular biology*.
- Leonard, S.M., Wei, W., Collins, S.I., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., Young, L.S., Roberts, S., & Woodman, C.B. (2012). Oncogenic human

- papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33(7), 1286-1293.
- Li, C., Xiong, W., Liu, X., Xiao, W., Guo, Y., Tan, J., & Li, Y. (2019). Hypomethylation at non-CpG/CpG sites in the promoter of HIF-1 α gene combined with enhanced H3K9Ac modification contribute to maintain higher HIF-1 α expression in breast cancer. *Oncogenesis*, 8(4), 1-18.
- Li, J., Sutter, C., Parker, D.S., Blauwkamp, T., Fang, M., & Cadigan, K.M. (2007). CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *The EMBO journal*, 26(9), 2284-2294.
- LI, L., LI, Z., & WANG, Y.-I. (2007). The expression of acetylation at Lys9 of histone H3 in epithelial ovarian tumors and its clinical significanc. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 4.
- Li, N., Li, Y., Lv, J., Zheng, X., Wen, H., Shen, H., Zhu, G., Chen, T.-Y., Dhar, S.S., & Kan, P.-Y. (2016). ZMYND8 reads the dual histone mark H3K4me1-H3K14ac to antagonize the expression of metastasis-linked genes. *Molecular cell*, 63(3), 470-484.
- Li, Y., Sun, W., Sun, D., & Yin, D. (2019). Ras–ERK1/2 signaling promotes the development of uveal melanoma by downregulating H3K14ac. *Journal of cellular physiology*, 234(9), 16011-16020.
- Liang, C.-C., Li, C.-S., Weng, I.-C., Chen, H.-Y., Lu, H.-H., Huang, C.-C., & Liu, F.-T. (2018). Galectin-9 Is Critical for Mucosal Adaptive Immunity through the T Helper 17–IgA Axis. *The American journal of pathology*, 188(5), 1225-1235.
- Liang, M., Ueno, M., Oomizu, S., Arikawa, T., Shinonaga, R., Zhang, S., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2008). Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(8), 899-907.
- Liao, L., Alicea-Velázquez, N.L., Langbein, L., Niu, X., Cai, W., Cho, E.A., Zhang, M., Greer, C.B., Yan, Q., & Cosgrove, M.S. (2019). High affinity binding of H3K14ac through collaboration of bromodomains 2, 4 and 5 is critical for the molecular and tumor suppressor functions of PBRM 1. *Molecular oncology*, 13(4), 811-828.
- Liu, F.-T., Patterson, R.J., & Wang, J.L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572(2-3), 263-273.
- Liu, F.-T., & Rabinovich, G.A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 29-41.
- Liu, X., Zhou, P., Fan, F., Li, D., Wu, J., Lu, Y., & Luo, Y. (2016). CpG site methylation in CRYAA promoter affect transcription factor Sp1 binding in human lens epithelial cells. *BMC ophthalmology*, 16(1), 141.
- Liu, Y., Liu, Z., Fu, Q., Wang, Z., Fu, H., Liu, W., Wang, Y., & Xu, J. (2017). *Galectin-9 as a prognostic and predictive biomarker in bladder urothelial carcinoma*. Paper presented at the Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.
- Lodish, H., Berk, A., Darnell, J.E., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*: Macmillan.
- Lorch, Y., & Kornberg, R.D. (2017). Chromatin-remodeling for transcription. *Quarterly reviews of biophysics*, 50.
- Lorsbach, R., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S., Mukatira, S., & Downing, J. (2003). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t (10; 11)(q22; q23). *Leukemia*, 17(3), 637-641.
- Loughran, S.J., Comoglio, F., Hamey, F.K., Giustacchini, A., Errami, Y., Earp, E., Göttgens, B., Jacobsen, S.E.W., Mead, A.J., & Hendrich, B. (2017). Mbd3/NuRD controls lymphoid cell fate and inhibits tumorigenesis by repressing a B cell transcriptional program. *Journal of Experimental Medicine*, 214(10), 3085-3104.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y., & Almouzni, G. (2009). The HP1 α –CAF1–SetDB1-containing complex provides

- H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports*, 10(7), 769-775.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., & Bird, A.P. (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes & development*, 8(19), 2282-2292.
- Madrigal, P., & Alasoo, K. (2018). AP-1 takes centre stage in enhancer chromatin dynamics. *Trends in cell biology*, 28(7), 509-511.
- Martin, C.M., & O'Leary, J.J. (2011). Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(5), 605-615.
- Mashtalir, N., D'Avino, A.R., Michel, B.C., Luo, J., Pan, J., Otto, J.E., Zullo, H.J., McKenzie, Z.M., Kubiak, R.L., & Pierre, R.S. (2018). Modular organization and assembly of SWI/SNF family chromatin remodeling complexes. *Cell*, 175(5), 1272-1288. e1220.
- Matsuura, A., Tsukada, J., Mizobe, T., Higashi, T., Mouri, F., Tanikawa, R., Yamauchi, A., Hirashima, M., & Tanaka, Y. (2009). Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. *Genes to Cells*, 14(4), 511-521.
- Máximo-Sánchez, D. (2016). *Análisis de expresión de galectina-9 en células de cáncer de cérvix*.
- Mayes, K., Qiu, Z., Alhazmi, A., & Landry, J.W. (2014). ATP-dependent chromatin remodeling complexes as novel targets for cancer therapy *Advances in cancer research* (Vol. 121, pp. 183-233): Elsevier.
- McLain, A.T., & Faulk, C. (2018). The evolution of CpG density and lifespan in conserved primate and mammalian promoters. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 561.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., & Bird, A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, 58(3), 499-507.
- Meijer, C.J., Snijders, P.J., & Castle, P.E. (2006). Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecologic oncology*, 103(1), 12-17.
- Melo, A., Montenegro, S., Hooper, T., Capurro, I., Roa, J.C., & Roa, I. (2003). Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX región-Chile. *Revista médica de Chile*, 131(12), 1382-1390.
- Micevic, G., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. (2017). Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. *Clinical epigenetics*, 9(1), 34.
- Miyajima, A., Furihata, T., & Chiba, K. (2009). Functional analysis of GC Box and its CpG methylation in the regulation of CYP1A2 gene expression. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(3), 269-276.
- Miyaniishi, N., Nishi, N., Abe, H., Kashio, Y., Shinonaga, R., Nakakita, S.-i., Sumiyoshi, W., Yamauchi, A., Nakamura, T., & Hirashima, M. (2007). Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. *Glycobiology*, 17(4), 423-432.
- Moody, C.A., & Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25), 8905-8909.
- Mosashvilli, D., Kahl, P., Mertens, C., Holzapfel, S., Rogenhofer, S., Hauser, S., Büttner, R., Von Ruecker, A., Müller, S.C., & Ellinger, J. (2010). Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer science*, 101(12), 2664-2669.
- Nair, V.S., Toor, S.M., Taha, R.Z., Shaath, H., & Elkord, E. (2018). DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer. *Clinical epigenetics*, 10(1), 1-9.

- Network, C.G.A.R. (2017). Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, 543(7645), 378-384.
- Nominé, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckère, F., Sibler, A.-P., Desplancq, D., Atkinson, R.A., & Weiss, E. (2006). Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular cell*, 21(5), 665-678.
- Oka, M., Rodić, N., Graddy, J., Chang, L.-J., & Terada, N. (2006). CpG sites preferentially methylated by Dnmt3a in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9901-9908.
- OMS. (2018). Cervical Cancer, from <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>
- OMS. (2019). Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
- Oncology, F.C.o.G. (2014). FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 125(2), 97-98.
- Pan, Y., Liu, G., Zhou, F., Su, B., & Li, Y. (2018). DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clinical and experimental medicine*, 18(1), 1-14.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., & McCance, D.J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO journal*, 18(18), 5061-5072.
- Pearson, M.J., Bik, M.A., Ospelt, C., Naylor, A.J., Wehmeyer, C., Jones, S.W., Buckley, C.D., Gay, S., Filer, A., & Lord, J.M. (2018). Endogenous Galectin-9 suppresses apoptosis in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
- Philp, L., Jembere, N., Wang, L., Gao, J., Maguire, B., & Kupets, R. (2018). Pap tests in the diagnosis of cervical cancer: Help or hinder? *Gynecologic oncology*, 150(1), 61-66.
- Ponnaluri, V.C., Estève, P.-O., Ruse, C.I., & Pradhan, S. (2018). S-adenosylhomocysteine hydrolase participates in DNA methylation inheritance. *Journal of molecular biology*, 430(14), 2051-2065.
- Popa, S.J., Stewart, S.E., & Moreau, K. (2018). *Unconventional secretion of annexins and galectins*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Price, A.J., Manjegowda, M.C., Kain, J., Anandh, S., & Bochkis, I.M. (2019). Hdac3, Setdb1, and Kap1 mark H3K9me3/H3K14ac bivalent regions in young and aged liver. *Aging Cell*, e13092.
- Punt, S., Thijssen, V.L., Vrolijk, J., De Kroon, C.D., Gorter, A., & Jordanova, E.S. (2015). Galectin-1,-3 and-9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *PLoS one*, 10(6).
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., & Vasta, G.R. (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology*, 17(5), 513-520.
- Rasmussen, K.D., & Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes & development*, 30(7), 733-750.
- Rauscher, G.H., Kresovich, J.K., Poulin, M., Yan, L., Macias, V., Mahmoud, A.M., Al-Alem, U., Kajdacsy-Balla, A., Wiley, E.L., & Tonetti, D. (2015). Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation. *BMC cancer*, 15(1), 816.
- Ribeiro-Silva, C., Vermeulen, W., & Lans, H. (2019). SWI/SNF: complex complexes in genome stability and cancer. *DNA repair*.
- Roe, J.-S., Hwang, C.-I., Somerville, T.D., Milazzo, J.P., Lee, E.J., Da Silva, B., Maiorino, L., Tiriác, H., Young, C.M., & Miyabayashi, K. (2017). Enhancer reprogramming promotes pancreatic cancer metastasis. *Cell*, 170(5), 875-888. e820.
- Ropero, S., & Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology*, 1(1), 19-25.

- Sabari, B.R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H.E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J.R., & Zhao, Y. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone cronylation. *Molecular cell*, *58*(2), 203-215.
- Sakkal, S., Miller, S., Apostolopoulos, V., & Nurgali, K. (2016). Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable? *Current medicinal chemistry*, *23*(7), 650-666.
- Salah Ud-Din, A.I.M., Tikhomirova, A., & Roujeinikova, A. (2016). Structure and functional diversity of GCN5-related N-acetyltransferases (GNAT). *International journal of molecular sciences*, *17*(7), 1018.
- Salud, S.d. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la Prevención, Tratamiento y Control de Cáncer del Cuello del Útero y de la Mama en la Atención Primaria: NOM-014-SSA2-1994: Secretaría de Salud ^ eMéxico México.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1412-1417.
- Schaefer, M., & Lyko, F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, *119*(1), 35-40.
- Schär, P., & Fritsch, O. (2011). DNA repair and the control of DNA methylation *Epigenetics and Disease* (pp. 51-68): Springer.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., & Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, *63*(6), 1129-1136.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, *370*(9590), 890-907.
- Sideras, K., Biermann, K., Verheij, J., Takkenberg, B.R., Mancham, S., Hansen, B.E., Schutz, H.M., de Man, R.A., Sprengers, D., & Buschow, S.I. (2017). PD-L1, Galectin-9 and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology*, *6*(2), e1273309.
- Smallwood, S.A., & Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics*, *28*(1), 33-42.
- Smith-Roe, S.L., Nakamura, J., Holley, D., & Chastain, P.D. (2015). SWI/SNF complexes are required for full activation of the DNA-damage response. *Oncotarget*, *6*(2), 732.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., & Wright Jr, T. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, *287*(16), 2114-2119.
- Su, Z., Liu, G., Song, X., Liang, B., Chang, X., & Huang, D. (2016). CpG island evolution in the mammalian DHRS4 gene cluster and its role in the regulation of gene transcription. *Genetics and Molecular Research*, *15*(2).
- Subbaiah, V.K., Zhang, Y., Rajagopalan, D., Abdullah, L., Yeo-Teh, N., Tomaić, V., Banks, L., Myers, M.P., Chow, E., & Jha, S. (2016). E3 ligase EDD1/UBR5 is utilized by the HPV E6 oncogene to destabilize tumor suppressor TIP60. *Oncogene*, *35*(16), 2062.
- Suzuki, K., Furuhashi, M., Kawamura, T., Kubo, M., Osato, K., & Yamawaki, T. (2017). Comparing Papanicolaou test results obtained during pregnancy and post-partum. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *43*(4), 705-709.
- Tahara, T., & Arisawa, T. (2015). DNA methylation as a molecular biomarker in gastric cancer. *Epigenomics*, *7*(3), 475-486.
- Takahashi, J.S. (2015). Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *17*, 6-11.
- Takano, J., Morishita, A., Fujihara, S., Iwama, H., Kokado, F., Fujikawa, K., Fujita, K., Chiyo, T., Tadokoro, T., & Sakamoto, T. (2016). Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro. *Oncology reports*, *35*(2), 851-860.
- Tan, A.Y., & Manley, J.L. (2009). The TET family of proteins: functions and roles in disease. *Journal of molecular cell biology*, *1*(2), 82-92.

- Tang, Q., Cheng, J., Cao, X., Surowy, H., & Burwinkel, B. (2016). Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clinical epigenetics*, 8(1), 115.
- Tanikawa, R., Tanikawa, T., Okada, Y., Nakano, K., Hirashima, M., Yamauchi, A., Hosokawa, R., & Tanaka, Y. (2008). Interaction of Galectin-9 With Lipid Rafts Induces Osteoblast Proliferation Through the c-Src/ERK Signaling Pathway. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(2), 278-286.
- Thijssen, V.L., Heusschen, R., Caers, J., & Griffioen, A.W. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1855(2), 235-247.
- Thomas, M.C., & Chiang, C.-M. (2005). E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Molecular cell*, 17(2), 251-264.
- Tian, P., Zhu, Y., Zhang, C., Guo, X., Zhang, P., & Xue, H. (2018). Ras-ERK1/2 signaling contributes to the development of colorectal cancer via regulating H3K9ac. *BMC cancer*, 18(1), 1-10.
- Tjeertes, J.V., Miller, K.M., & Jackson, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal*, 28(13), 1878-1889.
- Torchy, M.P., Hamiche, A., & Klaholz, B.P. (2015). Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(13), 2491-2507.
- Türeci, Ö., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., & Sahin, U. (1997). Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6416-6422.
- UK, C.R. (2018). Cervical cancer: types and grades., from <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cervical-cancer/stages-types-grades/types-and-grades>
- van Nuland, R., Schram, A.W., van Schaik, F.M., Jansen, P.W., Vermeulen, M., & Timmers, H.M. (2013). Multivalent engagement of TFIIID to nucleosomes. *PloS one*, 8(9).
- Van Tongelen, A., Lorient, A., & De Smet, C. (2017). Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer letters*, 396, 130-137.
- VanDemark, A.P., Kasten, M.M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., & Cairns, B.R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Molecular cell*, 27(5), 817-828.
- Vilkaitis, G., Suetake, I., Klimašauskas, S., & Tajima, S. (2005). Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 64-72.
- Vizcaino, A.P., Moreno, V., Bosch, F.X., MUNoz, N., Barros-Dios, X.M., Borrás, J., & Parkin, D.M. (2000). International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer*, 86(3), 429-435.
- Vizcaíno, C., Mansilla, S., & Portugal, J. (2015). Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, 152, 111-124.
- Vladoiu, M.C., Labrie, M., & St-Pierre, Y. (2014). Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy. *International journal of oncology*, 44(4), 1001-1014.
- Wade, P.A. (2001). Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene*, 20(24), 3166-3173.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., & Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 189(1), 12-19.

- Wang, B., Wang, P., Parobchak, N., Treff, N., Tao, X., Wang, J., & Rosen, T. (2019). Integrated RNA-seq and ChIP-seq analysis reveals a feed-forward loop regulating H3K9ac and key labor drivers in human placenta. *Placenta*, *76*, 40-50.
- Wang, G.G., Allis, C.D., & Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in molecular medicine*, *13*(9), 373-380.
- Wang, J.L., Gray, R.M., Haudek, K.C., & Patterson, R.J. (2004). Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1673*(1-2), 75-93.
- Wang, L., Zhao, Y., Wang, Y., & Wu, X. (2018). The Role of Galectins in Cervical Cancer Biology and Progression. *BioMed research international*, *2018*.
- Wapenaar, H., & Dekker, F.J. (2016). Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clinical epigenetics*, *8*(1), 59.
- Webber, L.P., Wagner, V.P., Curra, M., Vargas, P.A., Meurer, L., Carrard, V.C., Squarize, C.H., Castilho, R.M., & Martins, M.D. (2017). Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*, *71*(2), 278-286.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*, *39*(4), 457.
- West, A.C., & Johnstone, R.W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of clinical investigation*, *124*(1), 30-39.
- Wienholz, B.L., Karetka, M.S., Moarefi, A.H., Gordon, C.A., Ginno, P.A., & Chédin, F. (2010). DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. *PLoS genetics*, *6*(9).
- Wierstra, I. (2008). Sp1: emerging roles-beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *372*, 1-13.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer letters*, *277*(1), 8-21.
- Wu, H., & Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, *156*(1-2), 45-68.
- Wu, J.C., & Santi, D. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(10), 4778-4786.
- Wu, M.-M., Li, C.-F., Lin, L.-F., Wang, A.S.-S., Pu, Y.-S., Wang, H.-H., Mar, A.-C., Chen, C.-J., & Lee, T.-C. (2017). Promoter hypermethylation of LGALS4 correlates with poor prognosis in patients with urothelial carcinoma. *Oncotarget*, *8*(14), 23787.
- Wu, Q., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S., Nickerson, J.A., & Imbalzano, A.N. (2017). The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics*, *9*(6), 919-931.
- Xi, Y., & Li, W. (2009). BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPPING program. *BMC bioinformatics*, *10*(1), 232.
- Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Nishi, N., Yokomise, H., & Hirashima, M. (2006). Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *The breast journal*, *12*, S196-S200.
- Yang, J., Zhang, X., Blumenthal, R.M., & Cheng, X. (2019). JMB Special Issue on “Reading DNA and RNA methylation” Detection of DNA modifications by sequence-specific transcription factors. *Journal of molecular biology*.
- Yang, Q., Jiang, W., Zhuang, C., Geng, Z., Hou, C., Huang, D., Hu, L., & Wang, X. (2015). microRNA-22 downregulation of galectin-9 influences lymphocyte apoptosis and tumor cell proliferation in liver cancer. *Oncology reports*, *34*(4), 1771-1778.
- Yang, R.-Y., Rabinovich, G.A., & Liu, F.-T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*, *10*.
- Yeung, A., Lam, C., Tsang, W.P., Tsang, T.Y., Co, N.N., Yau, P.L., & Kwok, T.T. (2010). HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncology reports*, *24*(6), 1599-1604.

- Yildirim, O., Li, R., Hung, J.-H., Chen, P.B., Dong, X., Ee, L.-S., Weng, Z., Rando, O.J., & Fazio, T.G. (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*, *147*(7), 1498-1510.
- Yu, N., Guo, X., Zelikovsky, A., & Pan, Y. (2017). GaussianCpG: a Gaussian model for detection of CpG island in human genome sequences. *BMC genomics*, *18*(4), 392.
- Zeng, S., Wang, Y., Zhang, T., Bai, L., Wang, Y., & Duan, C. (2017). E3 ligase UHRF2 stabilizes the acetyltransferase TIP60 and regulates H3K9ac and H3K14ac via RING finger domain. *Protein & cell*, *8*(3), 202-218.
- Zhang, J., Zhou, C., Jiang, H., Liang, L., Shi, W., Zhang, Q., Sun, P., Xiang, R., Wang, Y., & Yang, S. (2017). ZEB1 induces ER- α promoter hypermethylation and confers antiestrogen resistance in breast cancer. *Cell death & disease*, *8*(4), e2732-e2732.
- Zhang, L., Dai, Z., Yu, J., & Xiao, M. (2020). CpG-island-based annotation and analysis of human housekeeping genes. *Briefings in Bioinformatics*.
- Zhang, L., Tian, S., Pei, M., Zhao, M., Wang, L., Jiang, Y., Yang, T., Zhao, J., Song, L., & Yang, X. (2019). Crosstalk between histone modification and DNA methylation orchestrates the epigenetic regulation of the costimulatory factors, Tim-3 and galectin-9, in cervical cancer. *Oncology reports*, *42*(6), 2655-2669.
- Zhang, T., Zhao, L., Zeng, S., Bai, L., Chen, J., Zhang, Z., Wang, Y., & Duan, C. (2017). UHRF2 decreases H3K9ac expression by interacting with it through the PHD and SRA/YDG domain in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *International journal of molecular medicine*, *39*(1), 126-134.
- Zhang, W., Liu, Z., Crombet, L., Amaya, M.F., Liu, Y., Zhang, X., Kuang, W., Ma, P., Niu, L., & Qi, C. (2011). Crystal structure of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of human methyl-CpG-binding protein MBD4. *Biochemical and biophysical research communications*, *412*(3), 425-428.
- Zhang, Z.-Y., Dong, J.-H., Chen, Y.-W., Wang, X.-Q., Li, C.-H., Wang, J., Wang, G.-Q., Li, H.-L., & Wang, X.-D. (2012). Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *13*(6), 2503-2509.
- Zhao, Y., Fang, X., Wang, Y., Zhang, J., Jiang, S., Liu, Z., Ma, Z., Xu, L., Li, E., & Zhang, K. (2014). Comprehensive analysis for histone acetylation of human colon cancer cells treated with a novel HDAC inhibitor. *Current pharmaceutical design*, *20*(11), 1866-1873.
- Zhen, L., Gui-Lan, L., Ping, Y., Jin, H., & Ya-Li, W. (2010). The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance. *International Journal of Gynecologic Cancer*, *20*(1), 82-86-82-86.
- Zhou, Z., Li, H.-Q., & Liu, F. (2018). DNA methyltransferase inhibitors and their therapeutic potential. *Current topics in medicinal chemistry*, *18*(28), 2448-2457.
- Zhu, B., Zheng, Y., Angliker, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M., & Jost, J.-P. (2000). 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic acids research*, *28*(21), 4157-4165.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., & Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology*, *6*(12), 1245-1252.
- Zhu, Q., & Belden, W.J. (2020). Molecular Regulation of Circadian Chromatin. *Journal of molecular biology*.
- Zhu, W.-G., Srinivasan, K., Dai, Z., Duan, W., Druhan, L.J., Ding, H., Yee, L., Villalona-Calero, M.A., Plass, C., & Otterson, G.A. (2003). Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21Cip1 promoter. *Molecular and cellular biology*, *23*(12), 4056-4065.

- Zhu, X., Ding, M., Yu, M.-L., Feng, M.-X., Tan, L.-J., & Zhao, F.-K. (2010). Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC cancer*, *10*(1), 290.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.-U., & O'Connor, M.J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of virology*, *73*(8), 6209-6219.

ANEXO 1

Este trabajo de investigación fue presentado en dos congresos, como se anexa a continuación:

- **5to Congreso Latinoamericano de Glicobiología. Ciudad de México (Octubre, 2019).**



The Latin American Society of Glycobiology and the Cell Dynamics Research Center of the Morelos State Autonomous University

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

We hereby certify that:

Armenta-Castro E.R., Conde-Rodríguez I., Ramírez-Díaz I., Delgado-López G., Jave-Suárez L.F., Aguilar-Lemarroy A., Gutiérrez-Quiroz C.T., Herrera-Camacho I., Vallejo-Ruiz V.

Presented the poster:

Determination of epigenetic modifications in LGALS9 promoter and the relationship with its expression in cervical cancer.

At the 5th Latin American Congress of Glycobiology and 2nd Meeting of the Glycoscience in Health Thematic Network held on October 2-4, 2019 in Mexico City, Mexico.

Iván Martínez Duncker R.
President of the Latin American Society for Glycobiology
Head of the Glycoscience in Health Thematic Network CONACYT

Carla Asteggiano
Organizing committee

Edga Zenteno Galindo
Organizing committee

Héctor Mora Montes
Organizing committee

Roberta Salinas Marín
Organizing committee

Tonatiuh Ramírez Reivich
Organizing committee

Verónica Vallejo Ruiz
Organizing committee



- **6ta reunión del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer. Puebla, Puebla (Octubre, 2019).**

RESUMEN.

Determinación de modificaciones epigenéticas en el promotor del gen de Gal-9 y la relación con su nivel de expresión en cáncer cervicouterino

Erick Ricardo Armenta Castro, Ileana Conde Rodríguez, Ivonne Ramírez Díaz, Guadalupe Delgado López, Luis Felipe Jave Suárez, Adriana Aguilar Lemarroy, Claudia Teresita Gutiérrez Quiroz, Irma Herrera Camacho, Verónica Vallejo Ruiz.

Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), IMSS. HGZ No. 5 km 4.5 carretera federal Atlixco-Metepec C.P. 74360 Metepec, Puebla, México. Tel. (244) 4 44 0122. erick.armenta03@gmail.com

Antecedentes. El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en países en vías de desarrollo. Las alteraciones en mecanismos epigenéticos en el cáncer como hipermetilación del DNA y desregulaciones en acetilación de histonas en algunos promotores han sido descritos en los últimos años, y se ha relacionado con progresión de tumores. Galectina-9 (Gal-9), codificada por el gen *LGALS9*, es una proteína con funciones antitumorales y su baja expresión se ha asociado con un mal pronóstico en CaCu. Hasta la fecha no hay estudios acerca de los factores que modifican la expresión de Gal-9.

Objetivo. Determinar modificaciones epigenéticas en el promotor *LGALS9* y relacionarlo con el nivel de expresión de Gal-9, en líneas celulares y biopsias de CaCu.

Hipótesis. En el CaCu existe una disminución de expresión de Gal-9 que se relaciona con alteraciones epigenéticas en el promotor *LGALS9*, tales como hipermetilación del DNA y desregulación en acetilación de histonas adyacentes a esta región.

Conclusiones y perspectivas. La pérdida de acetilación en H3K9 se relaciona con una disminución de expresión en Gal-9 en líneas celulares asociadas a CaCu. La baja expresión de Gal-9 en tejido de CaCu podría estar relacionada a esta pérdida de acetilación. Se espera encontrar regiones hipermetiladas de DNA en el promotor de *LGALS9* en líneas celulares y biopsias de CaCu.

ANEXO 2

Este trabajo fue sometido para publicación en FEBS OpenBio, siendo publicado el 9 de septiembre de 2020.

Nombre del artículo: Histone H3K9 and H3K14 acetylation at the promoter of the *LGALS9* gene are associated with mRNA levels in cervical cancer cells

Autores: Erick Armenta-Castro, Tania Reyes-Vallejo, Daniel Máximo-Sánchez, Irma Herrera-Camacho, Gustavo López-López, Sandra Reyes-Carmona, Ileana Conde-Rodríguez, Ivonne Ramírez-Díaz, Adriana Aguilar-Lemarroy, Luis Felipe Jave-Suárez, Lorena Milflores-Flores, Gerardo Santos-Lopez, Julio Reyes-Leyva, Verónica Vallejo-Ruiz

Revista: FEBS Open Bio



RESEARCH ARTICLE |  Open Access |  

Histone H3K9 and H3K14 acetylation at the promoter of the *LGALS9* gene are associated with mRNA levels in cervical cancer cells

Erick Armenta-Castro, Tania Reyes-Vallejo, Daniel Máximo-Sánchez, Irma Herrera-Camacho, Gustavo López-López, Sandra Reyes-Carmona, Ileana Conde-Rodríguez ... [See all authors](#) ▾

First published: 09 September 2020 | <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12973>