

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

**“CARACTERIZACIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA DE LOS  
PROMOTORES GÉNICOS *CTCF* Y *BORIS* EN CÁNCER DE OVARIO  
Y MAMA”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

**DRA. DANIELA MORALES ESPINOSA**

ASESOR DE TESIS:

**DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS**  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS “D”  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CO-TUTORES DE TESIS:

**DR. DAN GREEN RENNER**  
PROFESOR TITULAR DE ONCOLOGÍA MÉDICA  
CENTRO ONCOLÓGICO “DIANA LAURA RIOJAS DE COLOSIO”  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

**DRA. GABRIELA ALVARADO LUNA**  
PROFESOR ADJUNTO DE ONCOLOGÍA MÉDICA  
CENTRO ONCOLÓGICO “DIANA LAURA RIOJAS DE COLOSIO”  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

MÉXICO, D.F. 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Dan Green Renner**  
Profesor Titular del Curso de Especialización en  
Oncología Médica  
Fundación Clínica Médica Sur

**Dr. Octavio González Chon**  
Director Académico  
Fundación Clínica Médica Sur.

**Dr. Ernesto Soto-Reyes Solís**  
Asesor de Tesis  
Investigador en Ciencias Médicas “D”  
Instituto Nacional de Cancerología

## **AGRADECIMIENTOS:**

Antes que todo, quiero agradecer a mis padres. No sería en lo absoluto nada, ni estaría en este camino de no ser por ustedes; nunca han dejado de creer en mí y de apoyarme. Son unas personas increíbles e incansables, los adoro. Gracias por acompañarme en estos 14 años de desvelos, guardias, noches interminables de lectura, cambios de humor, accidentes de auto, viajes...Por levantarse conmigo como si tuvieran que pasar visita al igual que yo y por pasar mis guardias en vela. Este título no sólo es mío, es suyo también. Daddy y Marge, son un gran ejemplo. Espero no defraudarlos. A mi hermana, por ser una eterna soñadora.

A Ernesto ("Flerny") por ser la PIEDRA ANGULAR de este trabajo (¡lo prometido!). No existen palabras suficientes para agradecerte todas las enseñanzas, el tiempo, la paciencia (¡vaya que sí!) y sobre todo tu sincera amistad. Doce años se dice fácil; pero ambos sabemos lo que implican. Por siempre, GRACIAS.

Al Dr. Luis Herrera por haberme brindado la increíble oportunidad de estar en su laboratorio, por su tiempo y por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Clementina Castro por todos sus secretos "biomédicos"; pero sobretodo por su calidez y sincero cariño. Tú me conoces "desde chiquita" y eres parte del resultado final. ¡Mil gracias!

A DC por siempre hacernos reír... jajajaja. En verdad, muchísimas gracias por su apoyo en este proyecto y por enseñarme que la humildad es básica en "este negocio". ¡Es usted un tipazo!

A todos en el laboratorio de carcinogénesis, principalmente a Ilos, Fer y Diego. ¡Los quiero!

Al Dr. Ricardo Sosa por sus múltiples enseñanzas en el tiempo que tuve la fortuna de ser su alumna. "¡Ánimo, mis valientes!". Espero algún día ser por lo menos un poquito como usted, Maestro.

A OGAR "Mi Tutti", gracias a ti elegí el camino de la mejor especialidad (oncología médica y no radio-onco, ehh!). Te debo la vida y más. Sobretodo, gracias por todo lo que me has enseñado y por tantos años de amistad.

A Gaby por no perder la fe en mí y apoyarme cuando lo he necesitado.

A Dan no me queda más que decirte que no todo ha sido malo. Aunque no lo creas, hay ciertas cosas que me has enseñado desde que era estudiante. Gracias.

Al Dr. Chon (“papá Chon”) y a Sandra García, han sido una parte importantísima para mí en estos 7 años en Médica Sur. Los quiero muchísimo.

A mis compañeros, en particular a Matus por su apoyo incondicional y por aguantarme todos estos años.

A Ale, porque los amigos son los hermanos que uno elige. Te quiero montones y montones, Amiba.

Especialmente quiero agradecerle a Valery (“Wolverine”): eres una persona increíble y sumamente fuerte. Gracias por tu amistad y por ser mi confidente. No se me olvida que “la familia no son sólo aquellos que comparten tu misma sangre”.

A Carlos, mi adorada güerita. No sabes lo importante que has sido para mí... de todo corazón, mil-mil-mil gracias. ¡TQ!

*Daniela Morales Espinosa  
Agosto 2012*

## Resumen

**Antecedentes:** El cáncer es un problema de salud pública tanto a nivel mundial, como en nuestro país. El pronóstico de las enfermedades oncológicas no depende únicamente del estadio en el que se diagnostiquen; sino de la identificación de otros factores pronósticos moleculares. Dentro de su desarrollo se encuentran los factores genéticos y epigenéticos. La epigenética se define como cambios en los patrones de expresión de un gen sin que se presenten modificaciones en la secuencia del DNA. En cáncer, múltiples procesos epigenéticos se encuentran desregulados, entre ellos la metilación del DNA. Se ha observado una hipometilación a nivel global y una hipermetilación a nivel local; en particular, en genes asociados con el control del ciclo celular, entre ellos, genes supresores de tumores. Se ha propuesto al factor nuclear *CTCF* como un nuevo gen supresor de tumor. A este factor se le ha asociado como un protector del DNA al evitar la metilación aberrante. El gen *CTCF* presenta un gen parálogo conocido como *CTCFL (BORIS)*. Éste – al contrario de *CTCF* – no tiene la capacidad de proteger al DNA en contra de la metilación aberrante derivando en un silenciamiento génico. De manera normal, *BORIS* se expresa en tejido testicular durante la espermatogénesis. De manera anormal, se ha observado sobreexpresado en múltiples neoplasias como melanoma, cánceres ginecológicos, glioblastomas y recientemente cáncer de mama. Debido a que los componentes epigenéticos pueden afectar a la expresión de los genes, una interrogante de este trabajo es el conocer si la metilación del DNA está involucrada en la desregulación de la expresión de los genes *CTCF* y *BORIS* en cáncer de mama y ovario.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio es caracterizar el estado de metilación del DNA de los promotores génicos *CTCF* y *BORIS* a partir de biopsias de tumores de cáncer de ovario, cáncer de mama y tejido sano; y correlacionarlo con su expresión.

**Resultados:** Se obtuvieron de manera prospectiva 8 muestras de cáncer de ovario, 16 muestras de cáncer de mama y 10 muestras de tejido mamario adyacente al tumor. En tejido no neoplásico, *BORIS* se encontró hipermetilado. En las muestras de cáncer de ovario, se observaron cambios en el estado de metilación. Se observó una desmetilación de este promotor en el 75% de las muestras. Este mismo fenómeno se observó representado en cáncer de mama en el 68% de las muestras estudiadas en comparación con tejido no neoplásico. Al analizar la expresión de *BORIS* mediante RT-PCR en tiempo real se encontró una correlación entre la pérdida de metilación y la sobre-expresión del gen; sugiriendo que la metilación es un fenómeno epigenético asociado con la sobre-expresión del oncogen *BORIS*. En el análisis de metilación del promotor de *CTCF*, no se observaron cambios entre el tejido neoplásico y el tejido normal; proponiendo que los cambios epigenéticos afectan principalmente a *BORIS*.

**Conclusiones:** La pérdida de metilación es un fenómeno epigenético asociado principalmente a neoplasias. Esta metilación fomenta la sobre-expresión de los oncogenes, principalmente de *BORIS*. A su vez, esto está asociado con incremento en la expresión del promotor de este gen. El promotor de *CTCF* se encontró no metilado tanto en neoplasias como en tejido sano, sugiriendo que los cambios a nivel de metilación afectan a *BORIS*. No se observaron diferencias en el estado de metilación de *BORIS* en leucocitos de sangre periférica; por lo que la

determinación del estado de metilación de *BORIS* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama *no* es útil como biomarcador.



## **Abstract**

**Background:** Cancer constitutes a public health problem worldwide and in our country. The prognosis of oncologic diseases does not only depend of the stage they are diagnosed in; but also of the identification of molecular prognostic factors. There are genetic and epigenetic factors involved in the development of cancer. Epigenetics are defined as the changes in a gene's expression pattern without modifications in its DNA sequence. In cancer, multiple epigenetic processes are deregulated; DNA methylation among them. Global hypomethylation and local hypermethylation, particularly in cell cycle control-associated genes; such as tumor suppressor genes has been observed. The nuclear factor *CTCF* has been proposed as a new tumor suppressor gene. This factor has been associated as a DNA protector to avoid aberrant methylation. *CTCF* presents a paralogue gene known as *CTCFL (BORIS)*. This – as opposite to *CTCF* – does not have the capacity to protect against aberrant methylation, leading to genetic silencing. Normally, *BORIS* is expressed in testicular tissue during spermatogenesis. Abnormally, its over-expression has been identified in multiple neoplasms such as melanoma, gynecological cancer, glioblastoma and – recently – breast cancer.

Since epigenetic components may affect gene expression, one of the questions of this work is to determine if DNA methylation is involved in the deregulation of the expression of the genes *CTCF* and *BORIS* in breast and ovarian cancer.

**Objective:** The aim of this study is to characterize the methylation state of the genic promoters *CTCF* and *BORIS* in samples from breast cancer, cancer of the ovary and non-neoplastic tissue; and correlate it to its expression.

**Results:** A total of 8 ovarian cancer, 16 breast cancer and 10 tumor-adjacent breast tissue were prospectively obtained. In non-neoplastic tissue, *BORIS* was found to be hypermethylated. In the ovarian cancer samples, changes in the methylation pattern were observed. This promoter was de-methylated in 75% of the samples. The same phenomenon was observed in 68% of the studied breast cancer samples when compared to non-neoplastic tissue. When analyzing *BORIS* expression by real time RT-PCR, we found a correlation between the loss of methylation and the over-methylation of the gene; thus suggesting that methylation is an epigenetic phenomenon associated to the over-expression of the oncogene *BORIS*. The methylation analysis of the promoter of *CTCF* did not show any differences between the neoplastic and normal tissues; thus proposing that epigenetic changes mainly affect *BORIS*.

**Conclusions:** Loss of methylation is an epigenetic phenomenon associated mainly to neoplasms. This methylation promotes the over-expression of oncogenes, especially of *BORIS*. This is also associated to the expression of the promoter of this gene. The promoter of *CTCF* was found non-methylated in both neoplastic and non-neoplastic tissue; suggesting that methylation changes affect mainly *BORIS*. No differences were found regarding methylation of *BORIS* in peripheral white blood cells; therefore, the determination of the methylation state of *BORIS* in peripheral white blood cells of breast cancer patients is not useful as a biomarker.

## Índice

I	Introducción	1
II	Marco Teórico	4
II a	Epigenética	5
	Las islas CpG	13
	La metilación y el cáncer	15
II b	CTCF	17
II c	BORIS (CTCFL)	19
III	Planteamiento de Tesis	23
III a	Pregunta de investigación	23
	Planteamiento del problema	24
	Hipótesis	25
	Objetivos	26
	Diseño del estudio	27
	Análisis estadístico	30
IV	Resultados	34
V	Discusión	45
VI	Conclusiones	48
VII	Referencias	49

## I INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte asociada a cáncer en mujeres a nivel mundial con una incidencia anual estimada de 1,383,500 casos y mortalidad del 33%. En los Estados Unidos de América, las estadísticas más recientes reportaron 226,870 nuevos casos con una mortalidad del 14% (39,510 casos nuevos) (Siegel *et al*, 2012).

El pronóstico de esta neoplasia depende de varios factores tales como: estadio, edad al diagnóstico, grado de diferenciación, proliferación celular, sobreexpresión de *HER2/neu* (Keyormarsi 2002), expresión de receptores de estrógenos y progestágenos, entre otros. La identificación de estos factores pronósticos constituye la base de algunas modalidades terapéuticas de la actualidad como terapias dirigidas contra el receptor de HER2 (Slamon *et al*, 2001) o el tratamiento hormonal adyuvante / paliativo con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa (Cianfrocca *et al*, 2008).

De manera general, las neoplasias están constituidas por poblaciones heterogéneas de células con alteraciones genéticas y epigenéticas que les permiten establecer límites físicos, diseminarse y colonizar órganos distantes. Las metástasis es una sucesión de estos procesos individuales (Gupta *et al*, 2006); las células metastásicas son clonas del tumor primario. La integridad del DNA puede comprometerse por progresión aberrante del ciclo celular, acortamiento telomérico, inactivación de los genes de reparación del DNA y mecanismos

alterados de control epigenéticos. Dentro de los factores desencadenantes del cáncer se encuentran los factores genéticos y epigenéticos (Irizarry *et al*, 2009).

En cáncer, uno de los procesos epigenéticos más estudiados es la metilación del DNA (Ehrich, 2009). La metilación del DNA se presenta principalmente en las citosinas que preceden una guanina (también conocidos como dinucleótidos CpG). Existen regiones en el genoma, donde se observa una mayor densidad de dinucleótidos CpG, las cuales se conocen como islas CpG. Éstas se han asociado con el 60% de los promotores génicos, y por lo general no se encuentran metiladas (Antequera F, 2003; Weber M *et al*, 2007). Dentro de los procesos epigenéticos anormales que se observan en neoplasias malignas, se ha reportado un fenómeno de pérdida de metilación global de DNA, también conocido como hipometilación; y a su vez, una ganancia de metilación (hipermetilación) a nivel local. Principalmente la hipermetilación se encuentra asociada a islas CpG, afectando así a múltiples promotores génicos como genes asociados con el control del ciclo celular, genes supresores de tumores, entre otros (Balmain *et al*, 2003; Irizarry *et al*, 2009; Van De Voorde *et al*, 2012). Una de las interrogantes en el área de la epigenética es el conocer qué mecanismos se encuentran involucrados en la protección en contra de la metilación aberrante de islas CpG asociadas a promotores génicos.

Actualmente se ha propuesto al factor nuclear CTCF como una proteína que puede proteger contra la metilación aberrante. El gen *CTCF* codifica para una proteína de 11 dedos de zinc, la cual tiene la capacidad de unirse en múltiples

sitios del genoma. Dentro de las funciones que se le han atribuido a esta proteína se encuentra la de mantener a la cromatina en un estado laxo y permisivo a transcripción.

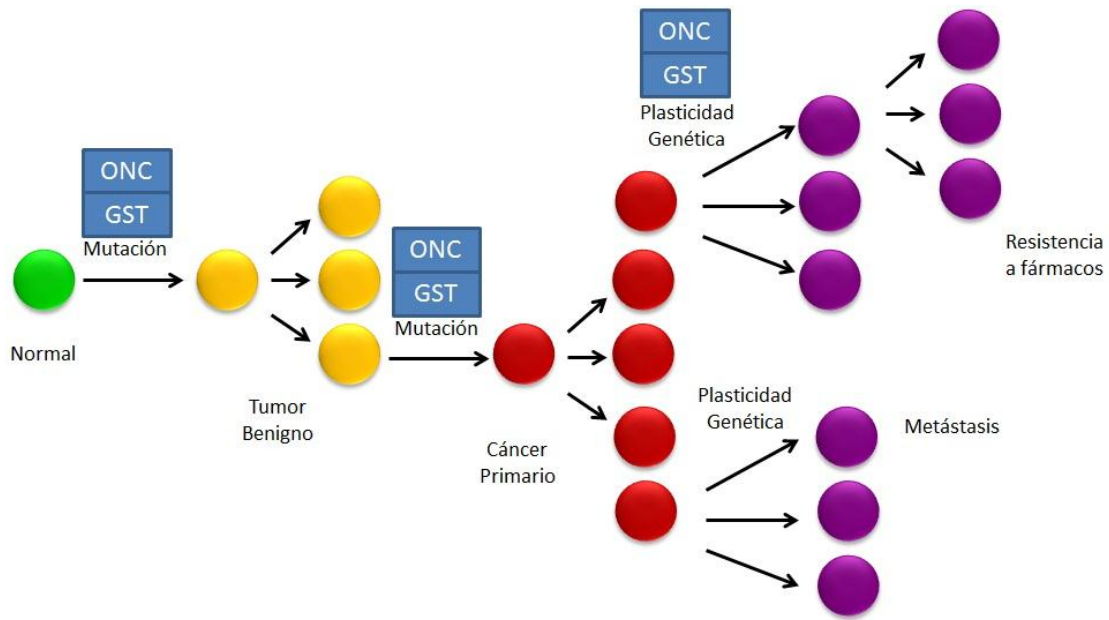
Por otro lado, *CTCF* es un gen parálogo de *CTCF* conocido como *BORIS*, el cual codifica para una proteína de 11 dedos de zinc. Esta proteína, al contrario de *CTCF*, no tiene la capacidad de proteger al DNA en contra de la metilación aberrante; fomentando así una cromatina compacta y el silenciamiento génico. De manera normal, *BORIS* se expresa en tejido con alta tasa de transcripción como lo es el tejido testicular durante la espermatogénesis y células con altos niveles de replicación como las de la epidermis (Rosa-Garrido *et al*, 2012). Particularmente, hay reportes de sobre-expresión aberrante en múltiples neoplasias como melanoma, cánceres ginecológicos, glioblastomas y recientemente cáncer de mama (Jones PA *et al*, 2011)

Debido a que *CTCF* se desregula en múltiples neoplasias, una de las interrogantes de este proyecto es el conocer si los componentes epigenéticos, como la metilación del DNA, están involucrados en la desregulación de la expresión de *CTCF* y *BORIS* en cáncer de mama y ovario.

## II MARCO TEÓRICO

Una de cada 8 mujeres tiene la probabilidad de ser diagnosticada con cáncer de mama durante su vida. El cáncer, en general, es un problema de salud pública no sólo en Europa y América del Norte, sino en otras partes del mundo como nuestro país. Se ha progresado de manera importante respecto a la educación, detección temprana y tratamiento de esta neoplasia; sin embargo, se han desarrollado pocos tratamientos específicos para ella como el anticuerpo monoclonal trastuzumab que está dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2). Éste ha resultado útil en las pacientes que lo sobre-expresan; sin embargo, existen varios subtipos de cáncer de mama. La caracterización más precisa de ellos permitirá el desarrollo de fármacos más específicos y de un tratamiento personalizado con mayor especificidad y menor toxicidad.

Durante los últimos 30 años se ha establecido la idea de que el cáncer se origina de una sola célula. Para que esto ocurra, se requieren una serie de alteraciones genéticas responsable de la selección clonal continua y la heterogenidad de las células tumorales. Este proceso da origen a la proliferación tumoral, invasión, metástasis y resistencia a fármacos. La teoría del origen clonal del cáncer ha sido apoyada por el descubrimiento de oncogenes dominantes y genes supresores de tumor de actividad recesiva (Nowell, 1989). Figura 1.



**Figura 1. El origen clonal del cáncer.** Modelo propuesto del origen clonal del cáncer. Modificado de Feinberg AP *et al*, Nat Rev Genet, 2006; 7: 21-33. ONC: oncogen, GST: gen supresor de tumor.

## Epigenética

En el cuerpo humano, existen aproximadamente 60 trillones de células, cada una contiene alrededor de 2 metros de DNA genómico contenido dentro del núcleo. La conjunción del DNA con histonas se conoce como nucleosoma, lo cual es la unidad funcional de la cromatina (Felsenfeld y Groudine, 2003). El empaquetamiento del DNA trae como consecuencia que los genes contenidos en él tengan que remodelarse para que se puedan expresar en un tiempo y espacio definido; dicho fenómeno se encuentra regulado por procesos epigenéticos. La epigenética se define como patrones heredados de célula a célula de la actividad del DNA y RNA que no dependen de la secuencia de nucleótidos (Esteller, 2011).



En general comprende un fenotipo heredable que pasa a través de la mitosis o la meiosis (Berger *et al*, 2009). Durante la diferenciación celular muchos de los genes que se expresan en células totipotenciales son inactivados de manera gradual durante el desarrollo; mientras tanto, los genes tejido-específicos se activan. Estos procesos en la regulación de la expresión génica son mediados por distintos procesos epigenéticos; dentro de los que se encuentran la remodelación de la cromatina, las modificaciones post-traduccionales de histonas y la metilación del DNA, entre otros (Lund AH *et al*, 2004).

Muchos de los genes que se encuentran activos en progenitores pueden ser silenciados de manera gradual en estadios tardíos durante el desarrollo; mientras tanto, subgrupos de genes tejido-específicos se activan. Esta progresión es el resultado de expresión selectiva de factores de transcripción y de la labor orquestada de los principales efectos epigenéticos: remodelación de la cromatina, modificaciones post-traduccionales de histonas, metilación del DNA y la actividad de los RNAs no codificantes. Una propiedad importante de los cambios epigenéticos dentro de la célula es que pueden heredarse. Una vez establecidas, las modificaciones epigenéticas pueden mantenerse y propagarse durante la división celular. El establecimiento de marcas epigenéticas específicas dentro de la célula requiere de la acción coordinada de múltiples mecanismos enzimáticos, así como de complejos proteicos que reconozcan dichas modificaciones (Tollervey *et al*, 2012).

Dentro de los tipos principales de información epigenética se encuentran:

1. Modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Incluye a la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización, ADP-ribosilación, sumoilación, en las regiones amino y carboxilo terminales de las histonas. Son importantes en la regulación transcripcional, y muchos se mantienen de manera estable durante la división celular (Feinberg *et al* 2004).

2. La metilación del DNA.

La modificación covalente del DNA, en la cual un grupo metilo es transferido de la s-adenosilmetionina a la posición C-5 de una citosina por una familia de metiltransferasas. Esta ocurre principalmente en dinucleótidos CpG y tiene diferentes funciones celulares como: la formación de "splicing" alternativo, la regulación de la expresión génica y en el silenciamiento génico, área donde más se ha estudiado este proceso epigenético.

Alteraciones en los patrones de metilación del DNA son comunes en las células neoplásicas y comprenden un subgrupo de eventos involucrados en el proceso de carcinogénesis. Se ha observado que la metilación de las islas CpG en las regiones 5' de genes supresores de tumor tales como *p16*, *VHL*, *Rb*, *p53*; pueden suprimir su expresión y función. Se conoce que *BRCA1* contribuye a la carcinogénesis por su inactivación mediante la metilación del DNA de su promotor (Butcher *et al*, 2004; Butcher *et al*, 2007).

La metilación del DNA es el proceso epigenético mejor caracterizado en cáncer. La adición de un grupo metilo a los residuos de citosina que preceden directamente una guanina (CpG) es una marca común post-replicativa. Paradójicamente, en el genoma existen regiones con un alto contenido de dinucleótidos CpG ("islas CpGs") que no se encuentran metiladas. Estas islas se encuentran aproximadamente en 60% de los promotores de los genes en seres humanos. La hipermetilación en la región promotora por lo general se asocia con el silenciamiento de un gen; mientras que su contraparte, la hipometilación, se asocia con actividad de los genes. En general el DNA del tejido neoplásico se encuentra hipometilado; y los genes supresores de tumor (GST) dentro del tejido tumoral están hipermetilados (Tablas 1, 2 y 3).

<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Genes representativos</b>
Mama	<i>BCSG1, CAV1, CHD1, CDH3, NAT1, UPAN</i>
Próstata	<i>PLAU, TFF1, TFF3</i>
Melanoma	<i>14-3-3s, GAGE 1-6, HMW-MAA, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, NY-ESO-”, PI5, PRAME, SSX 1-5</i>
Páncreas	<i>CLDN4, LCN2, MSLN, PSCA, S100P, S100A, SERPINB5, SFN, TFF2</i>
Pulmón	<i>14-3-3s, C8orf72</i>
Colorrectal	<i>LINE-1, MAEL, SFT2D3</i>

**Tabla 1. Genes que generalmente se encuentran hipometilados en algunas neoplasias.**

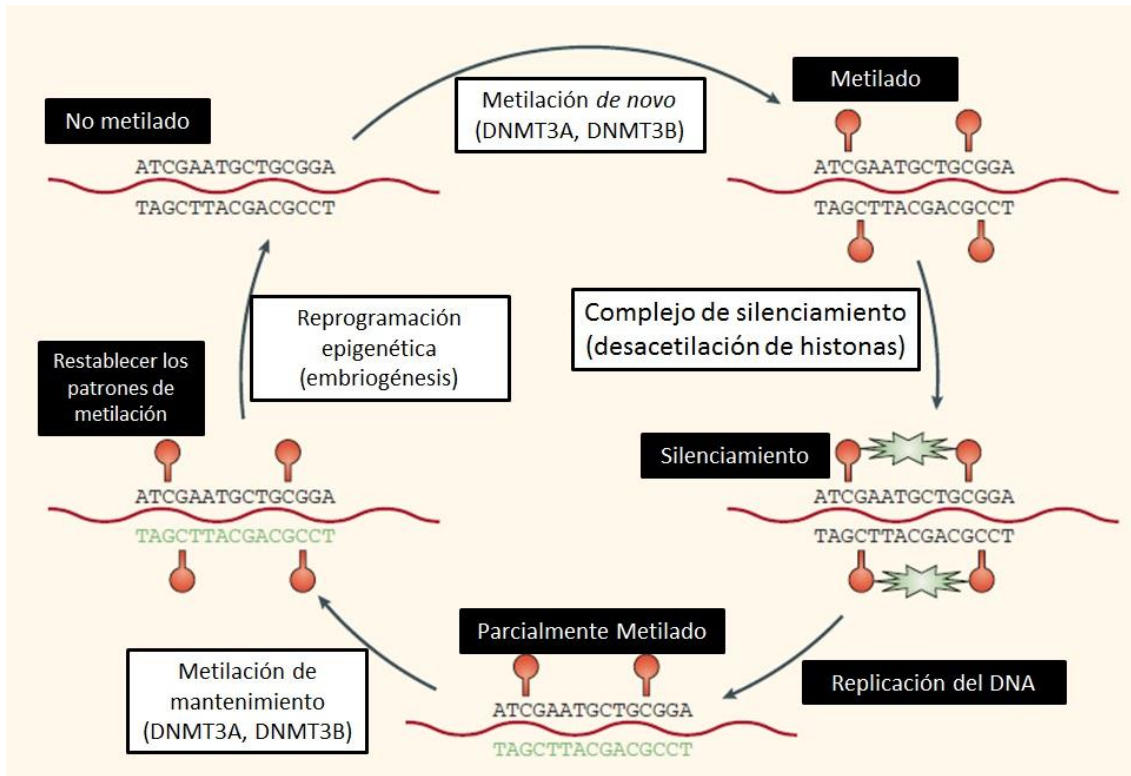
Tipo de Cáncer	Genes representativos
Mama	14-3-3s, AK5, APC, BCL2, BRCA1, CCND2, CDH13, CDKN1C, CDKN2A, CST6, DAPK, DCC, ER-a, FOXA2, GPC3, HIC1, HOXA5, HOXD11, LAMA3, LAMB3, LAMC2, LDLRAP1, MGMT, MLH1, PGR, RAD9, RAR-b, RASSF1A, ROBO1, RUNX3, SFRP1, SYK, TMS1, TWIST, WIF1, WRN, WT1
Próstata	APC, AR, ASC, BCL2, CAV1, CCND2, CD44, CDH1, CDH13, CDKN2A, DAPK, DKK3, EDNRB, ER-a, ER-b, GPX3, GSTM1, GSTP1, HIC, LAMA 3, LAM C2, MDR1, MGMT, PTGS2, RAR-b2, RARRES1, RASSF1A, RPRM, RUNX3, SFN, SFRP1, TIMP3
Melanoma	3-OST-2, APC, ASC, BST2, Caspase 8, CCND2, CD10, CDH1, CDH8, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CIITA-PIV, COL1A2, CXCR4, CYP1B1, DAL1, DAPK1, DDIT4L, DNAJC15, DPPIV, E cadherin, ER-a, GATA4, GDF15, HMW-MAA, HOXB13, HSP11, KR18, LOX, LRRC2, LXN, Maspin, MDR1, MINT 17, MINT 31, Megalin, MFAP2, MGMT, MIB2, MTAP, NPM2, p101, P73, PCSK1, PRDX2, PTEN, PTGS2, QPCT, RAR-b2, RASSF1A, Ril, SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SYK, TERC, TFPI2, THBS1, THBS4, TIMP3, TM, TNFRSF10A, TNRSF10D, TNRSF10D, TPM1, WIF1, WFDC1
Páncreas	BNIP3, CCND2, CDKN2A, CDKN1C/p57, CNTNAP2, MDF-1, miR-9-1, NPTX2, PENK, RPRM, SPARC/ON, TFPI2, UCHL1, ZNF415
Pulmón	BARHL2, CBLN4, CDKN2A, CDH1, DAPK, DPP6, FLJ30851, GRIK2, HAND2, HOXA9, HOXD9, KIAA1024, LHX2, MGMT, NR2E1, OSR1, PCDHGA12, RAR-b, RASSF1A, RUNX3, SIM2, SIX6, ST8SIA3, TIMP3
Colorrectal	ALX4, APC, CDKN2A, CDH4, CHD1, CHD13, CHFR, CRABO1, CXCL12, DAPK, DKK1, EphA1, ER-a, GALR2, GATA4, GATA5, HLTF, ID4, IEF8, MGMT, MLH1, NGX6, p14, p15, PPARG, RASSF1A, RUNX3, SEPT9 SFRP1, SFRP2, SLC5A8, Sox17, TFPI2, THBS1/TSP1, TIMP3, VIM

**Tabla 2. Genes aberrantemente silenciados en cáncer por la hipermetilación del DNA.**

	Hipometilación	Hipermetilación
Frecuencia	Ubicua, aún en tumores benignos y tempranos	Algo de hipermetilación temprana, con incremento en la frecuencia con la progresión del tumor
Blancos	Secuencias repetidas, regiones codificantes, promotores	Promotores
Cambio primario / secundario	Primario	Puede ser secundario a silenciamiento genético, cambios en la cromatina
Posible efecto en humanos	Inestabilidad cromosómica, pérdida de impronta, activación de oncogenes	Mantenimiento del silenciamiento de genes supresores de tumor
Efectos en modelos animales	Linfoma, iniciación incrementada de tumores intestinales, hepatocarcinoma	Incremento en la progresión de tumores intestinales
Variación en edad de inicio	Sí	Sí
Tratamiento	Efecto secundario de inhibición	Terapia inhibitoria

**Tabla 3. Generalidades de hipometilación e hipermetilación en cáncer.**

La metilación del DNA en seres humanos se lleva a cabo por tres enzimas: DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) o de mantenimiento que conserva los patrones de metilación durante la replicación celular; DNMT3A y DNMT3B que regulan la metilación *de novo* que establecen la metilación del DNA en sitios que precisamente no estaban metilados (Blair *et al*, 2012). Figura 2.



**Figura 2. Esquema del establecimiento de la metilación del DNA.** Modificado de Issa JP, Nat Rev Cancer, 2004; 4: 988-93

## Las islas CpG

Los dinucleótidos CpG se encuentran distribuidos de manera no equitativa en el genoma. En general, las CpGs se encuentran poco representadas en mamíferos. Las regiones de DNA que contienen una alta densidad de CpG se denominan "islas CpG". Éstas se encuentran sobre-representadas en el 60 al 70% de los promotores génicos, incluyendo la mayoría de los genes constitutivos, así como genes del desarrollo y tejido específicos (Williams *et al*, 2012).



La metilación generalizada de los promotores de las islas CpG se ha reportado en diferentes tumores, incluyendo: gástrico, pulmón, hígado, ovario, glioblastoma, endometrio, mama y algunas leucemias. Este fenotipo, conocido como CIMP por sus siglas en inglés (CpG Island Methylator Phenotype), se describió por primera vez y ha sido más estudiado en cáncer colorrectal (Issa JP, 2004; Frazier *et al*, 2003; Hughes *et al*, 2012).

## La metilación y el cáncer

La conexión entre la metilación del DNA y el cáncer se demostró por primera vez en 1983, cuando se observó que el genoma de las células neoplásicas se encontraba hipometilado en comparación con el tejido normal (Feinberg, 1983). La hipometilación en las células tumorales se debe principalmente a la pérdida de la metilación en regiones repetitivas del genoma, la inestabilidad genómica resultante es una característica de las células neoplásicas (Robertson, 2005; Ehrlich M, 2009).

El cáncer se ha definido de múltiples maneras. Desde la observación de Hipócrates de la angiogénesis, la palabra cáncer *per se* se refiere a los vasos sanguíneos gruesos que alimentan los tumores y semejan los artejos de un cangrejo.

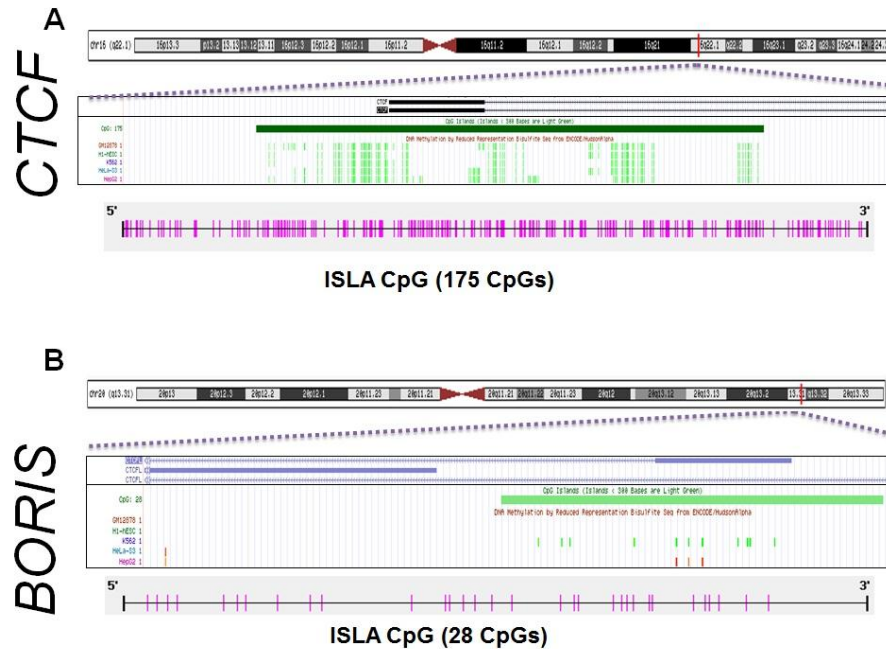
Los principales abordajes de tratamiento continúan siendo basados en cirugía, agentes citotóxicos no específicos y radiación. Los mayores avances en cuanto al tratamiento dirigido de los tumores pueden representarse con la identificación de cambios genéticos tales como la amplificación de *HER2/neu* en cáncer de mama, mutaciones de *ERBB2* y *EGFR* en cáncer de pulmón, y el rearrreglo *BCR-ABL* (Breakpoint cluster region- Abelson murin Leukaemia viral (*v-abl*) oncogene homologue) en leucemia mielocítica crónica.

A la par, se han realizado grandes avances en la caracterización de las alteraciones epigenéticas en cáncer. Estas incluyen alteraciones globales, tales como hipometilación del DNA e hipoacetilación de la cromatina, así como hipo e hipermetilación específicas. La hipometilación global del DNA lleva a inestabilidad cromosómica y un incremento en la frecuencia del desarrollo de neoplasias (Baylin SB, 2011; Jones PA 2002) se ha visto relacionada también con activación específica de algunos oncogenes tales como *R-ras* en cáncer gástrico, ciclina D2 y maspina en cáncer de páncreas (Feinberg *et al*, 2006).

## CTCF

El gen de CTCF se encuentra localizado en el cromosoma 16, brazo largo, en la banda q 22.1; éste codifica para una proteína de 11 dedos de zinc (Figura 3 A).

El factor nuclear CCCTC, también conocido como CTCF es una proteína multifuncional de 11 dedos de zinc, conservada en muchos organismos implicada en diversas funciones regulatorias. Inicialmente, CTCF fue caracterizado como un regulador tanto positivo como negativo de diferentes genes como *c-myc* (Ohlsson *et al*, 2001).



**Figura 3. Análisis *in silico* de los promotores génicos de *CTCF* y *BORIS*. A:** Promotor de *CTCF* que se encuentra embebido en una isla CpG de 175 dinucleótidos CpG en una región de ~1 kb. **B:** Promotor de *BORIS* que se encuentra embebido en una isla CpG de 28 dinucleótidos CpG en una región de ~0.4 kb.

Se ha involucrado a este gen en diversos aspectos de la regulación epigenética tal como la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica, la regulación de transcritos no-codificantes, la estructura y función de elementos repetidos, entre otros (Phillips JA *et al*, 2009). La ausencia de *CTCF* se ha relacionado recientemente con el desarrollo del cáncer; este factor de transcripción participa en la regulación de genes involucrados en el control del ciclo celular tales como *BRCA1*, *Rb* y *p16* donde se ha observado una localización citoplasmática aberrante en el 77% de los carcinomas mamarios lo que

correlaciona con la hipermetilación del DNA en el promotor del gen *BRCA1* (De la Rosa-Velázquez, 2007). Se ha observado que la ausencia de CTCF conlleva a la hipermetilación del promotor de este gen. Como sabemos, la hipermetilación de *BRCA1* se asocia hasta con un 20% aproximadamente de los casos de cáncer de mama esporádicos. (Butcher, 2004; Butcher, 2007). Es debido a estos hallazgos que ha crecido el interés en considerar a CTCF como un candidato en la regulación de genes supresores de tumores tan importantes como lo es *p53* (Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010).

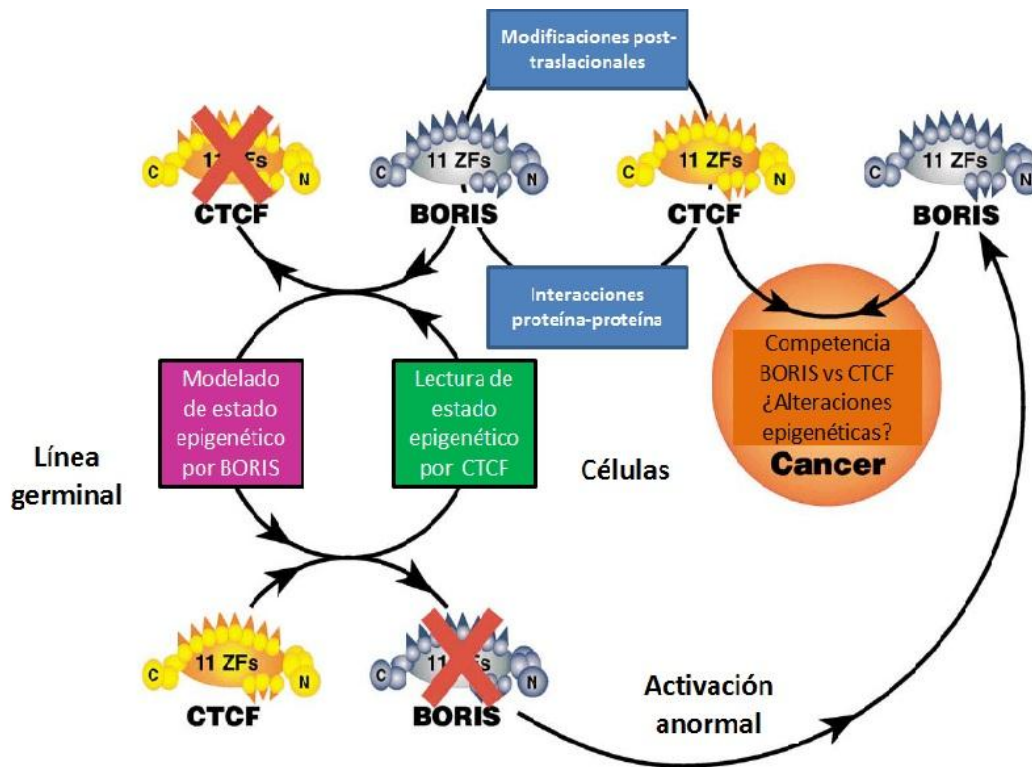
### **BORIS (CTCFL)**

El factor de transcripción BORIS es un miembro de la familia de genes CTA (por sus siglas en inglés cancer-testis antigen). Este gen se expresa de manera tejido específico en células de mamíferos; particularmente se observa sobreexpresado en testículo (principalmente en espermatoцитos primarios) y en epidermis. De manera anormal, en neoplasias malignas como melanoma, cánceres ginecológicos, glioblastomas y recientemente cáncer de mama (Loukinov *et al*, 2002; Rosa-Garrido *et al*, 2012). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 20, brazo largo, banda q 13.31.

*BORIS* es el único parólogo conocido de *CTCF*. Ambas proteínas tienen una región central de unión al DNA de 11 dedos de Zinc, con una secuencia de aminoácidos muy similar (74.1% de identidad). *BORIS* ha sido implicado en múltiples funciones reguladoras incluyendo proliferación celular, activación de

otros genes de la familia CTA, espermatogénesis, desarrollo humano pre-implantación y proliferación del ciclo celular (Rosa-Garrido *et al*, 2012). En condiciones normales, el promotor se encuentra inactivado por metilación del DNA (Necochea-Campion *et al*, 2011). De manera anormal, su desmetilación pudiera asociarse con la sobre expresión de este oncogen.

Estas proteínas se ha observado de manera general que tienen efectos opuestos sobre la expresión génica. BORIS se ha visto asociado en proliferación celular y expresión génica; mientras que CTCF reprime la expresión génica e inhibe la proliferación celular (Klenova *et al*, 2002).



**Figura 4. Modelo de las funciones de *CTCF/BORIS* en cáncer y células no neoplásicas.** En la tumorigénesis, la activación anormal de *BORIS* puede interferir con la restricción del crecimiento controlada por *CTCF*. *CTCF* y *BORIS* actúan de manera sucesiva para gobernar los estados epigenéticos en el desarrollo normal y su rivalidad puede ser causa de la expresión aberrante de *BORIS* en cáncer. Modificado de Klenova EM, *et al. Seminar Cancer Biol* 2002, 12: 399-414.

Esto no es del todo extraño, debido a las diferencias significativas en la secuencia y diferencias estructurales en sus extremos amino y carboxilo terminales. La comparación de *BORIS* y *CTCF* ha revelado que a pesar del alto grado de similitud (74.1% de identidad) en los dedos de zinc, los extremos de las



proteínas comparten menos del 15% de la secuencia (Necochea-Campion *et al*, 2011).

La mayoría de las neoplasias malignas son el resultado de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas. Dentro de este proceso se encuentran los patrones alterados de metilación (como se mencionó anteriormente) tales como hipometilación generalizada y localizada; eventos que llevan a la expresión inapropiada de genes supresores de tumor en casos de cáncer esporádico (Robertson, 2005).

## **Pregunta de investigación**

¿Existen cambios en el estado de metilación de los promotores de *CTCF* y *BORIS* en los tumores de mama y ovario en comparación con tejido sano? ¿Está asociada la pérdida de la metilación de *BORIS* con el desarrollo de cáncer de mama y ovario? ¿La metilación de estos promotores afecta la expresión de estos genes (*CTCF* y *BORIS*)?

### III PLANTEAMIENTO DE TESIS

#### ***Planteamiento del problema***

Uno de los fenómenos más relevantes en la carcinogénesis es la desregulación transcripcional de los genes supresores de tumores. Los datos actuales indican la participación de *CTCF* en la regulación transcripcional de genes supresores de tumores tan relevantes como *p53*, al igual que un cambio en su expresión en varios tipos de cánceres. Por otro lado, es bien conocido el efecto de los cambios epigenéticos en la carcinogénesis; por lo que en este trabajo queremos identificar la participación que tiene la metilación de los promotores de los genes *CTCF* y su gen parálogo *BORIS (CTCFL)* y su expresión en tumores de mama y ovario. Esto nos permitirá conocer la participación de este mecanismo de regulación transcripcional en genes que a su vez influyen en la expresión de genes supresores de tumores.

## ***Hipótesis***

La hipometilación del promotor de *BORIS* deriva en la sobre-expresión del gen en tumores de mama y ovario.

La hipermetilación del promotor de *CTCF* conlleva en el silenciamiento del gen en tumores de mama y ovario.

En tejido sano, *CTCF* se mantendrá hipometilado mientras que *BORIS* se encontrará hipermetilado.

## **Objetivos**

### **General**

Caracterizar el estado de metilación del DNA de los promotores génicos *CTCF* y *BORIS* a partir de biopsias de tumores de cáncer de ovario, cáncer de mama y tejido sano; y correlacionarlo con su expresión.

### **Particulares**

1. Reclutar pacientes que presenten tumores de cáncer de ovario, cáncer de mama.
2. Caracterizar el estado de metilación de los promotores génicos de *CTCF* y *BORIS* por medio de PCR sensible a metilación (MS-PCR).
3. Determinar la expresión del gen *BORIS* por medio de qRT-PCR (PCR en tiempo real).
4. Evaluar la correlación entre los niveles de expresión del gen *BORIS* con el estado de metilación del DNA de su promotor.

## ***Diseño del estudio***

Es un estudio prospectivo que busca responder si variaciones en el estado de metilación de genes con función gen supresor de tumores como CTCF y oncogenes como BORIS constituyen un cambio epigenético que conlleva al desarrollo de cáncer de mama y ovario.

### Población de estudio

Mujeres con cáncer de ovario y mujeres con cáncer de mama que cumplan con los criterios de inclusión.

### Criterios de inclusión (Cáncer de ovario)

- Pacientes con cáncer de ovario en cualquier estadio.
- Mayores de 18 años.
- Firma del consentimiento informado para la toma de la biopsia.

### Criterios de inclusión (Cáncer de mama)

- Pacientes con cáncer de mama en cualquier estadio.
- Mayores de 18 años.
- Firma del consentimiento informado para la toma de la biopsia.

### Criterios de exclusión

- Expedientes que no contengan la información completa.

### Criterios de eliminación

- Retiro del consentimiento informado

A todas las pacientes que sean candidatas a ingresar al protocolo se les proporcionó y explicó el consentimiento informado; así mismo, se les manifestó verbalmente que sus muestras serían utilizadas para el análisis de interés. La paciente puede retirar su muestra y pedir que se destruya.

### Proceso de obtención del consentimiento informado

Se entrevistó a las pacientes diagnosticadas. Se les informó detalladamente en qué consiste el protocolo y los beneficios que esta investigación puede proporcionarles. También, se les entregó una copia del consentimiento informado. Se les brindó información explícita de la elaboración del estudio y cómo se llevarán a cabo los ensayos biológicos. Todas las pacientes firmaron el consentimiento informado autorizado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Cancerología.

La sustentante de la tesis, el asesor y el revisor son responsables directos de la realización del estudio y revisión del contenido con sustento científico



## ***Análisis estadístico***

Se utilizaron medidas de frecuencia, tendencia central y dispersión de acuerdo a la distribución de la muestra determinada por Kolmogorov-smirnof. El análisis se realizó con el programa Excel 2010 para Windows.

.

## **Obtención y procesamiento de las muestras**

Todas las muestras fueron obtenidas de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología de México y clasificadas por estadio según los criterios de la American Joint Committee on Cancer (AJCC; TNM system) 7a edición. El diagnóstico histopatológico fue realizado por patólogos especialistas del Instituto basados en los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Se obtuvieron de manera prospectiva 8 muestras de cáncer de ovario, 16 muestras de cáncer de mama y 10 muestras de tejido mamario adyacente al tumor. Las muestras fueron tomadas antes de iniciar el tratamiento. Como controles se utilizaron: 1 muestra de DNA de ovario normal y 2 muestras de DNA mama normal. Las muestras de tejido fresco fueron conservadas a -20°C en RNAlater (Qiagen). Este estudio fue aprobado por los Comités Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Cancerología (números de aprobación 011/034/IBI y CB/727).

## **Ensayo de bisulfito de sodio y secuenciación.**

Se obtuvo el DNA de las muestras tumorales mediante extracción por fenol/cloroformo. Se modificó 1 µg de DNA genómico por medio de un ensayo de bisulfito de sodio (EpiSeeker Bisulfite Modification Kit- Whole Cell – ABCAM; ab 117126; EZ methylation kit de ZYMO).

Dentro del estudio se emplearon distintos oligonucleótidos sintéticos; los cuales se mencionan a continuación:

**Análisis de expresión por PCR tiempo real:**

BORIS RT FWD    AAAACCTTCCGTACGGTCACTCT

BORIS RT RVS    TGTTGCAGTCGTTACACTTGTAGG

**Análisis de la metilación del promotor del gen BORIS por PCR sensible a metilación (MS-PCR):**

MSP BORIS 3' MET FWD    TACGAGGGGAATGTTTGTTT

MSP BORIS 3' MET RVS    CCTACGCCTAACAAAATTCCG

MSP BORIS 3' UNMET FWD    GTGTATGAGGGGAATGTTTGTTT

MSP BORIS 3' UNMET RVS    ATCCTACACCTAACAAAATTCCAC

**Análisis de la metilación del promotor del gen CTCF por PCR sensible a metilación (MS-PCR):**

MSP CTCF 5' MET FWD    TTAGCGGGAGTTAGGACGTC

MSP CTCF 5' MET RVS    ACTTTCAAAAACGAACGCG

MSP CTCF 5' UNMET FWD    TATTTAGTGGGAGTTAGGATGTT

MSP CTCF 5' UNMET RVS    CCAACTTTCAAAAACAAACACA

Como control positivo de metilación del DNA, se utilizó 1  $\mu$ g de DNA de linfocitos de sujetos sanos que fue metilado *in vitro* (IVD) durante 8 horas con SssI metiltransferasa (NEB, Beverly, MA)

### **RT-PCR tiempo real.**

Con el fin de conocer los niveles de expresión del promotor de BORIS, se extrajo RNA total por medio de Trizol (Invitrogen) tanto de tejido tumoral como de tejido adyacente al tumor. Los niveles de *BORIS* se determinaron por RT-PCR en tiempo real a partir de cDNA generado a partir 1  $\mu$ g de RNA total empleando oligo dT. El ensayo se realizó con Sybr Green/ROX Master Mix (cat: K0223; Fermentas) y la expresión relativa se analizó mediante el método  $\Delta\Delta$ Ct. Para la normalización del ensayo se utilizó el gen constitutivo 28s. El experimento se realizó en un termociclador de tiempo real StepOnePlus de Applied Biosystems.

## IV RESULTADOS

### Cáncer de ovario

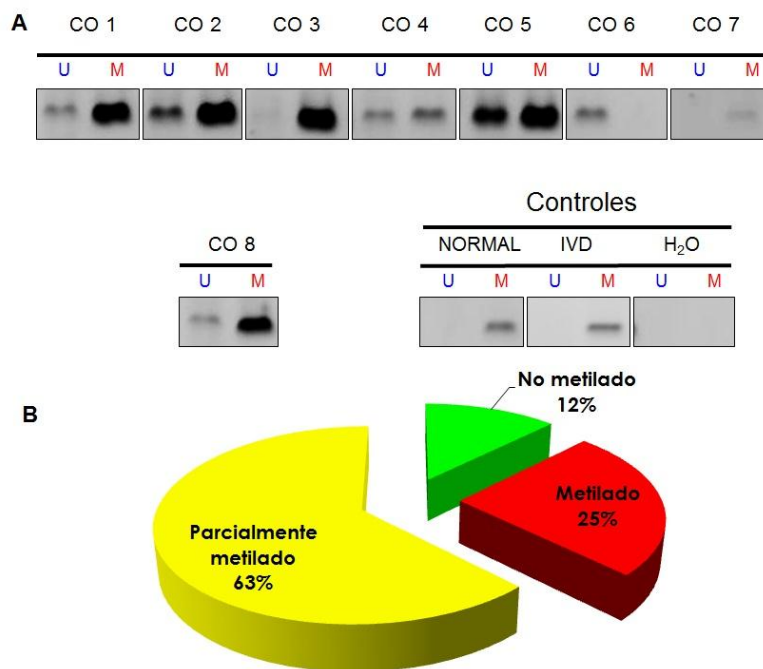
La edad promedio de las pacientes con este diagnóstico fue de 43 años, con un rango de 27 a 60. El tipo histológico más común fue el adenocarcinoma endometroide (n=3), seguido del mucinoso y germinal (n=2, respectivamente) y finalmente el seroso papilar (n=1). (Tabla 4).

<b>Característica</b>	<b>Resultado</b>
Edad (años)	43 (27 a 60)
<b>Tipos histológicos</b>	
Germinal	2
Adenocarcinoma endometroide	3
Mucinoso	2
Seroso papilar	1

**Tabla 4. Características generales de las pacientes con cáncer de ovario**

## Análisis del estado de metilación del promotor de *BORIS* por PCR sensible a metilación (MS-PCR).

Con el fin de conocer el estado de metilación del promotor de *BORIS*, se realizó una MS-PCR con lo se determinó que en el tejido normal, el promotor de *BORIS* se encuentra metilado (Figura 5A inferior). En las muestras de cáncer de ovario, observamos cambios en el estado de metilación de este promotor. Figura 5A. Persistió metilado en 25% de las muestras (N= 2), parcialmente metilado en 63% (N=5) y se encontró no metilado en 12% (N=1). Figura 5B.



**Figura 5. Análisis de la metilación del DNA en ovario normal y cáncer de ovario.** **A** – Análisis por MS-PCR en ovario normal, cáncer de ovario (CO). IVD: DNA metilado *in vitro*. U: No metilado. M: Metilado. **B**- Resultados del estado de metilación representada en porcentajes.

## Cáncer de Mama

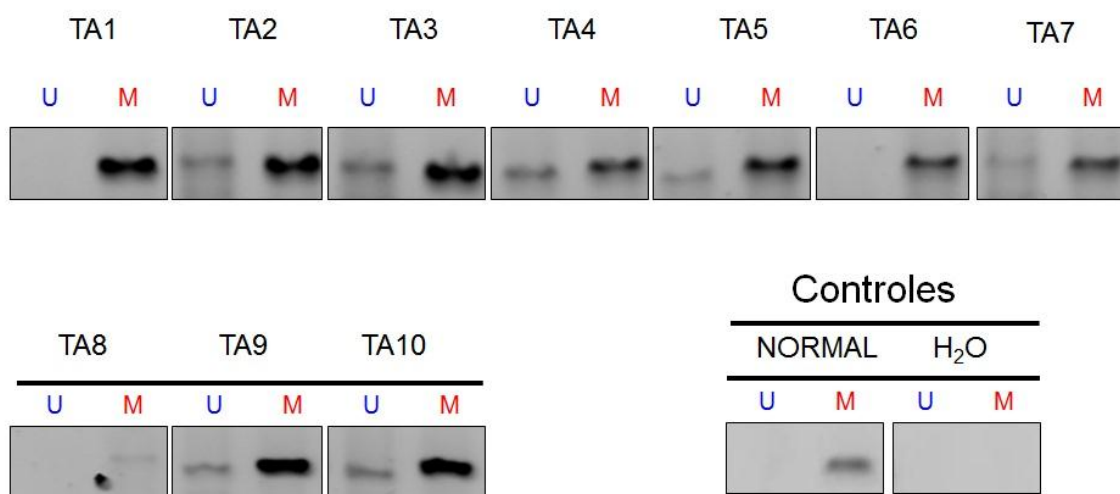
La edad promedio de las pacientes con este diagnóstico fue de 55 años, con un rango de 35 a 79. Treinta por ciento de las pacientes estudiadas tenían antecedente de tabaquismo y 38.46% eran nuligestas al diagnóstico. El índice de masa corporal promedio fue de 27.86 kg/m<sup>2</sup>, lo cual indica que la mayoría de las pacientes contaban con sobrepeso. El estadio más común al diagnóstico fue III B (n=5). Las características generales de este grupo de pacientes se muestran en la tabla 5.

Característica	Resultado
Edad (años)	55 (35 a 79)
Tabaquismo	30 %
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.86 (16.89-39.06)
Nuligestas	38.46 %
Estadios (n)	
I A	2
I B	0
II A	4
II B	1
III A	1
III B	5
III C	0
IV	0
SBR	
3	2
4	2
5	0
6	2
7	2
8	3
9	0
RE y P +	76%
Her 2	0
Ki 67	1-85 (16%)

**Tabla 5. Características generales de las pacientes con cáncer de mama.** SBR: Escala de Scarff-Bloom-Richardson. RE: Receptores de estrógenos. P: Receptores de progestágenos. Estadio de acuerdo a la American Joint Cancer Committee 7ma edición.

## Análisis de metilación del promotor de *BORIS* por PCR sensible a metilación en tejido mamario.

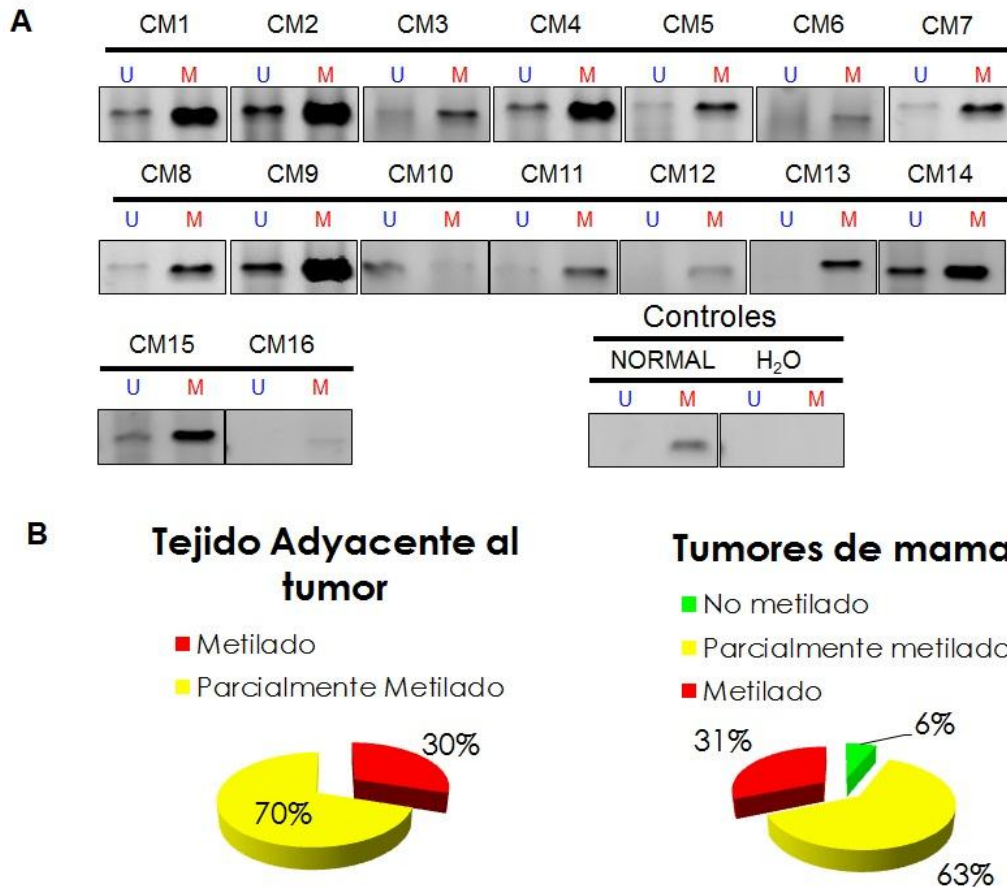
Con el fin de evaluar el estado de metilación se realizó el ensayo de bisulfito de sodio y posteriormente PCR en el tejido adyacente al tumor, se observaron cambios en el estado de metilación (metilación parcial) en 7 muestras (TA2, TA3, TA4, TA5, TA7, TA9 y TA10), mientras que en 3 (TA1, TA6 y TA8) se mantuvo metilado como en el control (tejido no neoplásico). Figura 6.



**Figura 6. Análisis de la metilación del DNA por MS-PCR en tejido mamario adyacente a tumor (TA) y tejido mamario normal. U: No metilado. M: Metilado.**



En el análisis del estado de metilación de las muestras de cáncer de mama, el promotor de *BORIS* se observó metilado en 31% (n= 5); no metilado en 6% (n=1) y parcialmente metilado en 63% (n= 10) (Figuras 7A y 7B).



**Figura 7. Análisis de la metilación del DNA del promotor de *BORIS* en mama normal y cáncer de mama. A – Análisis por MS-PCR en mama normal y cáncer de mama (CM). U: No metilado. M: Metilado. B- Resultados del estado de metilación en tejido adyacente y cáncer de mama, representado en porcentajes.**

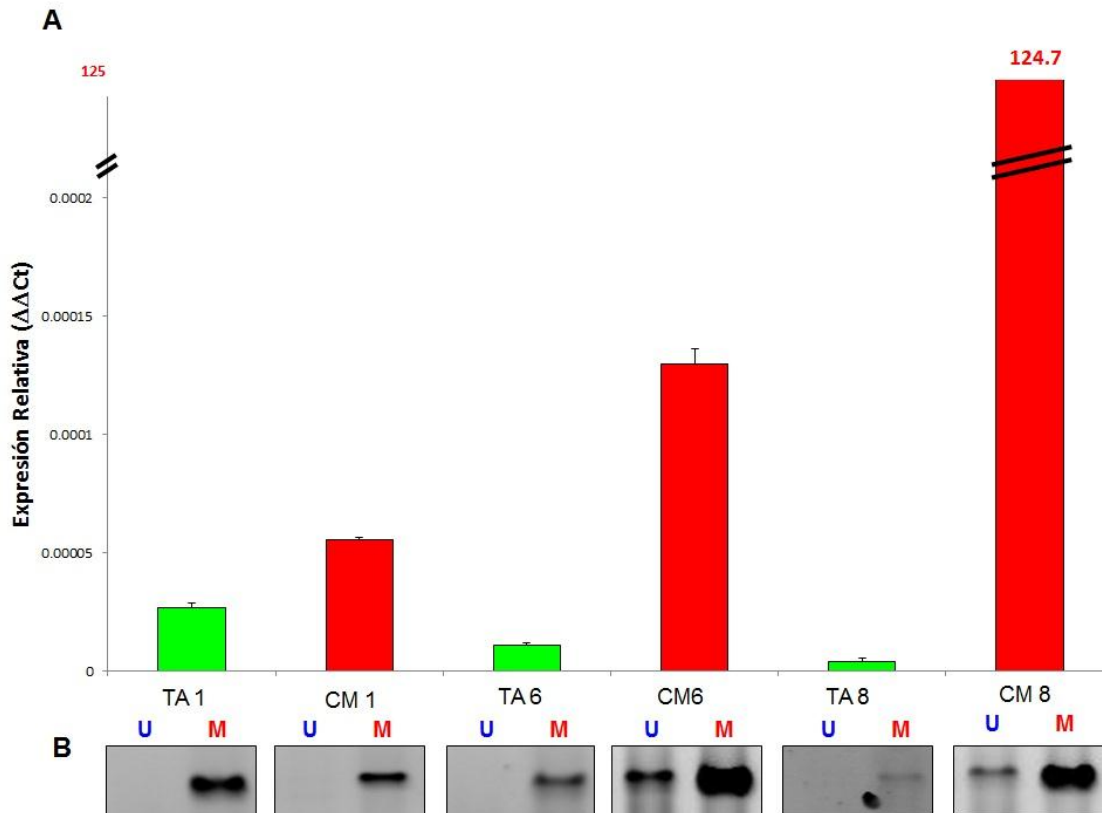
	CTCF		BORIS	
	ADYACENTE	TUMOR	ADYACENTE	TUMOR
1	UNMET	UNMET	MET	MET
2	UNMET	UNMET	PARC MET	PARC MET
3	UNMET	UNMET	PARC MET	PARC MET
4	UNMET	UNMET	PARC MET	MET
5	UNMET	UNMET	PARC MET	PARC MET
6	UNMET	UNMET	MET	PARC MET
7	UNMET	UNMET	PARC MET	PARC MET
8	UNMET	UNMET	MET	PARC MET
9	UNMET	UNMET	PARC MET	MET
10	UNMET	UNMET	PARC MET	PARC MET

<b>MET</b>	Metilado
<b>UNMET</b>	No metilado
<b>PARC MET</b>	Parcialmente Metilado

**Tabla 6. Resumen del análisis del estado de metilación por PCR sensible a metilación de los promotores de *CTCF* y *BORIS* en Tejido adyacente a tumor y cáncer de mama. Verde: No metilado; Rojo: metilado; Amarillo: parcialmente metilado.**

## **Análisis de expresión de *BORIS* por RT-PCR en tiempo real en tejido adyacente a tumor y cáncer de mama.**

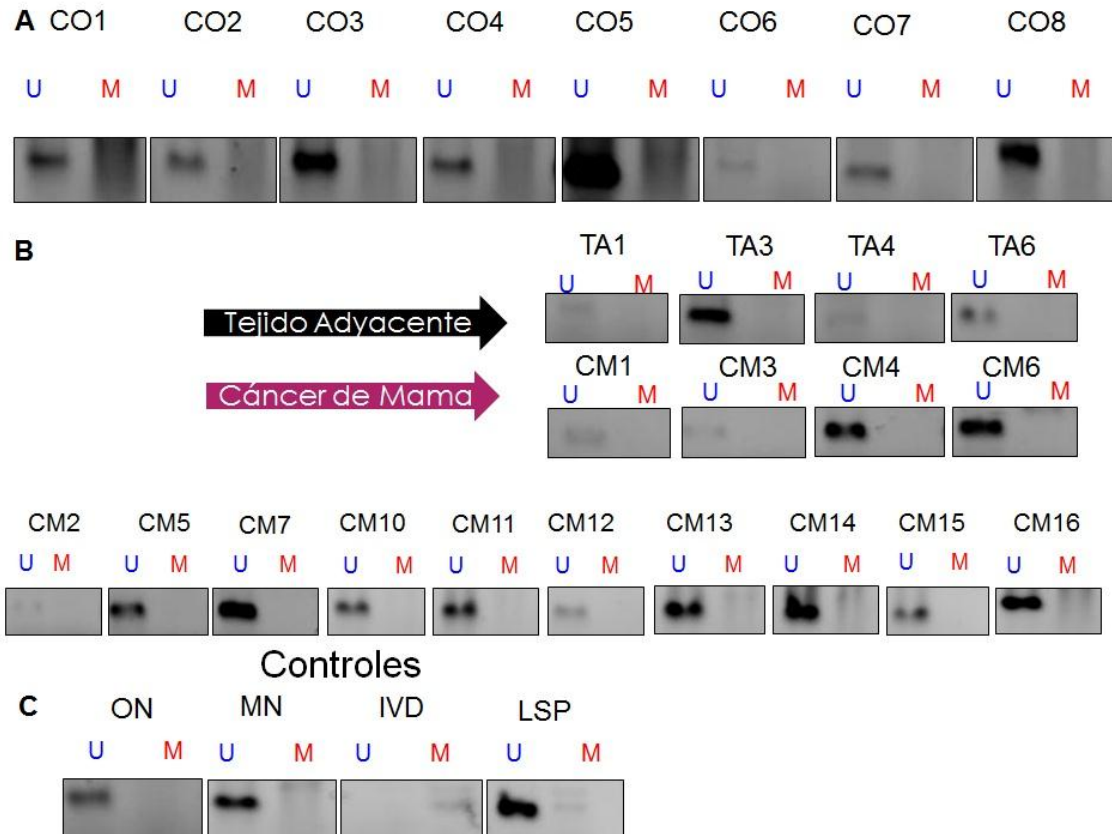
Se analizó la expresión de *BORIS* mediante RT-PCR en tiempo real en tres tumores de mama y su tejido adyacente histológicamente normal. En general, se observa una mayor tasa de expresión de *BORIS* en los tumores (CM1, CM6 y CM8) que en el tejido adyacente normal (TA1, TA6 y TA8). En las muestras TA1 y CM1 se observó un enriquecimiento en la expresión de 1.07 veces en comparación con el tejido adyacente normal; mientras que para las muestras CM6 y CM8 se observó un incremento de expresión de 11.09 veces y de 29,759,074 veces, respectivamente (Figura 7A). Al cotejar estos datos con el estado de metilación se observó que en las muestras TA1 y CM1 donde se observó 1.07 veces de enriquecimiento en la expresión no presentan diferencias en su estado de metilación. Mientras que para las muestras CM6 y CM8 donde se evaluó una diferencia significativa en la expresión de 11.09 veces y de 29,759,074 veces respectivamente, se apreció una pérdida del estado de metilación para ambos tumores. Estos datos sugieren fuertemente que la pérdida de metilación del promotor del gen *BORIS* conlleva su sobre-expresión (Figuras 8A y 7B).



**Figura 8. Comparación del estado de metilación del tejido adyacente y cáncer de mama vs la expresión de *BORIS* por RT-PCR en tiempo real. A – Análisis de expresión de *BORIS* en muestras de tejido adyacente a tumor (TA) y cáncer de mama (CM) por RT-PCR en tiempo real. B – Análisis de metilación del promotor de *BORIS* en tejido adyacente a tumor (TA) y cáncer de mama (CM) por MS-PCR. AU: No metilado; M: Metilado**

## **Análisis de metilación del promotor de *CTCF* por PCR sensible a metilación (MS-PCR).**

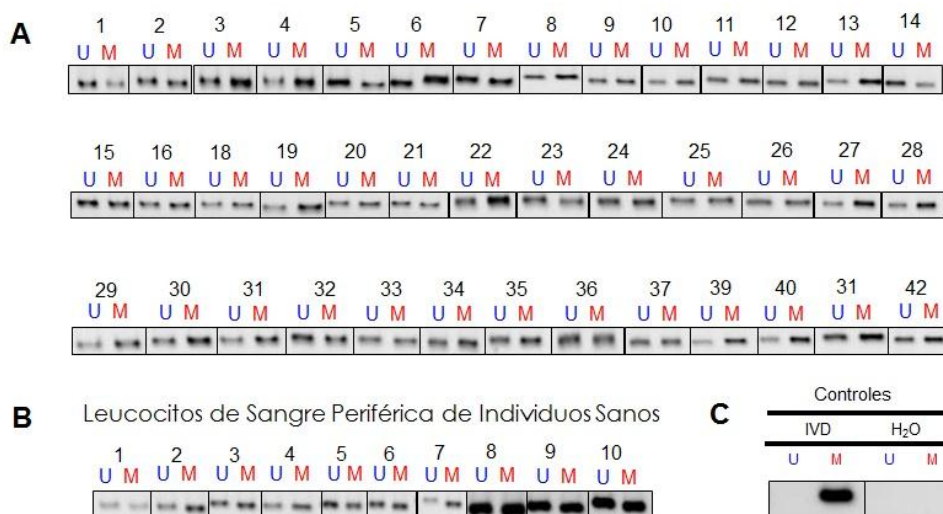
Para estudiar el estado de metilación del promotor de *CTCF* se realizó el ensayo de bisulfito de sodio y posteriormente PCR sensible a metilación de tejido normal, cáncer de ovario y cáncer de mama. En el tejido normal se observó que el promotor de *CTCF* se encuentra no metilado. No se observaron diferencias en el estado de metilación en el promotor de *CTCF* entre las muestras de cáncer de ovario, tejido mamario adyacente al tumor ni en cáncer de mama. Se encontró que el promotor de *CTCF* persiste no metilado (Figura 9 A, B y C). Estos datos proponen que los cambios a nivel de metilación se presentan con mayor frecuencia en el promotor de *BORIS* que en el promotor de *CTCF*.



**Figura 9. Análisis de la metilación del DNA del promotor de *CTCF* en cáncer de ovario, ovario normal, mama normal y cáncer de mama. A – Análisis por MS-PCR en cáncer de ovario (CO). B – Análisis por MS-PCR en tejido adyacente (TA) y cáncer de mama (CM) U: No metilado. M: Metilado. C – Controles: ON: Ovario normal, MN: Mama normal, IVD: DNA metilado *in vitro*, LSP: Leucocitos de sangre periférica.**

## Análisis de *BORIS* como un probable biomarcador en sangre periférica.

Debido a que observamos diferencias en el estado de metilación del promotor de *BORIS* en tejido adyacente a tumor vs tejido tumoral, decidimos analizarlo en leucocitos de sangre periférica con el fin de buscar un posible biomarcador en este tejido. Se analizaron 42 muestras de DNA de leucocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer de mama (Figura 10A) y de 10 individuos sanos (Figura 10B). Doce muestras corresponden al subtipo luminal A, 10 a luminal B, 10 a triple negativo y 10 a Her 2. No se observaron diferencias en el estado de metilación entre individuos sanos y las muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama. Figuras 10 A, B y C.



**Figura 10. Análisis de la metilación del DNA del promotor de *BORIS* en sangre periférica. A – Análisis por MS-PCR en leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama (1 a 42). B – Análisis por MS-PCR (1 a 10). C – Controles. U: No metilado. M: Metilado. IVD: DNA metilado *in vitro*.**

## V DISCUSIÓN

En resumen, durante el desarrollo de la tesis evaluamos el estado de metilación de los promotores de los genes CTCF y BORIS en muestras de cáncer de ovario y mama y su repercusión en la expresión.

Principalmente nos enfocamos en el estudio de estos genes debido a que el factor nuclear CTCF se encuentra implicado con diversas funciones celulares, dentro de las que se encuentran la estructuración del núcleo celular, la regulación de la expresión génica y actualmente con la capacidad de proteger a los promotores génicos en contra de un silenciamiento epigenético aberrante como la metilación del DNA (Butcher *et al*, 2007). Por ello, este factor ha sido clasificado como gen supresor de tumores. Por otro lado, *BORIS* – el gen parálogo de *CTCF* – se expresa de manera tejido específico durante la espermatogénesis y en tejidos con una alta tasa de replicación como la epidermis (Rosa-Garrido *et al*, 2012). Debido a que este gen se encuentra implicado en la fomentar la duplicación celular, ha sido catalogado como proto-oncogen. Normalmente, el promotor de este gen se encuentra silenciado por metilación de DNA, evitando así una proliferación descontrolada de la célula (Figura 1).

La mayoría de los cánceres resultan de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que transforman un fenotipo normal a uno invasor o metastásico. Dentro de estos procesos se encuentra la metilación del DNA que deriva en la



alteración de la expresión de genes como los genes supresores de tumores y oncogenes.

Elegimos en particular los modelos de cáncer de mama y cáncer de ovario debido a que son dos de los tumores ginecológicos no asociados a virus más frecuentes en la población mexicana y que a su vez se ha reportado la desregulación en la expresión de gen supresor de tumores *CTCF* y el oncogen *BORIS*.

Al analizar el estado de metilación del promotor de *BORIS* en cáncer de ovario al compararlo con tejido normal, se observó la pérdida de la metilación del DNA en la mayoría de las muestras provenientes de tumores de ovario y mama en comparación con tejido normal. Esto sugiere que los cambios epigenéticos como la metilación del DNA en oncogenes como *BORIS* pueden estar involucrados en procesos que derivan en el desarrollo de neoplasias.

Al analizar la expresión de *BORIS*, observamos que este gen se encuentra sobre expresado en los tumores en comparación del tejido adyacente. Al comparar el estado de metilación del DNA del promotor de *BORIS* con la expresión del gen observamos que existe una relación entre la pérdida de metilación del promotor y la sobre-expresión del gen. De igual forma, al evaluar el estado de metilación en distintas muestras de tejido adyacente al tumor en comparación con DNA de tejido normal encontramos que existe la pérdida de metilación. Estos datos apuntan que

la alteración del estado de metilación del DNA en el promotor de *BORIS* es un evento temprano en el desarrollo del cáncer de mama.

Por otro lado, al analizar el estado de metilación del promotor de *CTCF* no observamos diferencias en su estado de metilación en los tejidos analizados (cáncer de mama, cáncer de ovario y tejido normal). Esto indica que el fenómeno de desregulación epigenética mediada por metilación del DNA afecta principalmente al oncogen *BORIS* y no a *CTCF*.

Debido a esto nos pareció imperante buscar el posible papel de *BORIS* como biomarcador en sangre periférica. El grupo de Klenova describió incremento en la expresión de *BORIS* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en 2006 (D'Arcy, 2006); sin embargo, en nuestro estudio estos datos no fueron reproducibles. Esto parece indicar que el estudio de estos genes sólo puede realizarse en tejido tumoral.

## VI CONCLUSIONES

Se observó la pérdida parcial de metilación del promotor de *BORIS* en tumores mamarios y ovario en comparación con tejido no tumoral. Esto parece indicar que hay una asociación entre la pérdida de metilación del promotor de *BORIS* y las neoplasias. A su vez, esto parece estar asociado con incremento en la expresión del promotor de este gen.

El promotor de *CTCF* se encontró no metilado tanto en neoplasias como en tejido sano, sugiriendo que los cambios a nivel de metilación afectan a *BORIS*.

No se observaron diferencias en el estado de metilación de *BORIS* en leucocitos de sangre periférica; por lo que la determinación del estado de metilación de *BORIS* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama **NO** es útil como biomarcador.

## VII REFERENCIAS

**Antequera F.** Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1647-1658.

**Balmain A, Gray J, Ponder B.** The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*, 2003; 33: 238-244.

**Baylin SB, Jones PA.** A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 726-734

**Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A.** An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 2009; 23: 781-783.

**Blair LP, Yan Q.** Epigenetic mechanisms in commonly occurring cancers. *DNA Cell Biol*, 2012. Apr 20. Epub ahead of print.

**Butcher DT, Mancini-DiNardo DN., Archer TK, Rodenhiser DI.** DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer* 2004; 111: 669-678.

**Butcher DT, Rodenhiser DI.** Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer* 2007; 43: 210-219.

**Cianfrocca M.** Overcoming recurrence risk: extended adjuvant endocrine therapy. *Clin Breast Cancer* 2008; 8(6):493-500.

**D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N,, Docquier F, Torrano V, Chernukhin I, Smart M, Farrar D, Metodiev M, Fernandez N, Richard C, Delgado M, Lobanenkov V, Klenova E.** The potential of BORIS detected in leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20): 5978-5986.

**De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arano H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F.** Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* 2007; 67: 2577-2585.

**Ehrlich M.** DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1(2): 239-259.

**Esteller M.** Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports* 2011; 3:9

**Feinberg AP, Vogelstein B.** Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.

**Feinberg, AP, Tycko B.** The history of cancer epigenetics. *Nature Rev Cancer* 2004; 4, 143–153.

**Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S.** The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33.

**Felsenfeld G, Groudine M.** Controlling the double helix. *Nature* 2003; 421: 448-453.

**Frazier ML, Xi I, Zong J, Viscofsky N, Rashid A, Wu EF, Lynch PM, Amos CI, Issa JP.** Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63 (16): 4805-8.

**Gupta GP, Massague J.** Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006;127:679-95.

**Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylationspecific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9821-9826.

**Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminoyu R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CI, Ruhl J, Tatalovkch Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds).** SEER Cancer Statistics REview, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD. [http://seer.Cancer.gov/csr/1975\\_2008/](http://seer.Cancer.gov/csr/1975_2008/), based on Novemeber 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.

**Hughes LAE, Khalid-de Bakker CAJ, Smits KM, van den Brandt PA, Jonkers D, Ahuja N, Herman JG, Weijenberg MP, von Engeland M.** The CpG island

methylator phenotype in colorectal cancer: Progress and problems. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825(1): 77-85.

**Irizarry RA, Ladd-Acosta c, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui h, Gao K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash, Subunciyan, Feinberg AP.** The human colon cancer methylome shows similar hypo and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Gen* 2009; 41: 178-186.

**Issa, JP.** CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988-93.

**Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3:415-428.

**Jones PA, Ogunkolade BW, Szary J, Aarum J, Mumin MA, et al.** Widespread Expression of *BORIS/CTCF* in Normal and Cancer Cells. *PLoS ONE*, 2011; 6(7): e22399.

**Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al.** Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1566-1575.

**Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenkov VV.** The novel *BORIS + CTCF* gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 2002, 12:399-414.

**Lukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse III HC, Lobanenkov VV.** BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with *CTCF*, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *PNAS* 2002; 99 (10): 6806-6811.

**Lund AH, van Lohuizen M.** Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004; 18(19):2315-35.

**Necochea-Campion R, Ghochikyan A, Josephs SF, Zacharias S, Woods E, Karimi-Busheri F, Alexandrescu DT, Chen C, Agadjanyan MG, Carrier E.** Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCF-L) in the human genome. *J Transl Med.* 2011; 9: 213.

**Nowell PC.** The clonal nature of neoplasia. *Cancer Cells* 1989,1: 29–30

**Robertson KD.** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):597–610.



**Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, Abraira C, Delgado MD, et al.** A Cell Cycle Role for the Epigenetic Factor CTCF-L/BORIS. *PLoS ONE*, 2012; 7(6):e39371.

**Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V.** CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 2001; 17: 520-527.

**Phillips JE, Corces VG.** CTCF: Master weaver of the genome. *Cell* 2009; 137: 1194-1211.

**Schroeder M, Mass MJ.** CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:403–6

**Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29.

**Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al.** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.

**Soto-Reyes E, Recillas-Targa F.** Epigenetic regulation of the human p52 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* 2010; 29 (15): 2217-27.

**Tollervey JR, Lunyak VV.** Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 2012; 7:8, 1-18

**Van De Voorde L. et al.** DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer. *Mutat Res* 2012. Article in press

**Wallace JA, Felsenfeld G.** We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 400-407.

**Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D.** Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: 457-466.

**Williams K, Christensen J, Helin K.** DNA methylation: TET proteins – guardians of CpG islands? *EMBO reports* 2012; 13, 28-35.