



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA
BORIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE
MAMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ILIANA MONSERRAT ALCALÁ MORENO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
2013**



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la tutela del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, quienes recibieron apoyos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN213311) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (83959 y 182997).

Los estudios de licenciatura de la alumna Iliana Monserrat Alcalá Moreno fueron apoyados con el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (Probei) de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser las personas más maravillosas de este mundo. No estaría en este camino de no ser por su apoyo moral y su amor incondicional. Gracias por enseñarme a ser una persona fuerte y valiente ante los obstáculos. Gracias por estar a mi lado durante estos años de cambios de humor, desvelos y prácticas. Gracias por aconsejarme, animarme y guiarme en todo momento. Estaré agradecida eternamente con ustedes pues este título no es sólo mío, también es suyo. ¡Los amo con toda mi alma!

A mi familia, por su apoyo y compañía a través de este camino. A mi abuela Eva, por cuidarme cada vez que el trabajo exagerado me hacía enfermar. A mi abuelo Miguel, por enseñarme fortaleza a pesar de la incomodidad de los años. A mi tía Norma, por los consejos y su entereza ante la vida. A mi tío Jaime y su familia, por motivarme a seguir adelante. A los que nunca conocí, mis abuelos Carmen y Roberto, quienes estarán eternamente en mi corazón.

A Ernesto, por ser la piedra angular de esta aventura (¡no pude evitarlo, je je je!). No existen palabras suficientes para agradecer los consejos y las enseñanzas que me has dado, la paciencia que has tenido conmigo en tiempos de crisis y el tiempo que hemos invertido en el laboratorio para que este trabajo comience a brillar. No sólo eres mi maestro, eres un gran amigo por inspirarme entusiasmo, motivarme a seguir adelante, valorar mi trabajo... y enseñarme que los problemas se olvidan con una buena cerveza. A tu familia, por abrirme las puertas de su hogar. A Andrea, por las pláticas en el auto y dejarme verla en pijama cuando nos tocaba seminario en las mañanas. A Vale, por enseñarme cómo un bebé es capaz de hacer que el tiempo vuele. A Lilu, por alegrarme las mañanas con el movimiento feliz de su cola peluda y un beso improvisado.

A Rodrigo, por ser cómplice de este trabajo. Gracias por darme consejo en tiempos de crisis y hacerme olvidar los malos momentos con una sonrisa. Por enseñarme que las clases de historia pueden ser divertidas, aún cuando hayan sido en el año mil novecientos tijiiri dos. Por mostrarme que los hermanos mayores existen y el mejor consejo que pueden darte es que las tesis se escriben mejor con un buen repertorio de música metalera.

A Erick, por su amor incondicional. Por darme ánimos para alcanzar este logro. Por defenderme cuando el mundo me atacaba al verme indefensa. Por impedir que me durmiera en esas noches de escritura. Por tomarme de la mano cuando sentía que iba a caer en cualquier momento. Te amo y siempre te amaré. Rebe, Fide, Albita y Güicha, muchas gracias por su calidez, su cariño y sus consejos; por enseñarme que siempre debemos fortalecernos y que cada batalla que se nos presenta nunca la enfrentamos solos.

Al equipo del laboratorio de carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, por enseñarme las cuestiones básicas de trabajo y brindarme su compañía y amistad. En especial, gracias al Dr. Luis Herrera, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio y a Clementina Castro, por su apoyo técnico.

A Romina, por su sincera amistad desde la secundaria. Gracias por enseñarme que la amistad se fortalece y perdura a través de los años. Gracias por las aventuras, los abrazos, los consejos, las risas y por enseñarme cómo es tener una hermana. Al resto de la “bandera” (Bono, Chucho, Misa, Vaquero y Zéttter) por enseñarme que los momentos sencillos son los que valen oro y las quesadillas siempre te sacan de apuros.

A Karina, Mariana, Ulises, Paty, Ithzel y Ximena, por enseñarme que la prepa no es tan decadente como parece. Gracias por esta amistad auténtica donde descubrí cómo los hermanos con diferentes personalidades pueden llevarse increíblemente bien. Gracias por enseñarme que siempre debemos ser nosotros mismos, que las ideas originales funcionan la mayoría de las veces y que los tragos amargos se olvidan con un buen pedazo de pizza.

A Julio, Ángel, Carlos y Tomás, por mostrarme que las armas, los piratas y los zombis también son cosa de mujeres. Gracias por su amistad sincera donde aprendí que las clases son menos aburridas con un toque de irreverencia y que en una lap se pueden ver buenas películas durante las horas libres. Gracias por mostrarme que los amigos siempre acuden en tu ayuda cuando los necesitas y que los videojuegos son un remedio excelente para deshacerse del estrés.

Iliana Monserrat Alcalá Moreno
Abril 2013

Doy Gracias a Todos

*Doy las gracias a todos los que me han amado en sus corazones,
Con las gracias y el amor que hay en el mío. Profundas gracias a todos
Los que se han demorado en los muros de esta prisión
Para escuchar mi música en su más intenso dolor,
Flotando siempre hacia adelante, llenando el espacio
Del pagano templo, más allá de las palabras.
Tú, quien te hundes y caes en mi voz
Cuando la pena te arrebató, el divino instrumento
Del arte se despliega ante tus pies
Para escuchar lo que he dicho entre lágrimas,
Enséñame cómo agradecerte. Enséñame cómo
Ver el sentido de mi vida en los años futuros,
Y a sentir que el amor perdura en la vida que se desvanece.*

Elizabeth Barret Browning (1806 – 1861)

Sobreviví la noche

*De algún modo sobreviví la noche
Y entré en el día.
Al salvado le basta su salvación
Aunque no sepa cómo.*

*Así tomo mi lugar entre los vivos,
Como alguien me escoltase,
Candidata al azar de la mañana
Pero citada con los muertos.*

Emily Dickinson (1830 – 1886)

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN	
1. El cáncer	
1.1. Definición de cáncer.....	5
1.2. Descripción del cáncer.....	5
1.3. Clasificación del cáncer.....	7
1.3.1. Carcinomas.....	7
1.4. Cánceres ginecológicos.....	8
1.4.1. La mama normal.....	8
1.4.1.1. Estructura anatómica.....	9
1.4.2. Cáncer de mama.....	11
1.4.2.1. Estadificación del cáncer.....	11
1.4.2.2. Evaluación patológica: sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado.....	11
1.4.2.3. Factores de riesgo.....	12
1.4.2.4. Defectos genéticos.....	13
2. La epigenética	
2.1. Definición de epigenética.....	16
2.2. Defectos epigenéticos en cáncer.....	17
3. CTCF	
3.1. El gen <i>CTCF</i>	19
3.2. La proteína CTCF.....	19
3.3. CTCF en cáncer.....	22
4. BORIS	
4.1. El gen <i>CTCF-L</i>	24
4.2. La proteína BORIS.....	24
4.3. BORIS en cáncer.....	26
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
V. HIPÓTESIS.....	29
VI. OBJETIVO GENERAL.....	29
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
VIII. RESULTADOS	
1. Evaluación de los niveles de expresión de los genes <i>CTCF</i> y <i>CTCF-L</i> en líneas celulares normales y cancerosas de mama.....	30
2. Estudio de la abundancia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS en líneas celulares normales y cancerosas de mama.....	30
3. Determinación de la unión de CTCF y BORIS en los promotores de los genes <i>miR125b-1</i> y <i>p53</i> en líneas celulares normales y cancerosas de mama.....	31
4. Desregulación de CTCF y BORIS en una línea celular de cáncer colorrectal.....	31

5. Caracterización de la abundancia y la localización de CTCF y BORIS en muestras de pacientes con cáncer de mama.....	32
IX. DISCUSIÓN.....	39
X. CONCLUSIÓN.....	44
XI. PERSPECTIVAS.....	45
XII. MÉTODOS EN EXTENSO	
1. Aislamiento de RNA en líneas celulares mediante TRIZOL (GIBCO) para células que crecen en monocapa.....	46
1.1. Preparación del gel de formaldehído (FA) 1.2%.....	47
1.2. Preparación de la muestra de RNA.....	48
3. Inmunofluorescencias (IF).....	50
4. Inmunohistoquímicas (IHQ).....	52
5. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	55
5.1. Preparación de las perlas.....	58
6. Líneas celulares.....	59
7. Síntesis de cDNA (SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (First Strand cDNA Synthesis Using Superscript II RT – Invitrogen).....	61
8. Transfección del plásmido CTCF-GFP.....	62
9. Oligonucleótidos.....	63
9.1. Análisis de expresión.....	63
9.2. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	63
XIII. SUPLEMENTARIAS	
1. Control negativo de las inmunofluorescencias para estudiar la presencia y la localización de las proteínas BORIS y CTCF en el núcleo de células mamarias normales y cancerosas.....	64
2. Promotor de <i>miR125b-1</i>	65
3. Promotor de <i>p53</i>	65
XIV. BIBLIOGRAFÍA	
1. Artículos.....	66
2. Libros.....	78
3. Páginas web.....	79

RESUMEN

El factor de unión CCCTC, mejor conocido como CTCF, se ha reconocido como un factor que promueve de manera negativa o positiva la transcripción génica. A nivel global, esta proteína puede mediar interacciones cromatínicas de largo alcance, permitiendo así la regulación de la expresión génica de dominios completos. A nivel local, CTCF se asocia con una función de barrera en contra de la propagación de la metilación del DNA y marcas represivas de histonas, particularmente en promotores asociados con islas CpG tales como *BRCA1*, *Rb*, *p16*, *p53*, *miR125b-1*, entre otros. La disociación de CTCF está relacionada con el silenciamiento génico por fenómenos epigenéticos. Por otra parte, *CTCF* posee un gen parálogo denominado *CTCF-Like (CTCF-L)* el cual codifica a la proteína llamada *Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS)*. *CTCF-L* se expresa generalmente en testículo y se ha observado su expresión anormal en diferentes neoplasias como cáncer de mama.

Uno de los intereses de este trabajo fue conocer si CTCF y BORIS se encontraban desregulados en cáncer de mama. Como primer abordaje experimental se determinó la expresión de *CTCF* y *CTCF-L* por PCR en dos líneas de células tumorales, MDA-MB-231 y MCF-7, y se comparó con la línea celular normal MCF-10A. Estos resultados sugieren que BORIS se sobre-expresa en las líneas celulares tumorales. Con el fin de evaluar la localización de BORIS y CTCF en las tres líneas se realizaron inmunofluorescencias. Estos datos mostraron que en células normales, BORIS está localizado principalmente en el nucleolo, mientras que en la línea celular MCF-7 se observó únicamente en núcleo. No se observaron diferencias de localización de CTCF en las tres líneas. Para determinar si BORIS podía unirse a algunos de los sitios de CTCF previamente reportados (como el promotor de *miR125b-1* y *p53*) se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En la línea cancerosa de mama MCF-7, los datos mostraron que BORIS se unió a la región de *miR125b-1* y se enriqueció una marca de silenciamiento, la H3K9me3. Para el promotor de *p53* se observó la unión de CTCF. Para comprobar si la desregulación de CTCF y BORIS podía presentarse en otro modelo celular, se realizaron inmunofluorescencias y ChIP en la línea de cáncer colorrectal HCT-116. En esta línea se observaron resultados similares a los obtenidos con MCF-7 como la presencia de BORIS a nivel nuclear y su unión al promotor del gen *miR125b-1*. Con el objetivo de determinar la localización de ambas proteínas en cortes

histológicos de pacientes con cáncer de mama se realizaron inmunohistoquímicas. En ellas se observó que BORIS se hallaba principalmente enriquecido en el citoplasma en la mayoría en las muestras de pacientes.

Como conclusión, *CTCF* y *CTCF-L* se sobre-expresan en líneas celulares de cáncer de mama. La presencia y la localización de CTCF no sufren cambios, sin embargo, BORIS aparentemente se transloca de nucleolo a núcleo en la línea celular MCF-7. Asimismo, BORIS se une a la región promotora del *miR125b-1*, gen normalmente regulado por CTCF. El fenómeno de translocación se observó en otro modelo celular, la línea de cáncer colorrectal HCT-116. En contraste, datos preliminares sugieren una pérdida del factor nuclear CTCF y una mayor presencia de BORIS en muestras de pacientes con cáncer de mama.

In conclusion, *CTCF* and *CTCF-L* were over-expressed in cell lines of breast cancer. Presence and location of CTCF remain unchanged; however, apparently BORIS is translocated from the nucleolus to the nucleus in the MCF-7 cell line. Likewise, BORIS binds to the promoter region of *miR125b-1*, a gene normally regulated by CTCF. The translocation phenomenon was observed in other cell model, the colorectal cancer cell line HCT-116. In contrast, preliminary data suggest a loss of nuclear CTCF factor and a greater presence of BORIS in samples from patients with breast cancer.

ABSTRACT

The binding-factor CCCTC, better known as CTCF, has been recognized as a factor that promotes a negative or positive gene transcription. Globally, this protein can mediate long-range chromatin interactions, allowing the regulation of gene expression of whole domains. Locally, CTCF is associated with a function of barrier against the propagation of DNA methylation and repressive histone marks, particularly in CpG islands associated with promoters such as *BRCA1*, *Rb*, *p16*, *p53*, *miR125b-1*, between others. CTCF dissociation is related to gene silencing by epigenetic phenomena. Moreover, a gene CTCF paralog, known as *CTCF-Like (CTCF-L)*, encodes a protein called *Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS)*. *CTCF-L* is usually expressed in testis and abnormal expression has been observed in various malignancies such as breast cancer.

One of the interests of this study was to determine if CTCF and BORIS were deregulated in breast cancer. As a first experimental approach *CTCF* and *CTCF-L* expression was determined by RT-PCR in two tumor cells lines, MDA-MB-231 and MCF-7, and compared with the normal cell line MCF-10A. These results suggest that BORIS is over-expressed in tumor cell lines. To assess the localization of BORIS and CTCF in the three cell lines, immunofluorescence staining was performed. These data showed that in normal cells, BORIS is located principally in the nucleolus, while in cell line MCF-7 was observed only in the nucleus. There was no difference in localization of CTCF in the three cell lines. To determine if BORIS could bind to some CTCF sites previously reported (as *miR125b-1* and *p53* promoters), a chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed. In breast cancer line MCF-7, the data showed that BORIS binds to *miR125b-1* region and H3K9me3, a mark of silencing, is enriched. For the *p53* promoter CTCF binding was observed. To check whether the deregulation of CTCF and BORIS could occur in other cell model, immunofluorescence staining and chromatin immunoprecipitation (ChIP) were performed in the colorectal cancer cell line HCT-116. In this line, results were similar to those obtained with MCF-7 as the presence of BORIS in a nuclear level and it's binding to the gene promoter *miR125b-1*. In order to determine the localization of both proteins in histological sections of breast cancer patients, immunohistochemistry assays were performed. BORIS localized mainly in the cytoplasm of most samples.

INTRODUCCIÓN

El cáncer

Definición de cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizado por un crecimiento celular anormal provocado por cambios múltiples en la expresión génica. Esto promueve el establecimiento de una población celular con ciclos desregulados de proliferación y muerte donde, en algunos casos, puede obtener la capacidad de invadir otros tejidos al diseminarse a través de los sistemas linfático y sanguíneo mediante un fenómeno conocido como metástasis (DeVita, *et al.*, 2000; Ruddon, 2007; Instituto Nacional del Cáncer, 2012). Se considera que los orígenes del cáncer son múltiples y variados ya que incluyen factores ambientales, agentes infecciosos, genéticos y epigenéticos (DeVita, *et al.*, 2000; Balmain, *et al.*, 2003).

Descripción del cáncer

El cáncer se desarrolla en seis fases principales: iniciación, promoción, transformación, progresión, formación del tumor y, en algunos casos, metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011; Figura 1A). En la iniciación, se encuentran involucrados tanto factores ambientales, genéticos y, más recientemente, epigenéticos los cuales promueven que una o varias células adquieran características que fomenten su división celular descontrolada (Balmain, *et al.*, 2003; Sherr, 2004).

A nivel molecular, el crecimiento de una población de células cancerosas se favorece a través de la inactivación de genes supresores de tumores, los cuales regulan el ciclo celular, y la sobreexpresión de oncogenes, que promueven la división celular (Sherr, 2004). El conjunto de estos procesos fomenta la transformación celular, la cual se propaga de manera heredable y deriva en su promoción (Hanahan y Weinberg, 2000; Feinberg, *et al.*, 2006; Hanahan y Weinberg, 2011). La adquisición paulatina de estas características permite que las células puedan dividirse de forma descontrolada fomentando el crecimiento de un tumor canceroso.

Muchas de estas células tumorales tiene la capacidad de adquirir ventajas adaptativas que les permiten migrar hacia otros tejidos, fenómeno conocido como metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011; Figura 1B).

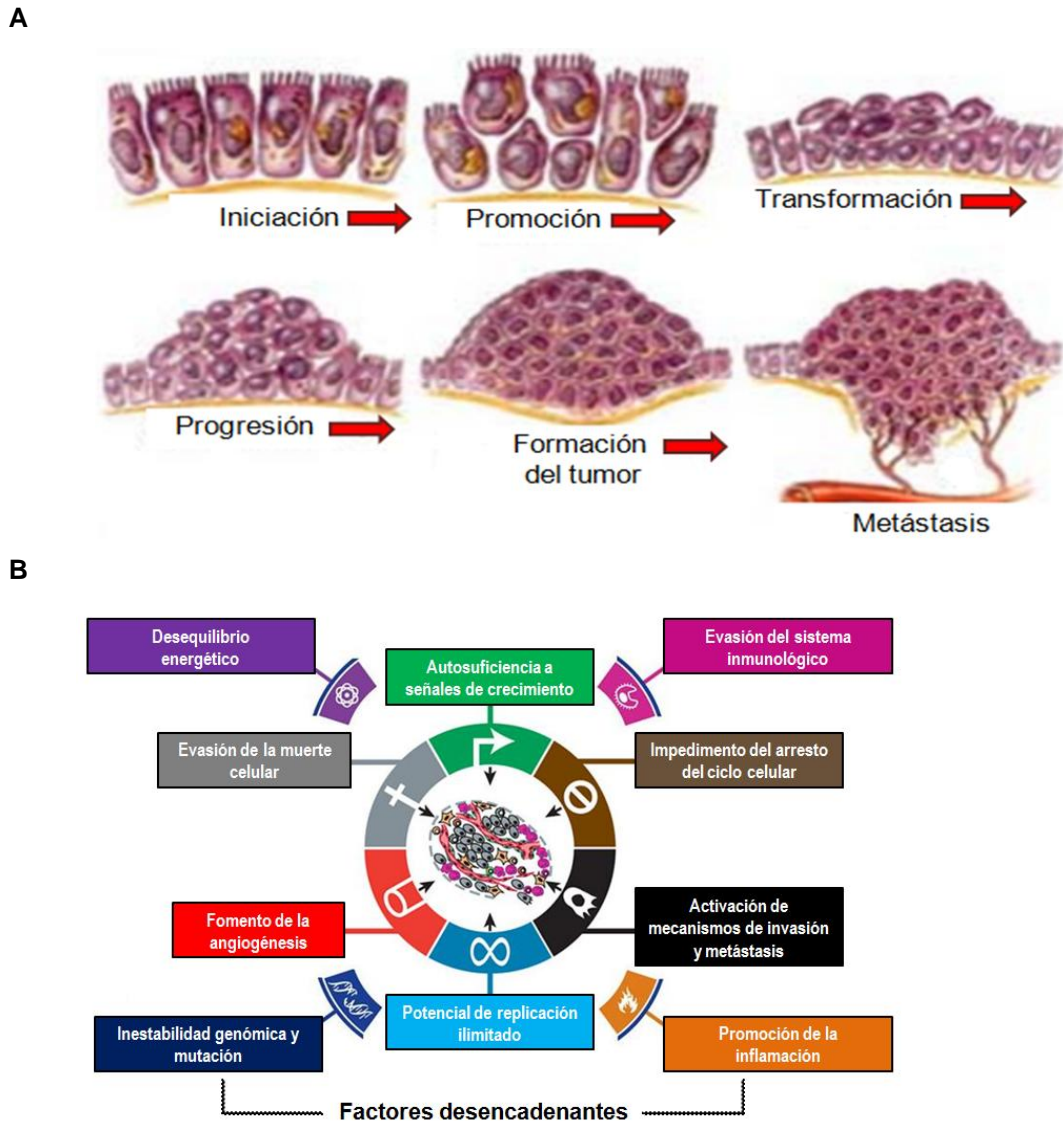


Figura 1. Fases del desarrollo del cáncer y las características principales de una célula cancerosa. A. Representación esquemática de las fases de desarrollo del cáncer. **B.** Características adquiridas por las células durante la fase de progresión del cáncer (modificado de Hanahan, 2000; 2011).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se ha demostrado que el número total de casos de personas con cáncer está aumentando ya que más de once millones de personas en el mundo son diagnosticadas con cáncer cada año; de igual manera, se ha

convertido en una de las causas principales de mortalidad a nivel mundial ya que causa siete millones de muertes anualmente (OMS, 2008).

Clasificación del cáncer

El cáncer se clasifica en cinco grupos principales en función de su estirpe histológica:

1. **Sarcoma:** Se presenta en células del tejido mesenquimatoso (principalmente hueso, tendón, cartílago, músculo).
2. **Mieloma:** Se origina en las células plasmáticas de médula ósea.
3. **Linfoma:** Se forma en las células del sistema inmunológico.
4. **Leucemia:** Se desarrolla en el sistema hematopoyético; generalmente comienza en la médula ósea y se extiende por la sangre a otras partes del cuerpo, incluyendo los ganglios linfáticos.
5. **Carcinoma:** Se establece en células epiteliales (principalmente piel, glándulas y órganos internos) (Bunz, 2008; National Cancer Institute, 2012) y representa del 80 al 90% de todos los cánceres de mama.

Carcinomas

La clasificación histopatológica de los carcinomas hace posible dividirlos en dos tipos principales:

1. **Ductal:** Es el que se desarrolla en los conductos galactóforos y comprende aproximadamente el 90% de los casos de cáncer de mama.
2. **Lobulillar:** Es el que se presenta en los lóbulos de la mama normal y comprende el 10% de los casos restantes (DeVita, *et al.*, 2000; Díaz Rubio y García Conde, 2000; Peacock, 2002; Figura 2).

A su vez, estas dos categorías se subdividen en no invasivos (*in situ*) o invasivos (infiltrantes). Los carcinomas *in situ* se caracterizan por no invadir el parénquima o el estroma de la mama y tienen un potencial bajo de generar metástasis. Por su parte, los carcinomas infiltrantes penetran en el tejido circundante normal y presentan una mayor tendencia a metastatizar. Otros tipos menos frecuentes de carcinomas invasivos comprenden los

mucinosos, papilares, medulares, tubulares adenocísticos, entre otros (Díaz Rubio y García Conde, 2000; Tabla 1).

Carcinoma no invasivo	Carcinoma invasivo
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Carcinoma ductal invasivo
Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>	Carcinoma lobulillar invasivo
	Carcinoma mucinoso
	Carcinoma medular
	Carcinoma tubular
	Carcinoma adenoide cístico
	Carcinoma secretor (juvenil)
	Carcinoma apócrino
	Carcinoma metaplásico
	Carcinoma inflamatorio
	Otro (especificar)

Tabla 1. Clasificación de los tipos de carcinomas que pueden presentarse en la mama (modificado de DeVita, *et al.*, 2000).

Cánceres ginecológicos

Las formas de cáncer que afectan exclusivamente a las mujeres se conocen como cánceres ginecológicos y pueden desarrollarse en el cuello del útero, el útero, los ovarios, los oviductos, la vagina y la vulva (The Permanente Medical Group, 2006).

El tipo de cáncer más común en las mujeres de todo el mundo es el cáncer de mama. Tendencias mundiales desde 1980 hasta 2010 han mostrado que tanto la incidencia como la mortalidad de esta enfermedad han ido en aumento. En el caso de México, desde 2006 el cáncer de mama ha sido la causa principal de mortalidad por cáncer en las mujeres adultas (Chávarri-Guerra, *et al.*, 2012).

La mama normal

Las glándulas mamarias, o mamas, constituyen una característica distintiva de los mamíferos (Bland y Copeland III, 2004) y presentan dos características diferenciales muy importantes: están modificadas para producir leche y tienen la capacidad de respuesta hormonal (AEP, 2008).

Las mamas son glándulas que han evolucionado como órganos productores de leche con el fin de proporcionar nutrición a los descendientes. En la mujer, las mamas experimentan un desarrollo posnatal importante que se correlaciona con la edad y es regulado por hormonas que influyen en la función reproductora. Alrededor de los 20 años de edad las mamas alcanzan su desarrollo máximo y cerca de los 40 años comienzan a presentar cambios atróficos (Bland y Copeland III, 2004; Welsch y Sobotta, 2009).

Durante cada ciclo menstrual se producen cambios estructurales en la mama bajo la influencia de las concentraciones de las hormonas ováricas mientras que en el embarazo y la lactancia aparecen cambios notables en la actividad funcional de la glándula mamaria y la cantidad de tejido glandular. Los cambios hormonales que se producen en la menopausia se asocian con la regresión o involución del componente glandular de la mama, que es reemplazado por tejido adiposo y conectivo (Bland y Copeland III, 2004; Welsch y Sobotta, 2009).

Estructura anatómica

Las mamas de la mujer adulta se extienden hacia abajo desde el nivel de la segunda o tercera costilla hasta el pliegue inframamario, el cual se encuentra sobre el nivel de la sexta o la séptima costilla, y hacia la parte externa desde el borde lateral del esternón hasta la línea axilar anterior o medioaxilar (Bland y Copeland III, 2004; Baggish y Karram, 2006; Welsch y Sobotta, 2009). Están compuestas de tejido glandular, tejido graso y tejido conectivo de soporte. La piel del pezón y la areola está pigmentada y sobresale; ésta última contiene glándulas sebáceas, sudoríparas y areolares accesorias (AEP, 2008).

El tejido glandular de la mama se encuentra dentro del estroma compuesto por tejido adiposo, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, tejido muscular y tejido conectivo laxo, además de glándulas sebáceas y folículos pilosos que desembocan en la piel de la mama y alrededor de la areola (Figura 2). Asimismo está formado por un gran número de alvéolos de 0.12 mm de diámetro en los que se elabora la leche (Figura 3A). Los ramilletes de entre 10 y 100 alvéolos se agrupan de forma arborescente en lobulillos los cuales desembocan en los conductos. A su vez, el grupo conformado por 20 a 40 lobulillos se conoce como un lóbulo y cada mama contiene, aproximadamente, entre 15 y 20 lóbulos. Asimismo, los conductos

alcanzan su mayor calibre (entre 2 a 4 mm) y son denominados conductos galactóforos. Estos conductos se dilatan aún más al atravesar el pezón formando los senos galactóforos (5 a 8 mm), que son de 8 a 10 reservorios situados detrás del pezón que drenan la leche al exterior (AEP, 2008; Figura 3B).

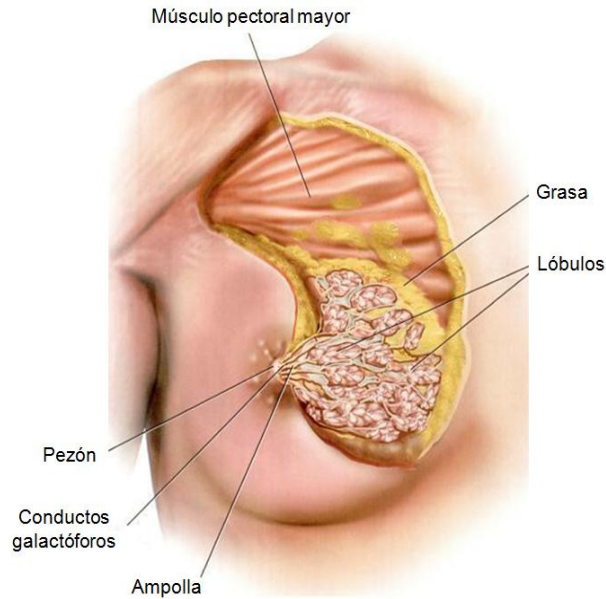


Figura 2. Representación esquemática de la estructura anatómica de la mama normal (tomado de Baggish y Karram, 2006).

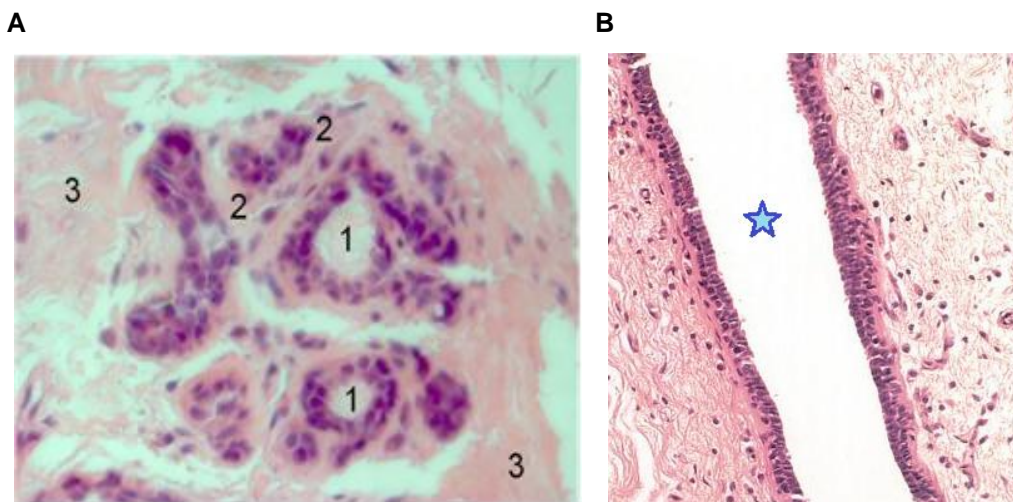


Figura 3. Histología de la mama normal. **A.** Corte transversal (100 aumentos) de una glándula mamaria normal no lactante humana. Tinción con hematoxilina y eosina (H y E) que muestra los conductos terminales intralobulillares (1), el tejido conjuntivo laxo del lobulillo con células abundantes (tejido conjuntivo intralobulillar) (2) y el tejido conjuntivo interlobulillar (3). **B.** Tinción H y E de un conducto galactóforo con epitelio biestratificado; * luz (tomado de Welsch y Sobotta, 2009).

Cáncer de mama

Actualmente el cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas entre 30 a 65 años de edad (GLOBOCAN, 2008; Chávarri-Guerra, *et al.*, 2012). En México, es causante de un mayor número de muertes en comparación con el cáncer cérvico-uterino (Knaul, *et al.*, 2009). La mortalidad por cáncer de mama ha aumentado de 58 por cada 100,000 habitantes en 1998 a 67 por cada 100,000 en 2008 (Chávarri-Guerra, *et al.*, 2012).

Estadificación

La estadificación describe la gravedad del cáncer que aqueja a una persona basándose en la extensión del tumor primario y si el cáncer se ha diseminado en el cuerpo o no. Algunos sistemas de estadificación cubren muchos tipos de cáncer; otros se enfocan en un tipo particular. Los elementos comunes que se consideran en la mayoría de los sistemas de estadificación son:

1. El sitio del tumor primario.
2. El tamaño del tumor y número de tumores.
3. La complicación de ganglios linfáticos (diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos)
4. El tipo de célula y grado del tumor (qué tanto se parecen las células cancerosas a las células normales de tejido).
5. La presencia o ausencia de metástasis (Bland y Copeland III, 2004; Instituto Nacional del Cáncer, 2010).

Evaluación patológica: sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado

Asimismo, los patólogos asignan un grado histológico a la muestra de tejido tumoral de un paciente con el objetivo de identificar el tipo de tumor y ayudar a determinar el pronóstico. Actualmente el sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado es el más utilizado y se basa en que el hecho de que las células y la estructura del tejido son examinadas histopatológicamente para determinar la agresividad del cáncer (Imaginis, 2012).

El método SBR modificado comprende los parámetros siguientes:

- 1. Formación de túbulos:** Se refiere al porcentaje del tumor que cuenta con estructuras tubulares. Cuando el tumor presenta túbulos entre un 75% o más se le asigna un punto, cuando los presenta entre un 10 a 75% se le asignan dos puntos y con menos del 10% se le asignan tres puntos.
- 2. Grado nuclear:** Se refiere al cambio en el tamaño y uniformidad celular. Cuando el núcleo de las células neoplásicas es relativamente pequeño, uniforme en tamaño y el patrón de cromatina tiene una escasa variación con respecto a un núcleo normal entonces se le asigna un punto. Cuando el núcleo es mayor que uno normal y cuenta con un nucleolo aparente y una cromatina con variaciones importantes en tamaño y patrón entonces se le asignan dos puntos. Cuando el núcleo tiene una variación marcada en forma, tamaño y patrón de la cromatina con dos o más nucleolos aparentes entonces se le asignan tres puntos.
- 3. Número de mitosis:** Es la tasa de división celular. Sólo se cuentan las metafases, telofases y anafases, siempre tomando en cuenta las áreas más celulares y de mayor actividad mitótica. Los puntos son asignados de acuerdo al área del campo de grana aumento utilizado para cada microscopio y siempre contando el número de mitosis por 10 campos de gran aumento.

Un tumor con una suma final de 3, 4 ó 5 es considerado como un tumor de grado 1 (bien diferenciado), una suma de 6 ó 7 es considerado como un tumor de grado 2 (moderadamente diferenciado) y una suma de 8 ó 9 es un tumor de grado 3 (pobrementemente diferenciado) (Pérez Sánchez, *et al.*, 2008; Imaginis, 2012). Los tumores de grado 1 y 2 se consideran como los de comportamiento menos agresivo y tienen mejor pronóstico. Por el contrario, los tumores de grado 3 son los de comportamiento más agresivo y tienen un peor pronóstico.

Factores de riesgo

La variable que aumenta la posibilidad de padecer una enfermedad se conoce como un factor de riesgo. Los factores de riesgo principales para el desarrollo de cáncer de mama son:

- 1. Sexo:** El 99% de los cánceres de mama se presenta en mujeres.

2. **Edad:** La incidencia aumenta progresivamente con la edad.
3. **Factores étnicos:** Determinadas etnias tiene mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer.
4. **Antecedentes previos de cáncer:** Cuando una mujer ya ha tenido cáncer en una mama, el riesgo de desarrollarlo en la otra aumenta. También se le ha relacionado con otros tipos de cáncer como ovario, endometrio y colon.
5. **Antecedentes familiares:** Las mujeres con familiares que han presentado cáncer de mama tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad en comparación con el resto de la población. Se han identificado tres tipos dependiendo del carácter de incidencia:
 - a. **Esporádico:** Es aquél que no cuenta con antecedentes en dos o más generaciones. Es el más frecuente ya que se presenta en el 75 a 85% de los casos diagnosticados.
 - b. **Familiar:** Es aquél en donde varios miembros de la familia con parentesco de primer o segundo grado (hermanas, madre, tías, abuela) sufren la enfermedad. Se presenta del 5 al 10% de los casos y se cree que se debe a factores ambientales, azarosos, sociales o factores genéticos aún no estudiados.
 - c. **Hereditario:** Es aquél donde los factores genéticos primarios son el punto más importante en la etiología del tumor. También se presenta del 5 al 10 % de los casos y, en general, es autosómico dominante (se requiere un solo alelo alterado) y con penetrancia incompleta (el fenotipo tiene una causa multifactorial y su expresión puede inhibirse por otros factores) (Sierra García, *et al.*, 2006; Narod y Rodríguez, 2011; Paradiso y Formenti, 2011; Shinagare, *et al.*, 2011; Trainer, *et al.*, 2011; van der Groep, *et al.*, 2011; Ziv, 2011; CNIO, 2012).

Defectos genéticos

El cáncer resulta de la acumulación paulatina de modificaciones en la información genética dentro de una célula que provocan su proliferación anormal y expansión clonal. Los cambios que otorgan una ventaja selectiva son mantenidos y prevalecen en la población celular cancerosa. Este proceso de cambios en la información genética se desarrolla con el

paso de los años y se ha relacionado con el proceso de tumorigénesis y la progresión tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000; Chung y Haber, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

De manera general, existen dos categorías de genes que están involucradas en la formación de cáncer:

- 1. Genes supresores de tumores:** Son los genes que tienen la función de inhibir la proliferación celular. Las mutaciones con “pérdida de función” en uno o más de estos genes contribuye al desarrollo de muchos tipos de cáncer. Se reconocen cinco clases amplias de proteínas codificadas por este tipo de genes:
 - i. Proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular.
 - ii. Receptores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular.
 - iii. Proteínas de control de puntos clave que detienen el ciclo celular si el DNA está dañado o los cromosomas son anómalos.
 - iv. Proteínas que estimulan la apoptosis.
 - v. Enzimas que participan en la reparación del DNA.
- 2. Oncogenes:** Son los genes que pueden poner en marcha una proliferación descontrolada cuando se modifica su secuencia o la regulación de su expresión es incorrecta. Las formas celulares de los oncogenes se denominan proto-oncogenes y sólo se transforman en oncogenes cuando su secuencia es alterada (Vogelstein y Kinzler, 2002; Koolman y Röhm, 2004; Chung y Haber, 2010).

La inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes afectan funciones celulares importantes como el ciclo celular, la apoptosis y la reparación del DNA para que de esta manera la célula transformada adquiera un carácter maligno. Siguiendo esta idea se ha establecido que el inicio del cáncer de mama y su transición hacia subtipos distintos es provocado por la acumulación de cambios en la función de genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, entre otros (Veeck y Esteller, 2010).

Aún cuando los estudios a nivel genético han contribuido de manera relevante en el entendimiento del desarrollo y progresión del cáncer de mama, recientemente se ha comenzado a reconocer la contribución de los procesos epigenéticos en esta área de estudio. Los mecanismos genéticos y epigenéticos no están separados en los eventos de desarrollo

del cáncer sino que están conectados; como ejemplo, los mecanismos epigenéticos pueden derivar en mutaciones genéticas mientras que las mutaciones genéticas de reguladores epigenéticos conllevan a la alteración del epigenoma (Soo You y Jones, 2012; Figura 4).

La epigenética

Definición de epigenética

Conrad Waddington introdujo el término de epigenética a inicios del año 1940 (Waddington, 1942) y la definió como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos los cuales determinan el fenotipo del ser” (Waddington, 1968). En el sentido original de su definición, la epigenética se refería a todas las vías moleculares que modulan la expresión de un genotipo en un fenotipo particular. Con el paso del tiempo y el desarrollo de la genética, el significado de la palabra se ha reducido gradualmente (Dupont, *et al.*, 2009) y actualmente es aceptada como el estudio de los cambios en la función de los genes que son mitótica y/o meióticamente heredables y que no implican un cambio en la secuencia del DNA (Wu y Morris, 2001). Las modificaciones epigenéticas descritas en la literatura generalmente comprenden las variantes de histonas, las modificaciones post-traduccionales de los aminoácidos en el extremo amino terminal de las histonas, las modificaciones covalentes en las bases del DNA y los RNAs no codificantes (ncRNAs) (Dupont, *et al.*, 2009; Kaikkonen, *et al.*, 2011).

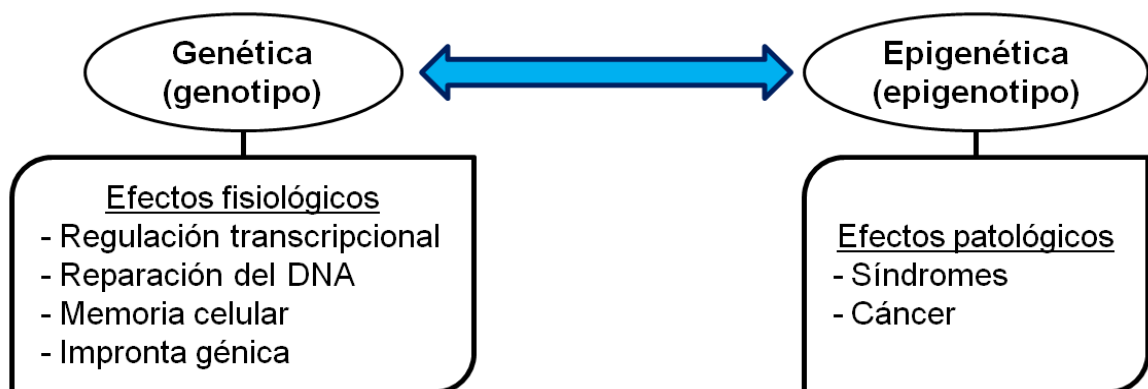


Figura 4. La genética y la epigenética solían verse como mecanismos que funcionaban de forma independiente. No obstante, se ha observado que los cambios en la información genética del epigenoma contribuyen en el desarrollo de cáncer mientras que los procesos epigenéticos pueden causar mutaciones y alterar la información y función de la información genética.

Defectos epigenéticos en cáncer

Actualmente, se ha descubierto que las modificaciones de la cromatina también participan en la regulación de la expresión génica; entre ellas destacan las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del DNA (Xiang-Quan, *et al.*, 2012).

La metilación del DNA es una modificación bioquímica que afecta primordialmente a las citocinas que forman un dinucleótido CpG (Jaenisch, 2003; Bird, 2002). En el genoma humano existen secuencias de DNA no metilado conocidas como islas CpG las cuales se caracterizan por tener una longitud de al menos 200 pares de bases (pb) con un contenido de C+G del 60% y una mayor frecuencia de CpGs (observado/esperado) de 0.6 (Illingworth, *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado que del 60 al 70% de los promotores están presentes en estas regiones (Weber, *et al.*, 2007). Entre éstos se encuentran los promotores de genes que se expresan constitutivamente y aproximadamente en el 40% de los genes que tienen una expresión tejido-específica (Illingworth, *et al.*, 2009).

La metilación del DNA se ha identificado como un marcador de riesgo, actividad y pronóstico en varias enfermedades como el cáncer (Sidransky, 2002; Issa, 2003). Se ha observado que las células cancerosas presentan una hipometilación global del DNA y una hipermetilación local de islas CpG, resultando en el silenciamiento y activación de cientos de genes entre los cuales se encuentran oncogenes y genes supresores de tumores (Jones, 2002; Herman, 2003; Issa, 2004) tales como *MGMT* y *miR125-b1*.

El gen *MGMT* se localiza en el cromosoma 10q26 y codifica una proteína encargada de la reparación de aductos en el DNA capaz de inactivarse a sí misma. La región promotora de este gen incluye una isla CpG y puede activarse mediante factores transcripcionales diferentes. La pérdida de expresión de *MGMT* ha sido reportada en varios tipos de tumores, incluyendo gliomas, linfomas, retinoblastoma, mama y próstata. Se ha propuesto que su silenciamiento se debe a la metilación de su promotor, un proceso que se ha observado *in vitro* con tumores sin actividad de *MGMT*. Con la metilación del promotor, los factores transcripcionales no pueden reconocer su sitio de unión y, por lo tanto, iniciar la síntesis del transcrito (Sharma, *et al.*, 2009).

Se han reconocido varios mecanismos que regulan el establecimiento de la metilación. Uno de ellos establece que la unión de proteínas específicas de unión a DNA metilado atrae

enzimas modificadoras de histonas que establecen un estado silenciado de la cromatina a nivel local (Issa, 2004).

Por otra parte, el gen del *mir125b-1* se localiza en el cromosoma 11q24.1 y sus funciones principales son la regulación de genes involucrados en la apoptosis, el ciclo celular y la proliferación (Le, *et al.*, 2009; Bueno, *et al.*, 2011). A diferencia de otros miRNAs, el *miR125b-1* muestra niveles altos de expresión en diferentes tipos de tejidos aunque recientemente se ha demostrado que los niveles de expresión del *miR125b-1* disminuyen o aumentan en diferentes tipos de cáncer (Shell, *et al.*, 2007; Liang, *et al.*, 2010; Guan, *et al.*, 2011; Hannafon, *et al.*, 2011; Huang, *et al.*, 2011; Liu, *et al.*, 2011, Soto-Reyes; *et al.*, 2012). Se ha descrito que el *miR125b-1* tiene como blancos a genes supresores de tumores y oncogenes; en el caso particular del cáncer de mama se ha asociado con una actividad de gen supresor de tumores (Zhang, *et al.*, 2011). No obstante, aún debe seguirse estudiando la regulación de este miRNA y sus posibles blancos.

El gen supresor de tumores *TP53* codifica la proteína p53 y es considerado uno de los genes más importantes dentro del desarrollo de cáncer. Dependiendo del contexto celular y del tipo de estrés al que esté sometida la célula, p53 permite la apoptosis, la reparación del DNA, el arresto celular transitorio o permanente, entre otros. La activación e inactivación de *TP53* depende de un conjunto de modificaciones post-traduccionales e interacciones con otro tipo de proteínas (Walerych, *et al.*, 2012). Diferentes estudios han validado que la expresión de *TP53* está regulada por la unión directa de varios factores de transcripción, entre ellos se encuentra la proteína CTCF. Recientemente se ha descubierto que CTCF se une al promotor de este gen río abajo de la isla CpG y, experimentalmente, se ha demostrado que la unión de CTCF a esta región influye en la transcripción del gen. Varios grupos de investigación han propuesto que CTCF no es un factor de transcripción clásico sino que también puede actuar como una barrera en contra del silenciamiento (Saldaña-Meyer y Recillas-Targa, 2011).

CTCF

El gen CTCF

El gen *CTCF* se localiza en el cromosoma 16q22.1 y contiene tres dominios, una región amino, una carboxilo y un dominio de unión a DNA con 11 dedos de zinc (Nikolaev, *et al.*, 2009). *CTCF* está evolutivamente conservado desde *Drosophila* hasta humanos y cerca del 85% de los residuos de aminoácidos son idénticos entre humano, conejo, pollo y rana. El porcentaje de identidad se eleva hasta el 100% en la región que contiene a los dedos de zinc (Hore, 2008; Nikolaev, *et al.*, 2009).

A pesar de que se conoce la función de regulación génica que ejerce la proteína CTCF, sorprendentemente se sabe muy poco sobre cómo se regula el gen de *CTCF per se*. Hasta ahora sólo se sabe que el promotor de *CTCF* contiene una isla CpG, no cuenta con una caja TATA, tiene un sitio de unión altamente conservado para el factor de transcripción YY1 y sitios potenciales de unión para *GATA-1* y *p53* (Klenova, *et al.*, 1998; Pugacheva, *et al.*, 2006). Dentro del promotor de *CTCF* en pollo se han encontrado varios elementos característicos de genes regulados por el ciclo celular (Klenova, *et al.*, 1998). No obstante, la función de *CTCF* no ha sido bien establecida.

La proteína CTCF

CTCF (también conocido como factor de unión CCCTC) es una proteína localizada principalmente en el núcleo celular, descubierta porque reconocía específicamente tres repeticiones regularmente espaciadas de la secuencia CCCTC situadas aproximadamente a 200 pares de bases (bp) río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *c-myc* en pollo (Lobanenkov, *et al.*, 1990; Ohlsson, *et al.*, 2001).

En primera instancia, CTCF fue descrito originalmente como un “factor multivalente” ya que era capaz de unirse a un rango amplio de secuencias diferentes y, al mismo tiempo, reclutar proteínas reguladoras específicas a través del uso de combinatorias diferentes de sus dedos de zinc. Esta característica sugería la versatilidad de CTCF en la regulación del genoma ya que se une a un promedio de 55,000 sitios génicos de 19 líneas celulares, las

cuales incluyen siete líneas inmortalizadas y 12 normales (Wang, *et al.*, 2012; Figura 5). Posteriormente, otras líneas de investigación dieron a conocer la importancia de esta proteína en otro tipo de procesos celulares, como el caso de ratones con CTCF truncado que mostraron una letalidad embrionaria temprana después de la implantación (Splinter, *et al.*, 2006; Heath, *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha comprobado que los niveles de expresión del gen y los patrones de distribución nuclear de CTCF varían en células de tejido específico, indicando un papel importante en el mantenimiento de la diversidad fenotípica y los patrones de expresión génica de los tejidos (Phillips y Corces, 2009).

Se considera que CTCF no es un factor de transcripción clásico debido a que tiene más de una función en la regulación génica; éstas incluyen la activación/represión de promotores, la formación de interacciones cromatínicas de largo alcance, el bloqueo de *enhancers* y actuar como *insulator* (Phillips y Corces, 2009; Figura 6). Un *enhancer* es una secuencia de DNA a la cual se unen proteínas específicas para estimular la iniciación de la transcripción. Puede localizarse a una distancia considerable del gen ya sea río arriba o río abajo de la misma (*cis*) u otra (*trans*) cadena de DNA. (Passarge, 2007). Por su parte, un *insulator* se ha definido como una secuencia a lo largo del DNA que recluta proteínas particulares con el propósito de evitar que los *enhancers* activen o silencien genes. Esta definición fue extendida para incluir a elementos en la secuencia que impiden la segregación inapropiada de la heterocromatina (por lo que también son llamados “elementos de barrera”) (Tollesfbol, 2011).

El gen improntado más estudiado es el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*Igf2*) cuya expresión es alelo-específica y solamente se da en el alelo derivado del padre (DeChiara, *et al.*, 1991; Ogawa, *et al.*, 1993; Rainier, *et al.*, 1993; Dindot, *et al.*, 2004). Localizado río abajo de *Igf2* está el gen *H19*, el cual se expresa solamente en el cromosoma derivado de la madre (Bartolomei, *et al.*, 1991; Rachmilewitz, *et al.*, 1992). La expresión improntada de *Igf2/H19* depende de la región de control de impronta (ICR) y un *insulator* localizado entre estos dos genes (Hore, 2008). El ICR es metilado durante la espermatogénesis, específicamente marcando el cromosoma derivado del padre (Tremblay, *et al.*, 1997). La proteína CTCF, que tiene función tipo *insulator*, se une al ICR pero sólo en el cromosoma derivado de la madre, el cual no está metilado (Hore, 2008). Cuando se une al ICR derivado de la madre, CTCF realiza varias funciones que incluyen impedir la metilación del ICR (Schoenherr, *et al.*, 2003; Pant, *et al.*, 2003; Engel, *et al.*, 2006), bloquear el acceso de *Igf2* a un *enhancer* río abajo (lo cual

resulta en el silenciamiento de *Igf2* en *cis* (Hark, *et al.*, 2000; Bell y Felsenfeld, 2000) y la activación simultánea de la expresión de *H19* (Engel, *et al.*, 2006; Figura 7).

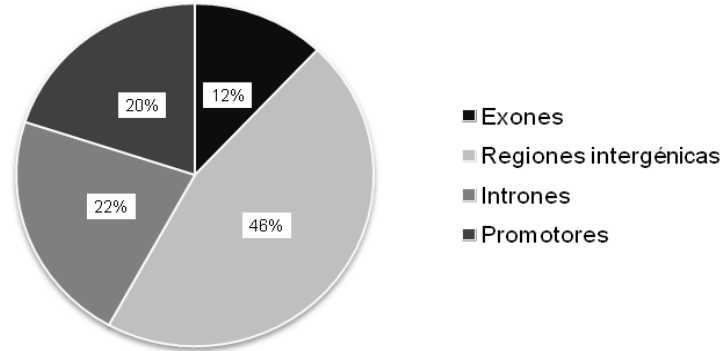


Figura 5. Gráfico circular que muestra los sitios de unión de la proteína CTCF en la línea celular IMR-90 (fibroblastos primarios humanos). Casi la mitad (46%) de los sitios de unión a CTCF se encuentran en regiones intergénicas lo cual concuerda con su papel como *insulator*. Sólo alrededor del 20% son sitios dentro de las 2 Kilobases (Kb) de los sitios de inicio de la transcripción. Inesperadamente, un número significativo de sitios de unión a CTCF caen dentro de los genes, con 22% en los intrones y 12% en los exones (modificado de Hoon Kim, *et al.*, 2007).

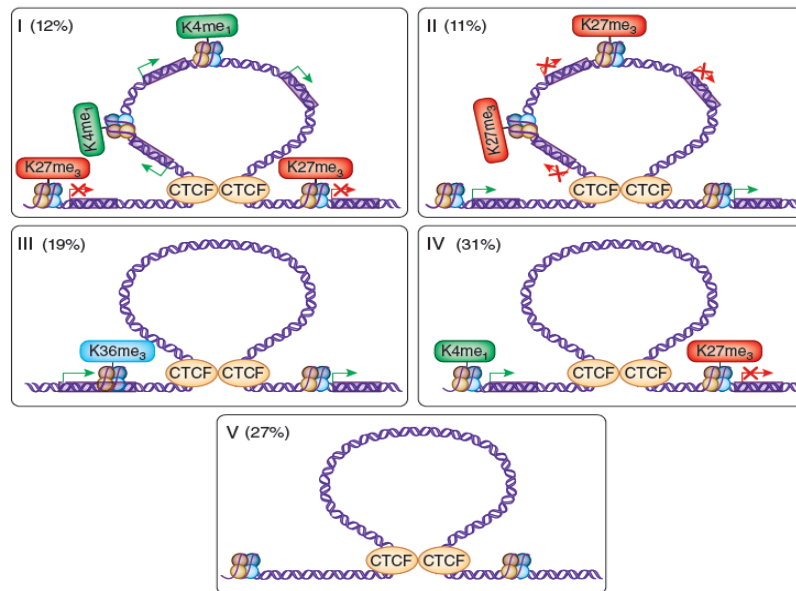


Figura 6. Dominios cromatínicos establecidos por CTCF. (I) El 12% de las asas de cromatina mediadas por CTCF contienen genes transcripcionalmente activos y marcas activadoras (verde) en la parte interna del asa y marcas represivas en la parte externa. **(II)** El 11% de las asas contienen genes transcripcionalmente inactivos y marcas represivas en la parte interna del asa y genes activos en la parte externa. **(III)** El 19% de las asas contienen marcas relacionadas con a elongación de la cadena del DNA en un extremo externo del asa. **(IV)** El 31% de las asas contienen genes transcripcionalmente activos y marcas activadoras en un extremo externo del asa y marcas represivas en el otro. **(V)** El 27% de las asas no poseen expresión génica o modificaciones de histonas particulares (tomado de Espinoza, 2011).

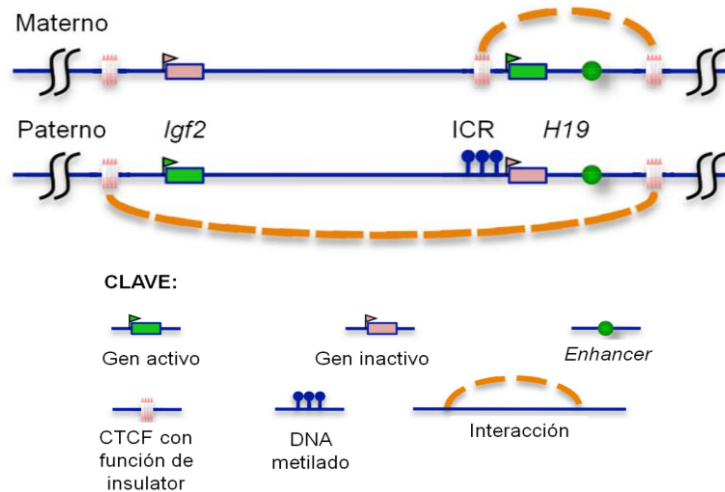


Figura 7. Funcionamiento del locus *Igf2/H19*. La regulación de la expresión de esta pareja de genes ocurre con la metilación diferencial del ICR. CTCF actúa como *insulador* al situarse entre ambos genes y es responsable de limitar la actividad del *enhancer* localizado río abajo. En el alelo materno, el ICR no está metilado y CTCF se acopla al mismo para que el *enhancer* actúe sobre el gen más próximo a él, en este caso *H19*. En el alelo paterno, CTCF no se puede unir al ICR debido a que se encuentra metilado por lo que el *enhancer* es capaz de actuar sobre *Igf2* permitiendo su expresión (modificado de Herold, *et al.*, 2012).

CTCF en cáncer

La localización de *CTCF* dentro de una región que sufre deleciones en cáncer de mama y próstata hizo surgir la hipótesis de que *CTCF* podría ser un candidato a gen supresor de tumores (Filippova *et al.*, 1998). La hipótesis fue respaldada por el hallazgo de un reordenamiento de los exones de *CTCF* en tumores y por varias mutaciones relacionadas con interferir con la unión de la proteína en cáncer (Filippova, *et al.*, 1998 y 2002). No obstante, un estudio de los niveles de RNA mensajero (mRNA) de *CTCF* en carcinomas mamarios no reveló una pérdida significativa asociada al tumor o una disminución en la expresión (Rakha, *et al.*, 2004). Asimismo, el nivel de *CTCF* se encontró elevado en tumores y líneas celulares de cáncer de mama en comparación con células normales sugiriendo que *CTCF* no es un gen supresor de tumor, aunque se planteó la hipótesis de que la regulación de *CTCF* podría estar relacionada con resistencia a la apoptosis (Docquier, *et al.*, 2005). Esto se justificó mediante la demostración de que la sobre-expresión de *CTCF* protege parcialmente a las células de la apoptosis mientras que la falta de *CTCF* derivó en la muerte celular por apoptosis (Docquier, *et al.*, 2005).

Los experimentos anteriores sugieren que CTCF se comporta más como un regulador de otros genes asociados con la tumorigénesis que como un gen supresor de tumores clásico lo cual concuerda con la observación de que los blancos génicos de CTCF incluyen diversos genes con funciones reguladoras (Nikolaev, *et al.*, 2009; Recillas-Targa, *et al.*, 2006; 2011).

Como ya se había mencionado, CTCF evita el silenciamiento de regiones promotoras y otros elementos reguladores al evitar la propagación de la metilación en las islas CpG (Schatten, 2008). Evidencia reciente sugiere que la metilación aberrante del DNA podría iniciarse lejos de las regiones promotoras en los llamados “centros de metilación” que frecuentemente corresponden a secuencias repetidas (Issa, 2004). Dado que CTCF está encargado de regular a un gran número de genes que, curiosamente, están silenciados en tumores, se ha propuesto que la desregulación de CTCF podría llevar al silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores y contribuir a la tumorigénesis. CTCF no actuaría solamente en contra de la metilación del DNA sino también en otras modificaciones epigenéticas relacionados con silenciamiento génico como la modificación post-traducciona de histonas (Schatten, 2008).

BORIS

El gen *CTCF-L*

CTCF-L (*CTCF-Like*) es un gen parálogo de *CTCF* (D'Arcy, 2008) ya que presentó una duplicación génica. El dominio de dedos de zinc de *CTCF-L* tiene un porcentaje de identidad de 80.4% comparado con el de *CTCF* mientras que los dominios amino (N-) y carboxilo (C-) terminal tienen un porcentaje menor del 35% (Martin-Kleiner, 2011). En testículo se ha observado que *CTCF* y *CTCF-L* se expresan de una manera mutuamente exclusiva, lo cual hace pensar que se correlaciona con el restablecimiento de marcas de metilación durante la diferenciación de la línea germinal masculina (Klenova, *et al.*, 2002; Loukinov, *et al.*, 2002; Martin-Kleiner, 2011).

Se localiza en el cromosoma 20q13.2 y su transcripción está regulada por tres promotores alternativos conocidos como A, B y C, los cuales tienen sitios de unión para diversos factores de transcripción (Klenova, *et al.*, 2002; Renaud, *et al.*, 2007). Sin embargo, la regulación de dichos promotores aún no está bien estudiada hasta la fecha.

La proteína BORIS

CTCF-L codifica a la proteína conocida como *Brother of the Regulator of the Imprinted Sites* (BORIS). BORIS tiene 23 isoformas las cuales se constituyen por extremos N- y C- alternativos combinados con un número variable de dedos de zinc en el dominio de unión al DNA y su abundancia varía entre células germinales y tumorales (Pugacheva, *et al.*, 2010).

En un inicio se sugería que BORIS se expresaba únicamente en espermatozoides primarios durante el desarrollo de la línea germinal masculina debido a que esta proteína es reemplazada progresivamente por *CTCF*, lo cual se correlaciona con el establecimiento de los patrones específicos de metilación (Klenova, 2002; Loukinov, *et al.*, 2002). No obstante, se ha comparado la localización de *CTCF* y BORIS en el núcleo de otras líneas celulares y se demostró que BORIS está enriquecido en el nucleolo. Además, los niveles de transcripción de BORIS son bajos comparados con los de *CTCF* mientras que sus niveles de proteína son

fácilmente detectables demostrando que BORIS tiene mayor presencia de la que se pensaba y podría tener una función nucleolar (Jones, *et al.*, 2011).

Se ha descubierto que CTCF y BORIS desempeñan un papel funcional diferente en la regulación de los genes improntados *Igf2/H19* (Nguyen, *et al.*, 2008; Figura 7). En un inicio se pensaba que CTCF organizaba estos eventos a través de la formación de asas de cromatina en el cromosoma materno (Kurukuti, *et al.*, 2006) y el establecimiento de modificaciones locales de la cromatina (Han, *et al.*, 2008). Sin embargo, se descubrió que BORIS también es esencial para el establecimiento de la metilación diferenciada en el ICR (Loukinov, *et al.*, 2002; Jelinic, *et al.*, 2006). BORIS se une al ICR de *Igf2/H19* a través de su dominio común de dedos de zinc al momento que esta región es metilada por las metiltransferasas *de novo* DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L (Kaneda, *et al.*, 2004; Bourc'his y Bestor, 2004; Kato, *et al.*, 2007; Hore, 2008). De esta manera, tanto BORIS como CTCF son capaces de unirse al ICR de *Igf2/H19* aunque actúan de manera diferencial en este sitio mediado por metilación del DNA. Mientras BORIS establece las marcas diferenciadas de metilación en el ICR durante la gametogénesis, CTCF evita que se establezcan dichas marcas (Hore, 2008; Figura 8).

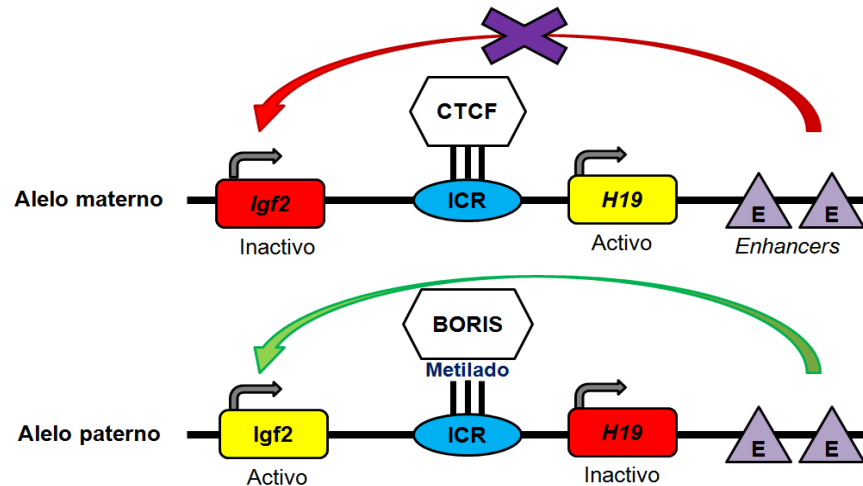


Figura 8. CTCF y BORIS regulan el funcionamiento del locus *Igf2/H19*. BORIS y CTCF se unen al ICR a través de su dominio común de dedos de zinc aunque actúan de manera diferencial. Mientras BORIS se une al ICR de *Igf2/H19* al momento que esta región es metilada, CTCF evita que se establezcan dichas marcas. Estas interacciones derivan en la expresión diferencial de *Igf2/H19*.

También se ha descubierto que CTCF y BORIS se asocian de manera diferencial con otro tipo de proteínas esenciales para cambiar la estructura del DNA, la modificación de su actividad específica y la regulación de la cromatina (Necochea-Champion, *et al.*, 2011; Figura

9). Otros estudios han demostrado que BORIS tiene un papel en la regulación del ciclo celular en células de alto recambio, como la epidermis (Rosa-Garrido, *et al.*, 2012).

Debido a que BORIS está implicado en el inicio de la serie de eventos de metilación diferencial se ha considerado que puede ser importante para el desarrollo de cáncer (Jelinic, *et al.*, 2006; Jelinic y Shaw, 2007) pues ha sido detectado en varios tumores y líneas celulares cancerosas (Klenova, *et al.*, 2002; Loukinov, *et al.*, 2002; Hoffmann, *et al.*, 2006; Risinger, *et al.*, 2007;).

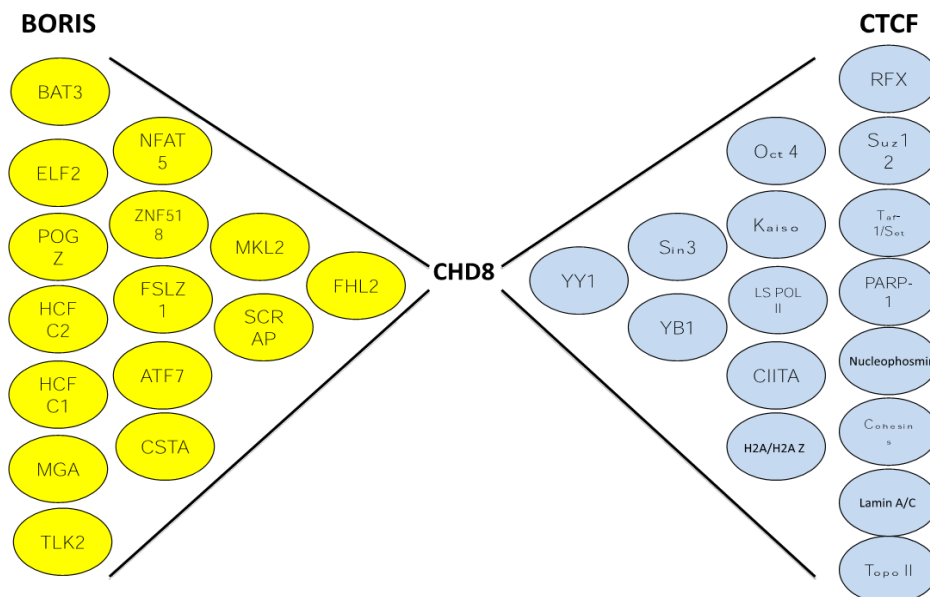


Figura 9. Proteínas que interactúan con BORIS (amarillo) y CTCF (azul). Hasta ahora se sabe que sólo CHD8 es capaz de interactuar con ambas proteínas (van de Nobelen, *et al.*, 2010). Las proteínas que se asocian con BORIS fueron identificadas mediante sistema de doble híbrido en levadura utilizando el extremo N- terminal como cebo (Nguyen, *et al.*, 2008) Las proteínas que interactúan con CTCF son importantes para el cambio de la estructura del DNA y la regulación de la cromatina (Ohlsson, *et al.*, 2010; tomado de Necochea-Champion, *et al.*, 2011).

BORIS en cáncer

Ha existido cierta controversia sobre el papel de BORIS en cáncer. Se ha sugerido que BORIS es capaz de desplazar a CTCF para ocupar sus sitios de unión y permitir la proliferación de células cancerosas (Loukinov, *et al.*, 2002). Algunos estudios apoyan esta hipótesis debido a que se ha visto que BORIS se une a los promotores y fomenta la expresión de ciertos genes que provocan cáncer de testículo (Vatolin, *et al.*, 2005; Hong, *et al.*, 2005). Curiosamente, un estudio informó que el silenciamiento de la expresión de *CTCF-L* en una

línea celular de cáncer de mama tenía un efecto en la apoptosis de dichas células (Dougherty, *et al.*, 2008) mientras que otro publicó que BORIS no se encontraba en tumores y en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama, sugiriendo que era poco probable que jugara un papel importante en el desarrollo de cáncer (Hines, *et al.*, 2010). Por lo tanto, el tema sigue en boga.

No obstante, la detección de BORIS en diferentes tipos de cáncer comenzó a documentarse. La sobre-expresión de *CTCF-L* se correlacionó con la hipometilación de su promotor en pacientes con cáncer de testículo, próstata y tejidos epiteliales de ovario (Hoffmann, *et al.*, 2006, Woloszynska-Read, *et al.*, 2007; Kosaka-Suzuki, *et al.*, 2011) mientras que su desmetilación parcial se detectó en cáncer de ovario, colon, pulmón y líneas celulares de leucemia (Hong, *et al.*, 2005; Renaud *et al.*, 2007).

De manera particular, se han realizado más estudios referentes a la expresión de *CTFC-L* en cáncer de mama. BORIS se ha detectado en tejido tumoral y leucocitos aislados de la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. En este estudio se observaron mayores niveles de mRNA y la abundancia de la proteína se correlacionó con el tamaño del tumor (D'Arcy, *et al.*, 2006; 2008). También se encontró que la proteína se presentaba en el núcleo y citoplasma de ciertas líneas celulares de cáncer de mama e, interesantemente, activaba los promotores de los genes propios de los receptores de estrógeno y progesterona (D'Arcy, *et al.*, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es una de las enfermedades que más afecta a las mujeres a nivel mundial ya que tiene el primer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad (GLOBOCAN, 2008; Chávarri-Guerra, *et al.*, 2012). El inicio y la progresión de esta enfermedad se han asociado con factores ambientales y genéticos. Cabe destacar que la epigenética también se ha establecido como un elemento que desempeña un papel importante en el desarrollo del cáncer gracias a los estudios que demuestran los cambios en los patrones de expresión génica sin que se presenten alteraciones en la secuencia del DNA.

CTCF es una proteína capaz de unirse a un promedio de 55,000 sitios dentro de la secuencia de DNA y reclutar proteínas reguladoras específicas a través de un dominio de unión al DNA compuesto por 11 dedos de zinc. Una de sus funciones es controlar la activación/represión de promotores, razón por la cual se ha propuesto que su desregulación podría llevar al silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores y contribuir al desarrollo del cáncer. Butcher y Rodenhiser determinaron la metilación y la pérdida de expresión de *BRCA1*, el aumento de expresión de *DNMT3b* y la localización citoplásmica de CTCF en tumores mamarios. Sugirieron que la desregulación de CTCF y DNMT3b podría haber provocado la metilación de *BRCA1* y dar a las células un papel tumorigénico (Butcher y Rodenhiser, 2007).

De manera interesante, el gen parálogo de *CTCF* codifica una proteína conocida como BORIS y una de sus funciones es el establecimiento de marcas diferenciadas de metilación. CTCF y BORIS pueden unirse a la misma secuencia de DNA gracias a que comparten el dominio de 11 dedos de zinc. Por lo tanto, se ha propuesto que BORIS podría ser capaz de ocupar sitios de unión propios de CTCF y establecer patrones aberrantes de metilación que deriven en un silenciamiento epigenético de genes reguladores de la proliferación y muerte celular.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* así como la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS se encontrará desregulada en líneas celulares de cáncer de mama en comparación con una línea celular normal.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión y la presencia de los genes que codifican a las proteínas CTCF y BORIS en un modelo de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los niveles de expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* en líneas celulares normales y cancerosas de mama.
2. Estudiar la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS en líneas celulares normales y cancerosas de mama.
3. Determinar la unión de CTCF y BORIS en los promotores de los genes *mir125b-1* y *p53* en líneas celulares cancerosas de mama.
4. Caracterizar la presencia y la localización de CTCF y BORIS en muestras de pacientes con cáncer de mama.

RESULTADOS

Evaluación de los niveles de expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* en líneas celulares normales y cancerosas de mama

Se realizó un PCR punto final en dos líneas celulares cancerosas (MDA-MB-231 y MCF-7) y se comparó con una línea celular normal (MCF-10A). En primera instancia, se analizaron los niveles de expresión de *CTCF* en las tres líneas celulares utilizando *actina* como gen de expresión constitutiva y agua estéril como control negativo. Los resultados mostraron que *CTCF* aumentó su expresión en las líneas celulares cancerosas en comparación con la línea normal (Figura 10A).

Asimismo se evaluaron los niveles de expresión de *CTCF-L* en las mismas líneas con los mismos controles. Los resultados revelaron que *CTCF-L* también aumentó su expresión en las líneas celulares cancerosas. En la línea normal no se observó la expresión de este gen (Figura 10B).

Estudio de la presencia y la localización de las proteínas *CTCF* y *BORIS* en líneas celulares normales y cancerosas de mama

Se realizaron inmunofluorescencias para *CTCF* y *BORIS* en las tres líneas celulares. Los resultados que *CTCF* se localiza en puntos específicos del núcleo de las líneas MCF-7 y MCF-10A. En MDA-MB-231, la proteína parece encontrarse difusa dentro del núcleo ya que no se apreció una localización focalizada (Figura 11).

BORIS se presentó principalmente en nucleolo sin predominar en núcleo en las líneas MDA-MB-231 y MCF-10A. De manera interesante, en MCF-7 se observó la ausencia de *BORIS* en el nucleolo localizándose únicamente en el núcleo (Figura 12A).

Debido a que los anticuerpos para *CTCF* y *BORIS* estaban hechos en conejo no fue posible realizar una inmunofluorescencia doble. Por lo tanto, para comprobar que *BORIS* se encontraba en el núcleo y determinar si co-localizaba con *CTCF* de las células MCF-7 se realizó una transfección de *CTCF-GFP* y una inmunofluorescencia para *BORIS*. Los

resultados de este experimento demostraron que BORIS co-localizaba de manera parcial con CTCF a nivel nuclear (Figura 12B).

Determinación de la unión de CTCF y BORIS en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53* en una línea de cáncer mamario

Con el objetivo de comprobar si BORIS pudiera estar ocupando sitios propios de CTCF en el DNA en la línea MCF-7 se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Este estudio se enfocó en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53*, los cuales son conocidos por ser genes regulados por CTCF. De manera interesante, los resultados mostraron que BORIS se unió a la región promotora de *miR125b-1* y la presencia de la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), una marca de silenciamiento que se observa en regiones con DNA metilado. Mientras que CTCF continuó unido a la región de *p53* sin observar enriquecimiento de BORIS y H3K9me3 (Figura 13).

Desregulación de CTCF y BORIS en una línea celular de cáncer colorrectal

Para comprobar si la desregulación de CTCF y BORIS pudiera presentarse en otro modelo celular canceroso, se utilizó la línea celular de cáncer colorrectal HCT-116. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias para determinar la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS en esta línea celular. Se demostró que ambas proteínas se localizaron principalmente en núcleo (Figura 14), fenómeno observado en la línea de cáncer mamario MCF-7 (Figuras 12A y 12B).

Con el objetivo de comprobar la unión *in vivo* de CTCF y BORIS en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53* se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Los resultados mostraron que BORIS se encontró unido a la región de *miR125b-1* mientras que CTCF permaneció unido a la región de *p53* (Figura 15A). Estos resultados fueron corroborados por PCR en tiempo real. Datos previos han demostrado que CTCF se une al promotor del *miR125b-1*, el cual no se encuentra metilado, en células no tumorales. En la región promotora de *miR125b-1* se presentó el enriquecimiento de BORIS mientras que la

región de *p53* presentó la unión a CTCF (Figura 15B). Cabe destacar que este fenómeno también fue observado en la línea MCF-7 (Figura 14).

Caracterización de la presencia y la localización de CTCF y BORIS en muestras de pacientes con cáncer de mama

Se realizaron inmunohistoquímicas de cortes histológicos de pacientes con cáncer de mama. En las inmunohistoquímicas de tejido mamario normal se observó que CTCF predominó en núcleo. BORIS presentó la misma localización pero su presencia fue menor en comparación con CTCF. En las muestras de tejido canceroso se observó que la presencia de CTCF se encuentra disminuida en los pacientes con un grado histológico de cáncer más agresivo (SBR9) en comparación con los pacientes con un grado menos agresivo (SBR7 y SBR8). En el caso de BORIS se advirtió la pérdida de su localización nuclear para enriquecerse en el citoplasma (Figura 16).

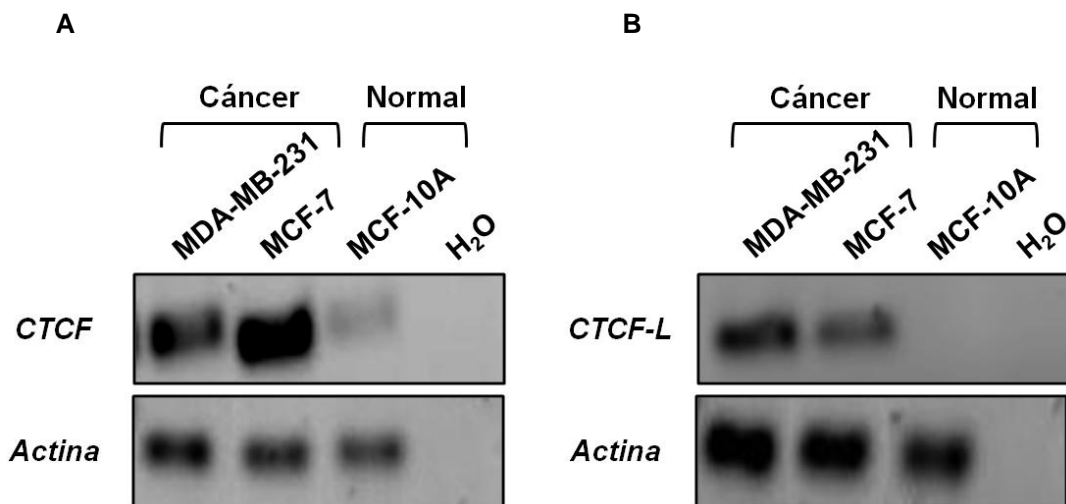


Figura 10. Evaluación de los niveles de expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* en líneas celulares normales y cancerosas de mama por medio de RT-PCR. A. Determinación del nivel de expresión de *CTCF*. Se observó un aumento de expresión en las líneas celulares cancerosas en comparación con la línea normal. **B.** Evaluación del nivel de expresión del gen *CTCF-L*. También se registró un aumento de expresión en las líneas celulares cancerosas. En MCF-10A no se registró la expresión de este gen.

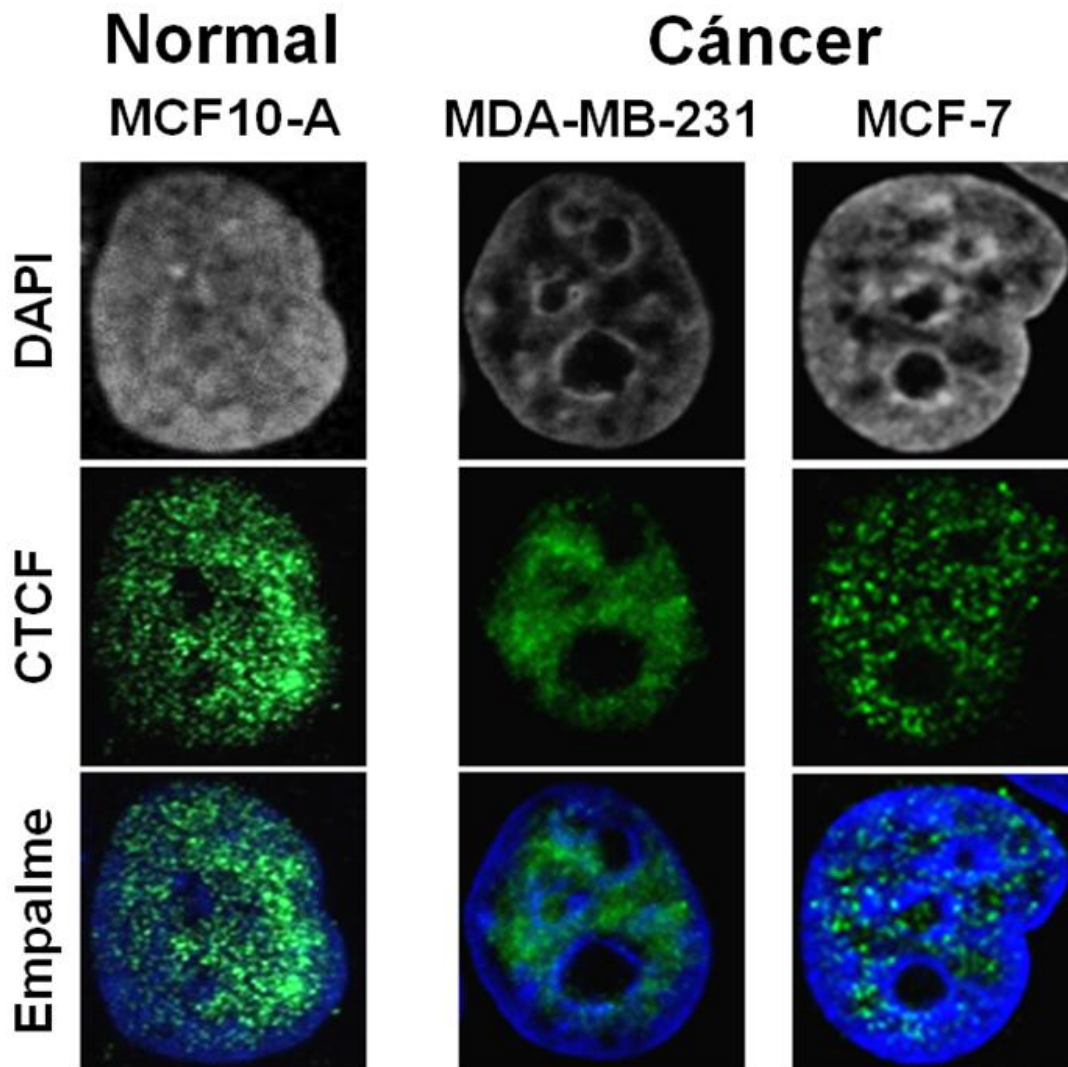
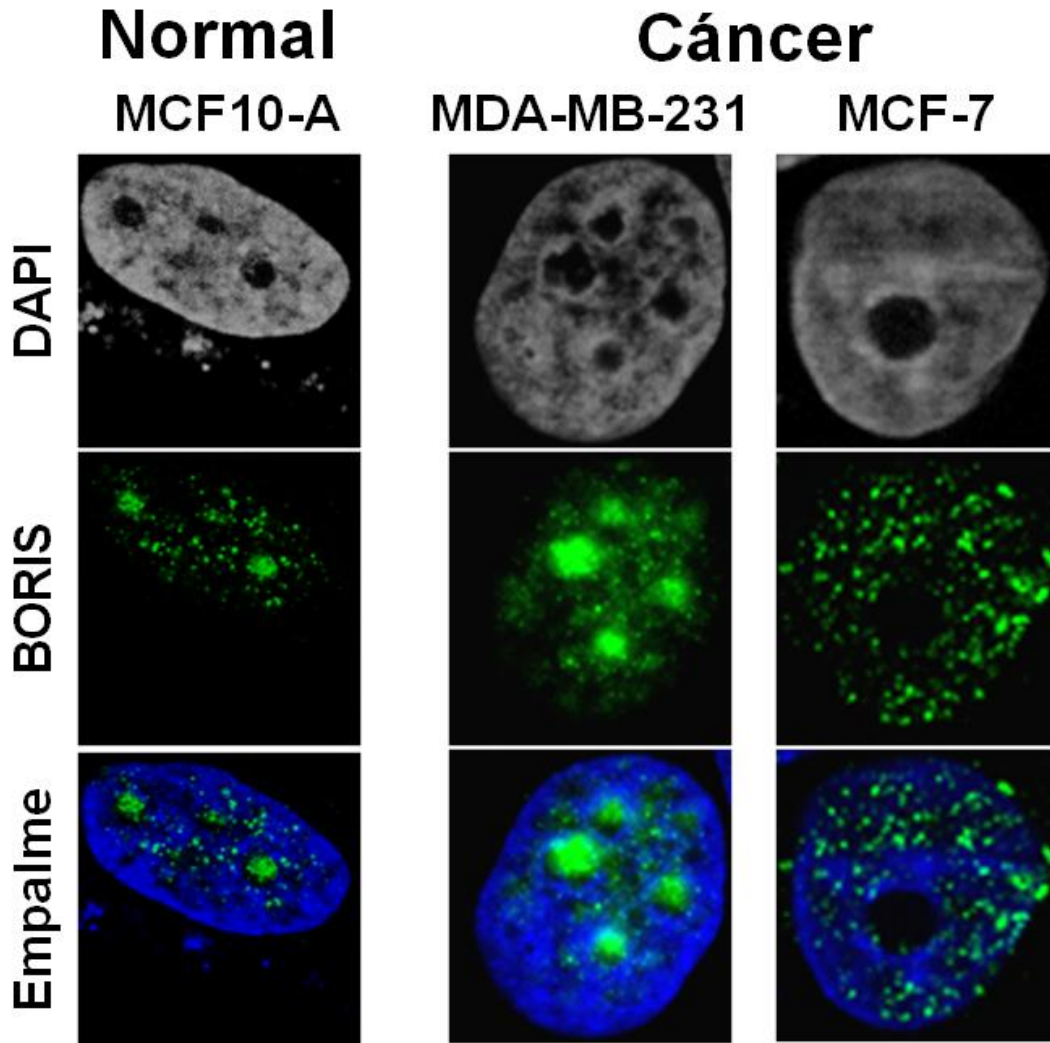


Figura 11. Estudio de la presencia y la localización de la proteína CTCF en el núcleo de células mamarias normales y cancerosas por medio de inmunofluorescencias. Imágenes por microscopio confocal en las cuales la proteína CTCF se localizó en puntos específicos del núcleo de las líneas MCF-7 y MCF-10A. En MDA-MB-23, al parecer, la proteína se encuentra difusa dentro del núcleo ya que no se apreció una localización focalizada (1,000 aumentos).

A



B

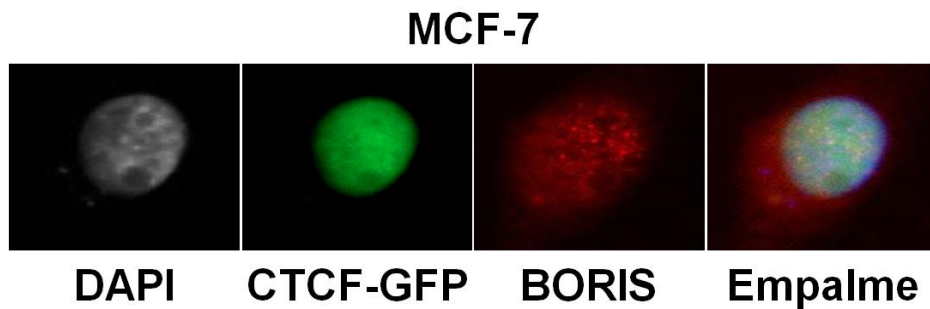


Figura 12. Estudio de la presencia y la localización de la proteína BORIS en el núcleo de líneas celulares normales y cancerosas de mama por medio de inmunofluorescencias. A. BORIS se presentó principalmente en nucleolo sin predominar en núcleo en las líneas MDA-MB-231 y MCF-10A. En MCF-7 BORIS se presentó únicamente en el núcleo (1,000 aumentos). **B.** Transfección de CTCF-GFP con una inmunofluorescencia para BORIS. Se comprobó que BORIS compartió una localización nuclear con CTCF (400 aumentos).

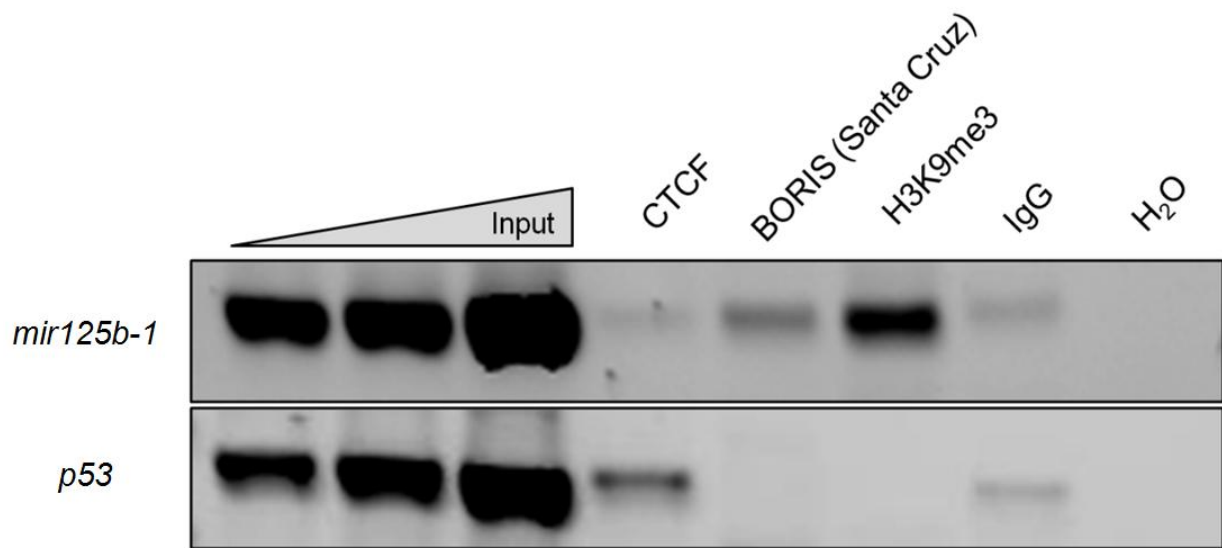


Figura 13. Unión *in vivo* de CTCF y BORIS en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53* en la línea de cáncer de mama MCF-7. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) donde se determinó que BORIS se une a la región de *miR125b-1*. La modificación post-traducciona asociada con silenciamiento (H3K9me3) se encontró enriquecida en la misma región. CTCF se observó unido a la región de *p53* sin que se presentara la marca H3K9me3.

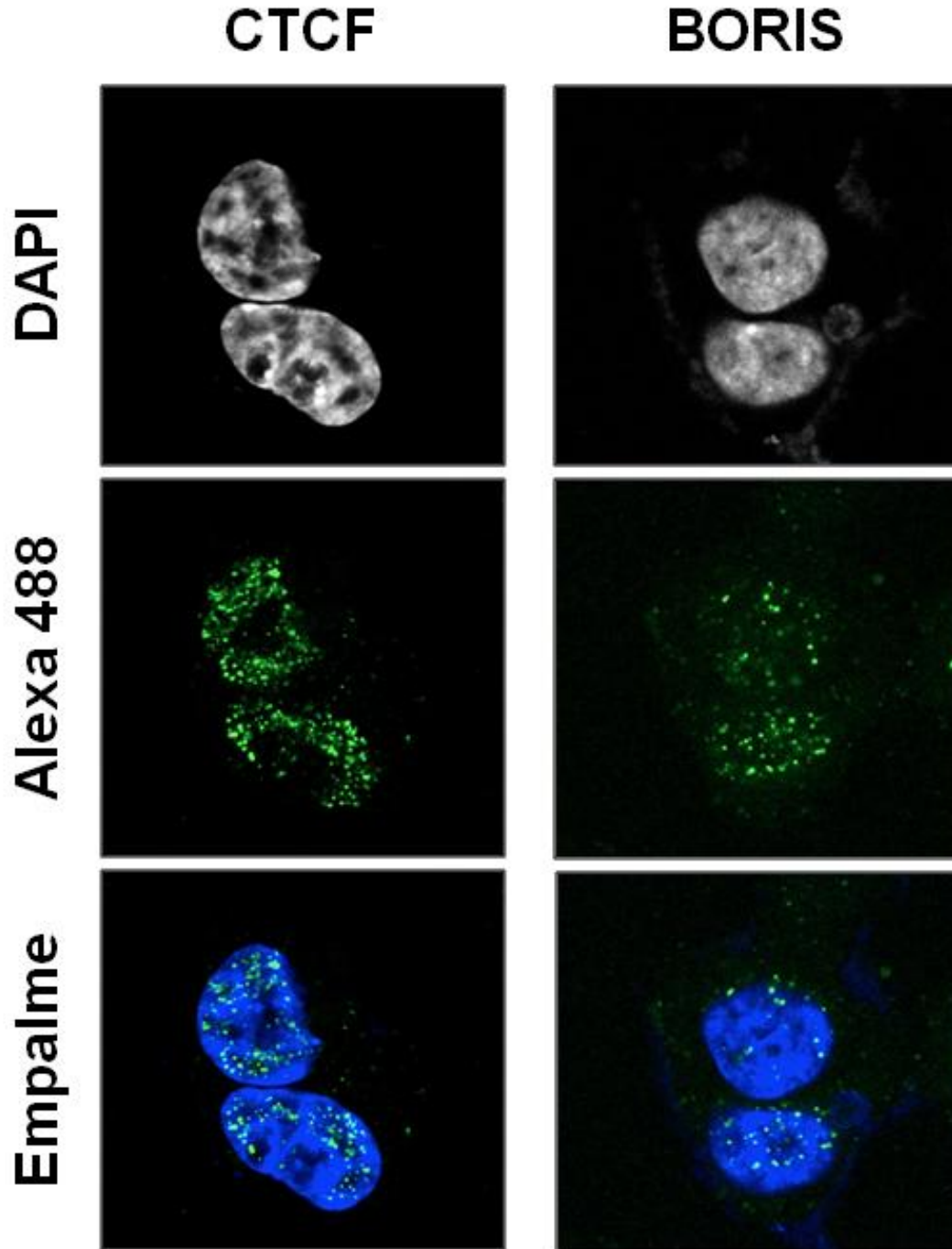
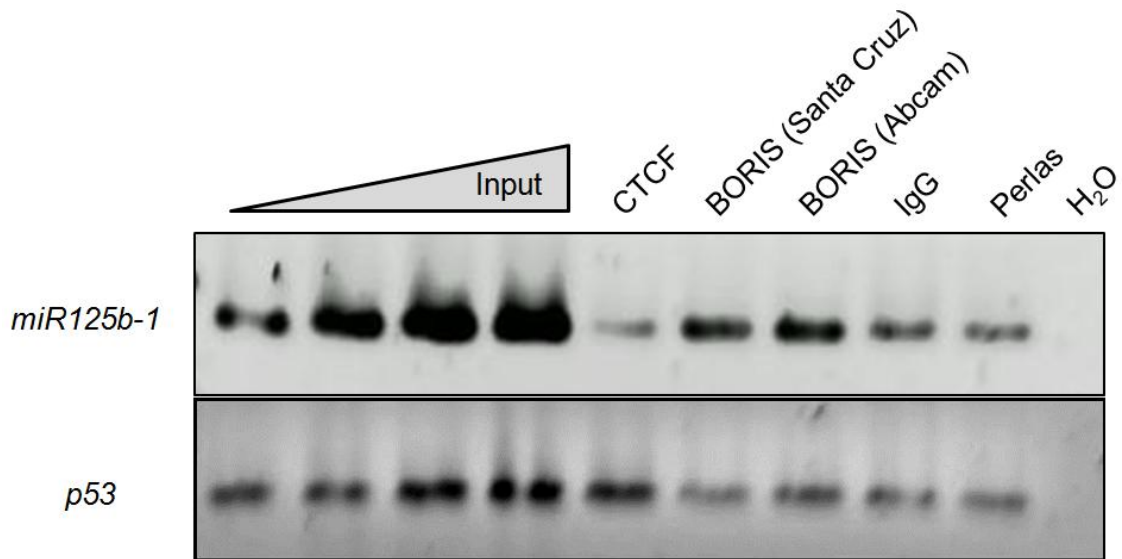


Figura 14. Estudio de la presencia y la localización de las proteínas CTCF y BORIS en el núcleo de la línea de cáncer colorrectal HCT-116 por medio de inmunofluorescencias. Tanto CTCF como BORIS se localizaron principalmente en núcleo, fenómeno que también se observó en la línea de cáncer mamario MCF-7 (Figuras 12A y B).

A



B

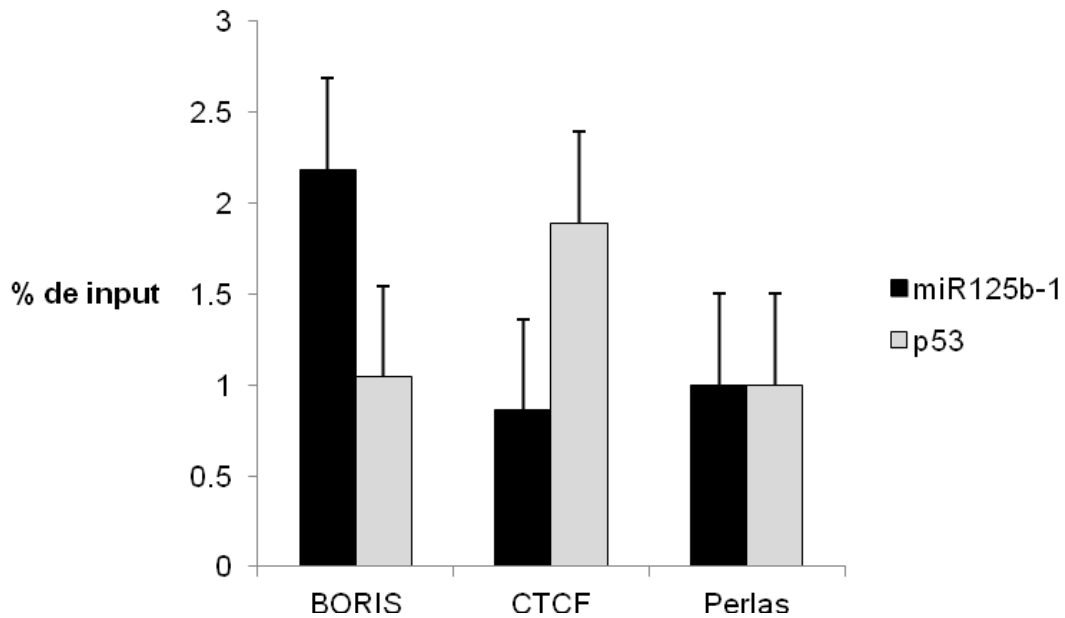


Figura 15. Unión de CTCF y BORIS en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53* en la línea de cáncer colorrectal HCT-116. A. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) donde se comprobó que BORIS se encontró unido a la región de *miR125b-1*. CTCF se enriqueció en la región de *p53*. **B.** PCR en tiempo real (q-PCR) de la región promotora de *miR125b-1* la cual se encontró enriquecida en la cromatina unida a BORIS. La región de *p53* predominó en la cromatina ligada a CTCF. Este fenómeno también se observó en la línea MCF-7 (Figura A y B).

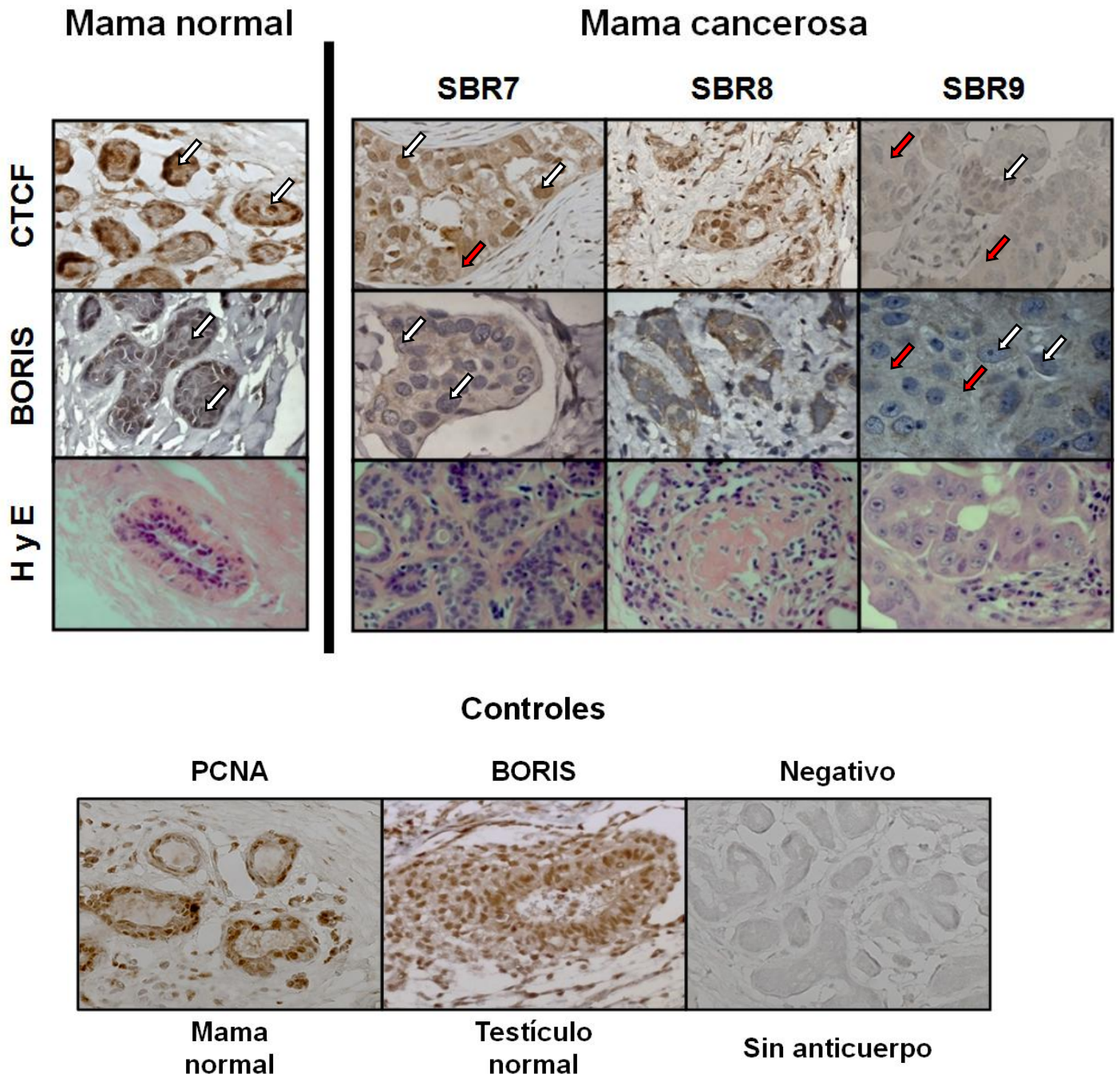


Figura 16. Inmunohistoquímicas de CTCF y BORIS en tejido mamario normal y tumoral. Presencia y ausencia de ambas proteínas en tejido de mama normal y pacientes con cáncer y diferentes grados histológicos según la escala Scarff-Bloom-Richardson modificado (SBR). Se señala el núcleo (flechas blancas) y el citoplasma (flechas rojas), respectivamente.

DISCUSIÓN

Los factores de transcripción regulan la expresión génica a través de su capacidad de unión al DNA. No obstante, el factor de unión CCCTC, mejor conocido como CTCF, es capaz de realizar otro tipo de funciones (Recillas-Targa, *et al.*, 2006). Esta proteína es un factor nuclear de 11 dedos de zinc muy conservado en diferentes organismos, desde *Drosophila melanogaster* hasta humano (Moon, *et al.*, 2005; Heger, *et al.*, 2012). Se han reportado 55,000 sitios de unión de los cuales 46% se encuentran en secuencias intergénicas, 22% en intrónicas, 20% en regiones promotoras y 12% en exónicas (Wang, *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que CTCF está implicado en múltiples procesos celulares como la regulación de la actividad de promotores, el establecimiento de dominios génicos al interior del núcleo y, recientemente, en procesos tales como el *splicing* alternativo (Hoon Kim, *et al.*, 2007; Phillips y Corces, 2009; Kornblihtt, 2012; Wang, *et al.*, 2012). Asimismo, se ha visto que CTCF está implicado en la organización de territorios cromosómicos por medio de la formación de asas de cromatina (Handoko, *et al.*, 2011).

A nivel local, CTCF se asocia con promotores de genes supresores de tumores como *BRCA1*, *p16*, *p53*, *Rb* y con promotores de microRNAs como el *miR125b-1*. En estas regiones, CTCF tiene una función de barrera en contra de la propagación de la metilación del DNA y marcas represivas de histonas (Butcher, *et al.*, 2007; Witcher y Emerson, 2009; Soto-Reyes, *et al.*, 2010 y 2012). A nivel global, esta proteína puede mediar interacciones cromatínicas de largo alcance, permitiendo la regulación de la expresión génica de dominios completos. La disociación anormal de CTCF está relacionada con el silenciamiento génico por fenómenos epigenéticos, como la hipermetilación local del DNA en promotores génicos y la ganancia de modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas con represión transcripcional (de la Rosa-Velázquez, *et al.*, 2007; Soto-Reyes, *et al.*, 2010 y 2012; Wang, *et al.*, 2012). Por lo tanto, CTCF es considerado como un factor importante en la regulación génica y el establecimiento de dominios al interior del núcleo.

El gen *CTCF* cuenta con un parálogo conocido como *CTCF-L*, el cual codifica una proteína llamada BORIS la cual posee el mismo dominio de 11 dedos de zinc pero difiere en los extremos amino y carboxilo terminal. Esta diferencia sería la responsable de determinar sus funciones celulares distintas. De manera interesante, *CTCF* y *CTCF-L* presentan patrones

de expresión mutuamente excluyentes en células normales. Por un lado, *CTCF-L* se expresa en las células germinales masculinas, mientras que *CTCF* tiene una expresión ubicua en células somáticas. Además de participar en la regulación de la cromatina, datos recientes sugieren que *CTCF* y *BORIS* desempeñan otro tipo de funciones como la expresión diferencial de los genes improntados, la regulación del centrosoma y la transcripción nucleolar (Nguyen, *et al.*, 2008; Herold, *et al.*, 2012; Rosa-Garrido, *et al.*, 2012).

Debido a que *CTCF* y *BORIS* presentan el mismo dominio de dedos de zinc, surge la interrogante de si estas proteínas podrían estar compitiendo por los mismos sitios de unión al DNA (Klenova, *et al.*, 2002; Recillas-Targa, *et al.*, 2006; Martin-Kleiner, 2011). En cáncer, se sabe que *CTCF-L* se expresa de manera aberrante en diferentes tipos de neoplasias como colon, mama y pulmón (Vatolin, *et al.*, 2005; D'Arcy, *et al.*, 2006 y 2008; Martin-Kleiner, 2011).

Por lo tanto, con el fin de contribuir en esta área de investigación, se caracterizó la expresión y la presencia de *CTCF* y *BORIS* en un modelo de cáncer de mama. Como primer abordaje se evaluaron los niveles de expresión de los genes *CTCF* y *CTCF-L* en líneas celulares de cáncer de mama, donde se observó un aumento de expresión de ambos genes en las líneas celulares cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7 en comparación con la línea normal MCF-10A (Figura 10). Estos resultados son congruentes con los reportados por Docquier y colaboradores, quienes observaron que *CTCF* tiene un mayor nivel de expresión en la línea celular MCF-7 en comparación con MDA-MB-231 (Docquier, *et al.*, 2005). Respecto al gen *CTCF-L* existe discrepancia acerca de su expresión en neoplasias. El grupo de Hines reportó que *CTCF-L* no se expresa en líneas celulares y tumores de mama mientras que el grupo de D'Arcy reportó que este gen está sobre-expresado en este tipo de cáncer, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo (D'Arcy, *et al.*, 2008; Hines, *et al.*, 2010).

Posteriormente, se caracterizó la presencia y la localización de las proteínas *CTCF* y *BORIS* por medio de inmunofluorescencias. Por un lado, *CTCF* se localizó principalmente en el núcleo de todas las líneas celulares estudiadas (Figura 11), sugiriendo que no hay cambios entre células tumorales y normales. Hay datos importantes en la literatura que han demostrado que *CTCF* presenta modificaciones post-traduccionales que son importantes para que pueda llevar a cabo su función celular normal, entre las cuales destaca la poli-ADP-ribosilación. *CTCF* se presenta en dos formas, una de 180-kiloDaltones (kDa) (*CTCF*-180) y otra de 130-kDa (*CTCF*-130) (Docquier, *et al.*, 2009). La poli-ADP-ribosilación de *CTCF*-130

da origen a CTCF-180, la cual contiene la función tipo *insulator* que protege regiones en contra del silenciamiento anormal mediado por componentes represores epigenéticos (Docquier, *et al.*, 2009; Furlan-Magaril, *et al.*, 2011). Se ha demostrado que múltiples neoplasias y líneas celulares, como MCF-7, carecen de la forma de CTCF-180 debido a que la actividad de la poli-ADP-ribosilación disminuye. De esta manera, se propone que la forma CTCF-130 se acumula paulatinamente dentro de la célula sin poder ejercer su papel de *insulator* y contribuyendo a la desregulación génica (Docquier, *et al.*, 2009).

Al analizar la localización de BORIS en las líneas celulares se detectó principalmente en nucleolo en las líneas MDA-MB-231 y MCF-10A (Figura 12A), no así en MCF-7 donde se observó un cambio importante, ya que BORIS perdió su localización nucleolar para presentarse únicamente en núcleo (Figura 12B). Estos datos hacen pensar que la presencia de BORIS en el núcleo celular podría derivar en una competencia por sitios de unión normalmente ocupados por CTCF (Recillas-Targa, *et al.*, 2006; Martin-Kleiner, 2011; Necochea-Champion, *et al.*, 2011, Link, *et al.*, 2013).

Por este motivo, se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para caracterizar la presencia de BORIS en sitios normalmente ocupados por CTCF. Este experimento se enfocó en los promotores de los genes *miR125b-1* y *p53*, de los cuales se conoce que CTCF se une a su promotor (Soto-Reyes y Recillas-Targa, *et al.*, 2010; Soto-Reyes, *et al.*, 2012). En nuestros datos se observó que CTCF se encuentra unido a la región promotora de *p53* mientras que en el promotor del *miR125b-1* CTCF se disocia permitiendo la unión de BORIS. Cabe destacar que en esta misma región se observó la aparición de la marca de silenciamiento génico H3K9me3 (Figura 13).

Datos en la literatura establecen que el 70% de los genes presentan una isla CpG en su región promotora. Se ha observado que las islas CpG de los promotores están no metiladas cuando el gen está transcripcionalmente activo y pueden ser catalogadas como altas, intermedias o bajas (Issa, 2004; Weber, *et al.*, 2007). Las islas CpG altas se han relacionado con promotores de genes constitutivos, los cuales se encuentran no metilados en condiciones normales. Las islas CpG bajas se asocian con promotores de genes tejido-específico las cuales, aparentemente, pueden encontrarse metiladas sin que se afecte su regulación (Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010). No obstante, esta clasificación depende de la naturaleza de la isla CpG ya que diferentes combinaciones de mecanismos epigenéticos

también pueden participar en el proceso de silenciamiento (Weber, *et al.*, 2007; Kondo, *et al.*, 2008; Meissner, *et al.*, 2008). Por ejemplo, los promotores con una isla CpG alta frecuentemente son silenciados por metilación del DNA y la incorporación de modificaciones de histonas asociadas con represión (McGarvey, *et al.*, 2006; Kondo, *et al.*, 2008). En contraste, las islas CpG intermedias y bajas son silenciadas por modificaciones de histonas asociadas con silenciamiento y no por metilación del DNA (Kondo, *et al.*, 2008). De esta manera, las modificaciones de las histonas y la metilación del DNA pueden ejercer un efecto independiente y sus promotores blanco pueden definirse por la cantidad de dinucleótidos CpG (Weber, *et al.*, 2007; Kondo, *et al.*, 2008; Meissner, *et al.*, 2008; Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010).

Se ha considerado que el promotor del gen *p53* corresponde a una isla CpG intermedia cuyo silenciamiento epigenético no depende de la metilación del DNA (Pogribny, *et al.*, 2000; Kang, *et al.*, 2001; Amatya, *et al.*, 2005; Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010). Debido a que el factor CTCF regula esta región promotora, se propuso un modelo en el cual esta proteína logra impedir el silenciamiento epigenético de este promotor también evitando la incorporación de modificaciones de histonas asociadas con represión génica y no sólo contrarrestando la metilación del DNA (como en el caso de *Rb* y otros promotores de genes supresores de tumores). El silenciamiento de este promotor sólo fue observado en gliomas y se relacionó con la disociación de CTCF de la región promotora y el enriquecimiento de modificaciones de histonas asociadas con represión (Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010).

Por otra parte, la isla CpG del promotor de *miR125b-1* es catalogada como una isla CpG alta ya que estudios recientes han demostrado que se encuentra metilada en células cancerosas de mama. Debido a que CTCF también se encuentra involucrado en la regulación de este promotor, se propuso un modelo donde CTCF evitaría el reclutamiento de componentes de silenciamiento epigenético, tales como la metilación y marcas de histonas asociadas con represión en tejido mamario normal. En cáncer de mama, la pérdida de CTCF se asociaría con la metilación de la isla CpG y la ganancia de modificaciones de histonas represivas (Soto Reyes, *et al.*, 2012).

Los datos anteriores apoyarían la hipótesis de competencia por sitios de unión entre CTCF y BORIS. Debido a que BORIS se asocia con el establecimiento de patrones aberrantes de metilación, su unión a alguna de estas regiones podría favorecer el

silenciamiento génico. La metilación de estas regiones también desencadenaría la unión de proteínas específicas de DNA metilado a las islas CpG, al atraer enzimas modificadoras de histonas asociadas con el silenciamiento de la cromatina (Issa, 2004). Se podría pensar que, la incorporación de una marca de histona en la línea celular MCF-7, como la H3K9me3, podría ser un factor que también favoreciera el silenciamiento de la región promotora del *miR125b-1*.

Con el fin de evaluar si el mecanismo de silenciamiento mediado por BORIS se podría presentar en otro modelo celular, se caracterizó la localización y la presencia de CTCF y BORIS en la línea de cáncer colorrectal HCT-116. En las inmunofluorescencias se observó que CTCF y BORIS tenían una localización nuclear (Figura 14), fenómeno similar al observado en MCF-7 (Figuras 11 y 12). Por medio del ChIP se observó que CTCF permaneció unido a la región de *p53* mientras que BORIS se unió a la región de *miR125b-1* (Figura 15B) igual que en MCF-7. Con estos experimentos se demostró que BORIS estaba ocupando un sitio propio de CTCF en el promotor de *miR125b-1* en otro tipo de células cancerosas. Una explicación para este fenómeno sería la pérdida de CTCF en la región promotora del *miR125b-1* a la cual BORIS podría unirse y promover el establecimiento de un patrón de metilación aberrante. Particularmente, este miRNA se ha asociado con actividad de gen supresor de tumores y, en estudios recientes, el decremento en su expresión se ha relacionado con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama (Zhang, *et al.*, 2011). Algunos blancos reportados en este tejido, son *ERBB2* (Scott, *et al.*, 2007), el cual codifica para Her2/neu, una proteína membranal usada como marcador de cáncer en el área clínica; y *EST1* (Zhang, *et al.*, 2011), un factor transcripcional cuya sobre-expresión se ha asociado con el incremento en la invasividad del cáncer. Por esta razón, es importante conocer como se lleva a cabo la regulación de este miRNA y si BORIS participa en su represión transcripcional.

Se ha sugerido que BORIS debe presentarse en niveles comparables con CTCF para ser capaz de competir por los mismos sitios de unión (Hines, *et al.*, 2012). Sin embargo, si CTCF se disociara de todos sus sitios entonces se presentaría un caso de letalidad celular. Por lo tanto, solamente se necesitaría que BORIS ocupara unos cuantos sitios de CTCF para provocar una desregulación génica (Necochea-Champion, *et al.*, 2011). Un ejemplo para este fenómeno serían las inmunoprecipitaciones de la cromatina de MCF-7 y HCT-116, en las cuales CTCF continuó unido a la región promotora de *p53* mientras que BORIS se unió a la del *miR125b-1* (Figuras 13 y 15).

Por último, se hizo un análisis de la presencia y la localización de CTCF y BORIS en cortes histológicos de pacientes con cáncer de mama por medio de inmunohistoquímicas (Figura 16). Butcher y Rodenhiser ya habían determinado la localización citoplásmica de CTCF en tumores mamarios, datos que fueron congruentes con los obtenidos en el presente trabajo (Butcher y Rodenhiser, 2007). De manera interesante, se observó que la presencia de CTCF disminuye en los pacientes con un grado histológico más agresivo. Hasta la fecha no existen estudios sobre la localización y la presencia de BORIS en este tipo de neoplasia por lo cual se realizaron inmunohistoquímicas en muestras de los mismos pacientes para compararlos con CTCF. Datos preliminares sugieren que BORIS perdió su localización nuclear para enriquecerse en el citoplasma de las células de tumores mamarios más agresivos.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, datos preliminares sugieren que los genes *CTCF* y *CTCF-L* se sobre-expresaron en líneas celulares de cáncer de mama. La presencia y la localización de CTCF no sufrieron cambios, sin embargo, BORIS aparentemente se translocó de nucleolo a núcleo en las líneas celulares MCF-7 y HCT-116. De manera interesante, en estas mismas líneas BORIS se unió a la región promotora del *miR125b-1*, donde normalmente se encuentra unido CTCF. Datos preliminares en muestras de pacientes con cáncer de mama sugieren que BORIS aumentó su presencia en citoplasma mientras que CTCF, aparentemente, se perdió en los pacientes con un grado histológico más agresivo.

PERSPECTIVAS

Debido a que en las inmunofluorescencias de las líneas celulares no se encontraron diferencias en la presencia y la localización de CTCF, sería interesante diferenciar la presencia de las formas CTCF-130 y CTCF-180 y poder relacionarlas con el proceso de desregulación génica.

Datos en la literatura establecen que CTCF y BORIS son capaces de interactuar con otro tipo de proteínas, las cuales podrían determinar su función y localización celular (Nguyen, *et al.*, 2008; Zlatanova y Caiafa, 2009; Ohlsson, *et al.*, 2010, van de Nobelen, *et al.*, 2010; Necochea-Champion, *et al.*, 2011). Por lo tanto, sería interesante observar qué tipo de efecto pueden ejercer sobre la secuencia del DNA en función de la interacción proteica que establezcan.

Por otra parte, se debe continuar estudiando la posible competencia entre CTCF y BORIS por sitios de unión al DNA. En este estudio se observó que mientras CTCF se encarga de impedir la metilación de genes supresores de tumores, BORIS podría estar ejerciendo un papel importante en su silenciamiento epigenético. Aún cuando se sabe que BORIS establece patrones de metilación sobre el ICR del locus de *Igf2/H19*, falta por averiguar si esta proteína es capaz de reclutar a las metiltransferasas DNMT3a y DNMT3b y establecer una metilación aberrante en cáncer. La marca H3K9me3 es establecida por la enzima SUV-39H1, por lo que sería interesante descubrir si el enriquecimiento de dicha marca en la región promotora del *miR125b-1* se debe a que BORIS también es capaz de reclutar a dicha enzima. De igual manera, aún queda por evaluar si BORIS es capaz de activar genes cuya transcripción es impedida por CTCF mediante el reclutamiento de proteínas encargadas de la desmetilación del DNA o el establecimiento de marcas de activación.

Por último, se necesitan realizar más análisis en cortes histológicos de pacientes con cáncer de mama para comprobar las observaciones realizadas en este trabajo. Sería interesante establecer una asociación entre la presencia de CTCF y BORIS con el grado histológico del tumor. Asimismo, se deben analizar los blancos génicos de CTCF para comprobar una posible competencia con BORIS en tumores mamarios.

MÉTODOS EN EXTENSO

Aislamiento de RNA en líneas celulares mediante TRIzol (GIBCO) para células que crecen en monocapa

1. Retirar el medio de cultivo y lisar las células directamente en el plato de cultivo mediante la agregación de TRIzol (GIBCO).
Nota: La cantidad de TRIzol utilizado está basado en el área del plato de cultivo (1 ml por 10 cm²) y no por el número de células presentes. La utilización de una cantidad menor de TRIzol puede provocar la contaminación de RNA con DNA.
2. Mezclar el TRIzol varias veces con ayuda de una micropipeta para despegar las células por completo.
3. Pasar la mezcla de TRIzol con las células a un tubo Falcon de 15 ml e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado.
5. Agitar el tubo vigorosamente por 15 segundos.
6. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a no más de 12,000 g entre 2 a 8°C durante 15 minutos. Después de la centrifugación, se obtienen 3 fases. La fase superior es la fase acuosa, la media es la fase de fenol-cloroformo y la inferior es la fase roja. El RNA se encuentra exclusivamente en la fase acuosa.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadir 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml utilizado de TRIzol para favorecer la precipitación del RNA.
9. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a no más de 12,000 g entre 2 a 8°C durante 10 minutos. En ocasiones, se puede observar el pellet con el RNA.
11. Remover el sobrenadante y lavar el pellet con 3 ml de etanol al 75% con agua DPEC. Mezclar brevemente con ayuda de un vórtex.
12. Centrifugar a 7,500 g entre 2 a 8°C durante 5 minutos.
13. Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.

14. Resuspender la muestra en 20 μ l de agua DPEC, incubar a 60°C en un baño maría durante 10 minutos y guardar a -70°C.
15. Cuantificar la concentración de RNA en el NanoDrop (marca NanoDrop Technologies, modelo ND-1000).
16. Determinar la integridad del RNA mediante un gel de formaldehído (FA) al 1.2%.

Preparación del gel de formaldehído (FA) 1.2%

1. Mezclar 1.2 g de agarosa en 10 ml de buffer 10x para el gel FA en un matraz.
2. Aforar a 100 ml con agua libre de RNAsa.
3. Calentar el matraz en el horno de microondas para fundir la agarosa.
4. Dejar enfriar y adicionar 1.8 ml de formaldehído al 37% (12.3 M).
5. Equilibrar en buffer 1x para el gel FA durante toda la noche o al menos por 30 minutos antes de correr el gel.

Buffers

Buffer 10x para el gel FA	Buffer de corrida
<ul style="list-style-type: none"> - MOPS 200 mM (libre de ácidos). - Acetato de sodio 50 mM. - EDTA 10 mM. - pH 7. 	<ul style="list-style-type: none"> - 100 ml de buffer 10x para el gel FA. - 20 ml de formaldehído al 37% (12.3 M). - 880 ml de agua libre de RNAsa.
Buffer de carga 5x	
<ul style="list-style-type: none"> - 16 μL de azul bromofenol acuoso. - 80 μL de EDTA 500 mM con pH 8. - 720 μL de formaldehído al 37% (12.3 M). - 2 ml de glicerol al 100%. - 3.084 ml de formamida. - 4 ml de buffer 10x para el gel FA. - Aforar a 10 ml con agua libre de RNAsa. La estabilidad aproximada es de 3 meses a 4°C. 	

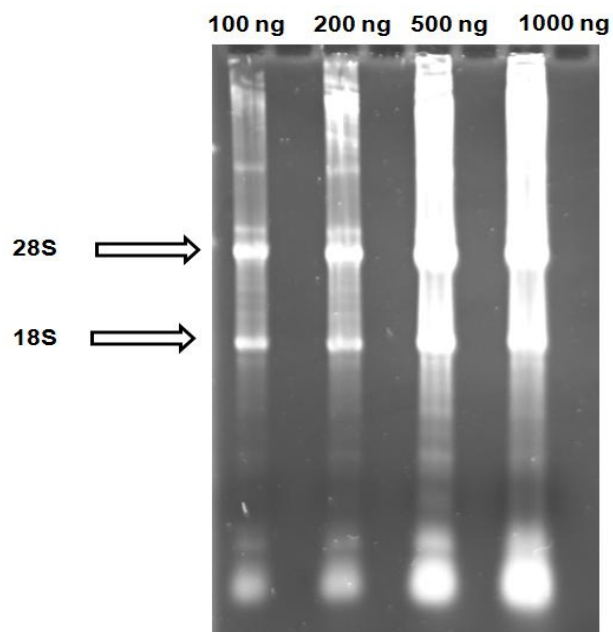
Preparación de la muestra de RNA

1. Adicionar 1 volumen de buffer de carga 5x por 4 volúmenes de muestra de RNA. Mezclar e incubar de 3 a 5 minutos a 65°C. Colocar en hielo.
2. Se pueden realizar diluciones 1:2 de las muestras (1 μL muestra + 1 μL de agua libre de RNAsa).
3. Preparar las muestras de la manera siguiendo:
 - 1 μL de muestra (concentrada o diluida).
 - 3 μL DDW libre de RNAsa.
 - 1 μL buffer de carga.
4. Incubar a 65.5°C durante 5 minutos. Posteriormente, colocar en hielo.

	1x
5X first strand buffer	4 μl
0.1 M DTT	2 μl
RNAsa OUT	1 μl

5. Adicionar 7 μl del mix a cada muestra.
6. Incubar a 42°C durante 2 minutos.
7. Agregar 1 μl SSEII (transcriptasa reversa) a cada muestra.
8. Incubar a 42°C por 50 minutos.
9. Incubar a 70°C durante 15 minutos.
10. Dejar enfriar a 37°C a temperatura ambiente.
11. Adicionar 1 μl de RNAsa H (2 unidades/ μl) a cada muestra.
12. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

En el gel desnaturizante de FA deben identificarse las subunidades 18S y 28S para comprobar la integridad de la muestra de RNA extraído.



Inmunofluorescencias (IF)

1. Cultivar 100,000 células sobre cubreobjetos dispuestos en el fondo de cajas con pozos. Dejar proliferar en la incubadora durante 24 horas.
2. Al día siguiente, agregar 1 ml de formaldehído al 4% a cada pozo e incubar durante 10 minutos.
3. Retirar el formaldehído y hacer 3 lavados con PBS 1x cada 5 minutos.
4. Agregar 1 ml de una solución de Tritón X-100 al 0.1% e incubar durante 5 minutos.
5. Retirar el Tritón y hacer 3 lavados con PBS 1x cada 3 minutos.
6. Agregar 1 ml de glicina 100 mM e incubar durante 1 hora.
7. Remover la glicina y agregar 10 μ l del anticuerpo primario para CTCF y BORIS. Cubrir con parafilm cortado del mismo tamaño que el cubreobjetos. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
8. Quitar el parafilm y hacer 3 lavados con PBS 1x cada 5 minutos.
9. Agregar 10 μ l del anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Cubrir el cubreobjetos con parafilm. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda tapada con aluminio.
10. Quitar el parafilm y hacer 3 lavados con PBS 1x cada 3 minutos.
11. Para montar las laminillas agregar una gota de medio de montaje (VECTASHIELD con DAPI) en cada división. Colocar un cubreobjetos limpio sobre la gota y dejarlo caer cuidando que no se formen burbujas. Apretar levemente con un papel para quitar el exceso de medio de montaje y sellar las orillas del cubreobjetos con barniz de uñas transparente.

Anticuerpos

	Anti-CTCF	Anti-BORIS	Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit
Dilución utilizada	1:100	1:50	1:200
Origen	Conejo	Conejo	Cabra
Marca	Millipore	Abcam	Invitrogen
Número de catálogo	07-729 (Lote DAM1682158)	ab18337	A-11008 (Lote 571716)
Tipo	Policlonal	Monoclonal	Monoclonal

Buffers

Formaldehido al 4%	PBS 1x
<ul style="list-style-type: none"> - 5.4 ml de formaldehido. - Aforar a 50 ml con PBS 1x. 	<ul style="list-style-type: none"> - 8 g de NaCl. - 0.2 g de KCl. - 1.44 g de Na₂HPO₄. - 0.24 g de KH₂PPO₄. - Ajustar pH a 7.4. - Aforar a 1 litro.
Glicina 100 mM	Tritón x-100 al 5%
<ul style="list-style-type: none"> - 0.375 g de glicina. - Aforar a 50 ml con PBS 1x. 	<ul style="list-style-type: none"> - 2.5 ml Tritón x-100. - Aforar a 50 ml con PBS 1x. De aquí tomar 400 µl y llevarlo a 20 ml con PBS 1x para tener una solución 0.1%.

Inmunohistoquímicas (IHQ)

1. **Preparación de las laminillas con el tejido mamario.** Desparafinar a 65°C durante 40 minutos en un horno de calor seco.

2. **Tren de hidratación.**

Sustancia	Tiempo
Xilol 1	15 minutos
Xilol 2	15 minutos
Etanol absoluto 1	10 minutos
Etanol absoluto 2	10 minutos
Etanol al 70%	10 minutos
Agua destilada	1 minuto
PBS 1x frío	10 minutos

3. **Recuperación antigénica.** Calentar una olla a presión en un horno de microondas durante 6 a 7 minutos. Inmediatamente después de que el émbolo de la olla suba, añadir buffer de citratos a los *coplings* con las laminillas, cerrarlos y meterlos en la olla. Contar 1 minuto después de que la olla alcance la máxima presión (cuando comienza a chillar después de 6 a 7 minutos de calentamiento). Sacar la olla del horno y poner bajo el chorro de agua fría para enfriarla. Sacar los *coplings* de la olla y se enfriar del mismo modo. Incubar las laminillas con PBS 1x frío durante 10 minutos y montar en una cámara húmeda.

4. **Inhibición de la peroxidasa endógena.** Realizar 3 lavados con 100 µl de peróxido de hidrógeno y metanol al 3% cada 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar, realizar 3 lavados con 100 µl de PBS 1x cada 3 minutos.

5. **Bloqueo de antígenos inespecíficos.** Adicionar 100 µl de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

Nota: Realizar un recambio de BSA a los 30 minutos.

6. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µl de Tritón X-100 al 1% cada 3 minutos. Hacer un lavado con 100 µl de PBS 1x.

7. **Adición del anticuerpo primario.** Añadir 100 µl del anticuerpo primario para CTCF, BORIS y PCNA. Incubar a 4°C durante toda la noche.

8. **Lavados.** Al día siguiente, realizar 3 lavados con 100 µl de Tritón X- 100 al 1% cada 3 minutos.
9. **Adición del anticuerpo secundario.** Añadir de 4 a 5 gotas del anticuerpo secundario universal biotinilado (DAKO). Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µl de Tritón X- 100 al 1% cada 3 minutos.
11. **Estreptavidina.** Añadir la estreptavidina – HRP (DAKO) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 µl de Tritón X- 100 al 1% cada 3 minutos.
13. **Revelado de la reacción.** Añadir cromógeno DAB (1 gota por ml) e incubar a temperatura ambiente hasta observar la tinción positiva.
Nota: Se debe observar constantemente al microscopio para poder detener la reacción sumergiendo la laminilla en un *copling* con PBS 1x.
14. **Contratinción con hematoxilina.** Sumergir las laminillas en un *copling* con hematoxilina de 5 a 10 segundos. Lavar en agua destilada y virar en un baño maría durante 10 minutos aproximadamente.
15. **Montaje de las laminillas.** Realizar el tren de hidratación pero de manera inversa.

Sustancia	Tiempo
Etanol al 70%	10 minutos
Etanol absoluto 2	10 minutos
Etanol absoluto 1	10 minutos
Xilol 2	10 minutos
Xilol 1	10 minutos

Adicionar a cada laminilla una gota de medio de montaje Entellan y colocar el cubreobjetos. Dejar secar a temperatura ambiente.

Anticuerpos

	Anti-CTCF	Anti-BORIS	Anti-PCNA
Dilución utilizada	1:1000	1:300	1:1000
Fuente	Conejo	Cabra	Conejo
Marca	Millipore	Santa Cruz	Santa Cruz
Número de catálogo	07-729 (Lote DAM1682158)	sc-51036 (Lote E1007)	sc-7907 (Lote F2007)
Tipo	Policlonal	Policlonal	Policlonal

Buffers

Albúmina de suero bovino al 5%	PBS 1x
<ul style="list-style-type: none"> - 2.5 g de albúmina de suero bovino. - Aforar a 50 ml con PBS 1x. 	<ul style="list-style-type: none"> - 8 g de NaCl. - 0.2 g de KCl. - 1.44 g de Na₂HPO₄. - 0.24 g de KH₂PPO₄. - Ajustar pH a 7.4. - Aforar a 1 litro.
Buffer de citratos	Peróxido de hidrógeno y metanol al 3%
<ul style="list-style-type: none"> - 2.94 g de citrato trisodio (dihidratado). - Ajustar pH a 6. - Añadir 0.5 ml de Tween 20. - Aforar a 1 L con agua destilada. - Guardar a temperatura ambiente durante 4 meses o a 4°C para mayor tiempo. 	<ul style="list-style-type: none"> - 100 µl de peróxido de hidrógeno (30%). - Aforar a 1 ml con 900 µl de metanol.
Etanol al 70%	Tritón x-100 al 1%
<ul style="list-style-type: none"> - 145.83 ml de etanol al 96%. - Aforar a 200 ml con agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> - 0.5 ml Tritón x-100. - Aforar a 50 ml con PBS 1x.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

- 1. Células.** Cultivar en 2 frascos de cultivo de 150 cm² hasta tener una confluencia del 80%.
- 2. Reacción de entrecruzamiento.** Adicionar 2 ml de buffer de entrecruzamiento directamente al medio de cultivo. El volumen total de cada caja debe ser de 20 ml para que las células permanezcan en formaldehído al 1%. Agitar moderadamente durante 10 minutos.
- 3. Detener la reacción de entrecruzamiento.** Adicionar 1 ml de glicina (2.5 M). Agitar moderadamente durante 5 minutos.
- 4. Lavado.** Retirar el medio de cultivo y hacer 3 lavados con PBS 1x frío de 5 minutos cada uno.
- 5. Lisis.** Remover el PBS, adicionar 1 ml de buffer de lisis a cada una de las cajas y e incubar a 4 °C durante 5 minutos. Recuperar con un gendarme y pasar a un tubo Falcon de 50 ml. Posteriormente, el tubo puede almacenarse a 4°C.
- 6. Sonicación.** Colocar el tubo en un vaso con hielo para mantenerlo frío y evitar que saque mucha espuma. El programa de sonicación es de 30 segundos, pulso 2.0 - 0.5, amplitud de 35% en un sonicador Ultrasonic Processor (marca GENEQ, modelo GEX500, número de catálogo SOVC505-00). La cromatina se puede guardar a 4°C.
- 7. Evaluación de la sonicación:** Después de cada pulso tomar 200 µl de muestra y colocar en un tubo Eppendorf. Adicionar 0.5 µl de RNAsa A (5 mg/ml) a cada muestra e incubar en un baño maría a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, agregar de 2 a 3 µl de proteinasa K (20 mg) e incubar en un baño maría a 65°C durante toda la noche.
- 8. Estandarización de la cromatina.** Llevar las muestras a 300 µl con agua destilada y limpiar dos veces mediante el método de fenol-cloroformo. Para ello, mezclar cada una de las muestras con ayuda de un vórtex durante 5 minutos o hasta no observar una bicapa y adquirir una mezcla de color blancuzco. Centrifugar por 10 minutos a 13,200 rpm. Recuperar el sobrenadante con una pipeta y colocar en un tubo nuevo teniendo cuidado de recuperar solamente la primera fase la cual corresponde a la fase acuosa. Repetir dos veces más. Posteriormente, agregar un volumen de 1/10 de acetato de sodio (3M), 1 µl de glicógeno (20 mg) y 2 volúmenes de etanol frío al 100%. Guardar

las muestras a -20°C . Al día siguiente, correr un gel de agarosa al 1% para evaluar que el tamaño de la cromatina se encuentre entre 500 y 700 pares de bases (pb).

- 9. Pre-cleaning.** Centrifugar la cromatina durante 5 minutos a velocidad máxima (se puede realizar en una centrífuga no refrigerada). Tomar 420 μl de cromatina por cada inmunoprecipitación. Llevar a un volumen final de 4 ml con una mezcla de 9 partes de buffer de dilución, 1 parte de buffer de lisis e inhibidores de proteasas. Posteriormente, añadir 50 μl de perlas y dejar rotando de 2 a 4 horas a 4°C . Centrifugar a 2,000 rpm y recuperar el sobrenadante (se trata de cromatina limpia que se utilizará para la inmunoprecipitación).
- 10. Inmunoprecipitación:** Llevar la cromatina limpia a un volumen final de 4 ml con una mezcla de 9 partes de buffer de dilución, 1 parte de buffer de lisis e inhibidores de proteasas.
- 11. Anticuerpos:** Añadir 4 μg de anticuerpo a cada inmunoprecipitación. Dejar rotando a 4°C durante 6 horas o por toda la noche.
- 12. Adición de las perlas a las inmunoprecipitaciones:** Poner 50 μl de perlas a cada una de las inmunoprecipitaciones. Dejar rotando durante 2 horas a 4°C .
- 13. Lavado de perlas:** Centrifugar las perlas a 2,000 rpm durante 2 minutos y quitar el sobrenadante con mucho cuidado. Añadir 1 ml de buffer de lavado y volver a centrifugar. Repetir 3 veces más. Finalmente, lavar con 1 ml de buffer de lavado final.
Nota: No aspirar el líquido pues se pueden perder las perlas.
- 14. Elución del DNA:** Adicionar 450 μl de buffer de elución y 0.5 μl de RNAsa A (5 mg/ml) a cada muestra e incubar en un baño maría a 37°C durante 30 minutos.
- 15. Toma del *input*.** Se refiere a una muestra no inmunoprecipitada que representa la cantidad de cromatina utilizada en el ChIP. Recuperar 200 μl de la cromatina restante y tratar de la misma manera que las inmunoprecipitaciones. Diluir el *input* en una concentración 1:100 ó 1:400.
- 16. Revertir el crosslinking:** Agregar de 2 a 3 μl de proteinasa K (20 mg) e incubar en un baño maría a 65°C durante toda la noche.
- 17. Limpieza del DNA:** Realizar el método de fenol-cloroformo o utilizar las columnas mini-elute (Quiagen) para obtener el DNA.

18. Resuspender el DNA: Añadir 50 µl de agua estéril e incubar a 37°C durante 30 minutos. A partir de este punto es posible realizar los PCRs con 2 µl de muestra.

Anticuerpos

	Anti-CTCF	Anti-BORIS	Anti-BORIS	IgG
Origen	Conejo	Rata	Conejo	Conejo
Marca	Millipore	Abcam	Santa Cruz	Santa Cruz
Número de catálogo	07-729 (Lote DAM1682158)	ab111255	sc-51036 (Lote E1007)	sc-2027 (Lote C2712)
Tipo	Policlonal	Monoclonal	Policlonal	Policlonal

Buffers

Buffer de entrecruzamiento	Buffer de lavado
<ul style="list-style-type: none"> - Formaldehído al 11%. - NaCl 100 mM. - EGTA 0.5 mM. - HEPES 50 mM con pH 8. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tritón X-100 al 1%. - SDS al 0.1%. - NaCl 150 mM. - EDTA 2 mM con pH 8. - Tris-HCl 20 mM con pH 8. - Inhibidores de proteasas.
Buffer de dilución	Buffer de lavado final
<ul style="list-style-type: none"> - Tritón X-100 al 1%. - NaCl 150 mM. - EDTA 2 mM con pH 8. - Tris-HCl 20 mM con pH 8. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tritón X-100 al 1%. - SDS al 0.1%. - NaCl 500 mM. - EDTA 2 mM con pH 8. - Tris-HCl 20 mM con pH 8. - Inhibidores de proteasas.
Buffer de elución	Buffer de lisis
<ul style="list-style-type: none"> - SDS al 1%. - NaHCO₃ 100 mM. 	<ul style="list-style-type: none"> - SDS al 1%. - EDTA 10 mM con pH 8. - Tris-HCl 50 mM con pH 8. - Inhibidores de proteasas.

Preparación de las perlas

- 1.** Tomar 0.2 g de proteína A (Amersahm Protein A Sepharose CL-4B) y 100 μ l de perlas proteína G (Ge Healthcare Protein G Sepharose) en un mezcla de 9 partes de buffer de dilución y 1 parte de buffer de lisis.
- 2.** Añadir 100 μ g/ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 10% y 500 μ g/ml de esperma de salmón.
- 3.** Dejar rotar durante toda la noche.
- 4.** Al día siguiente, retirar la mezcla de buffers, lavar 2 veces con buffer de dilución y resuspender en 2 ml de una mezcla nueva de buffers.

Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama y una línea no transformada: MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A, respectivamente. Las primeras dos líneas fueron cultivadas con medio RPMI (GIBCO) adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC) y 1x de antibiótico/antimicótico (GIBCO). La línea celular MCF-10A fue cultivada con medio DMEM/F12 (3:1) (GIBCO) adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC), 2 mM de glutamina (GIBCO), 1x de antibiótico/antimicótico (GIBCO), 10 ng/ml de EGFrh (factor de crecimiento epidérmico humano recombinante; Invitrogen), 120 mU/ml de insulina recombinante humana y 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma). Todas las líneas se mantuvieron a 37°C con 5% de CO².

Los cánceres de mama pueden clasificarse en subtipos moleculares en función de sus perfiles de expresión génica. Hasta ahora se han propuesto 5 subtipos: luminal A, luminal B, HER2, basal y sin clasificar (Tabla 2). Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10A se han clasificado como subtipo basal mientras MCF-7 se considera como un subtipo luminal A (Tabla 3).

El subtipo luminal A se caracteriza por presentar tumores diferenciados que se detectan frecuentemente en pacientes mayores y tiene el mejor pronóstico comparado con otros subtipos. El subtipo luminal B tienen una mayor expresión de genes asociados con proliferación y tiene un peor pronóstico que el luminal A. El subtipo HER2 generalmente se asocia con metástasis nodal. El subtipo basal se presenta en pacientes jóvenes, se asocia con metástasis en órganos viscerales y tiene un pronóstico pobre (Subik, *et al.*, 2010). Se considera que un tumor no se puede clasificar cuando tiene una correlación baja con los subtipos anteriores y la definición de genes no es uniforme (Loi, *et al.*, 2007).

Subtipo	ER y/o PR	Sobre-expresión de HER2	EGFR y/o CK5/6
Luminal A	+	-	+ ó -
Luminal B	+	+	+ ó -
HER2	-	+	+ ó -
Basal	-	-	+
Sin clasificar	-	-	-

Tabla 2. Definición de cada subtipo basado en la expresión molecular del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) y CK5/6. (Modificado de Subik, *et al.*, 2010).

	ER	PR	HER2	CK5/6	EGFR	Ki-67	AR	Subtipo
MDA-MB-231	0	0	0-1+	-	1+	100%	8	Basal
MCF-7	6	6	0-1+	-	1+	90%	7	Luminal A
MCF-10A	0	0	0-1+	+	2+	30%	0	Basal

Tabla 3. Definición del subtipo molecular en base a los patrones de expresión de ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 y el receptor de andrógenos (AR) por análisis inmunohistoquímico en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A. Para ER, PR y AR se utilizó la puntuación Allred; para HER 2 y EGFR se usó la puntuación para HER2; para CK5/6 toda tinción citoplásmica se consideró como positiva; para Ki-67 se manejó el porcentaje de tinción nuclear de cualquier intensidad (modificado de Subik, *et al.*, 2010).

Síntesis de cDNA (SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (First Strand cDNA Synthesis Using Superscript II RT – Invitrogen))

1. Para una reacción con volumen final de 20 μ l, añadir 1 μ l (0.5 mg) de Oligo(dt)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml), 500 ng/ μ l de RNA total y 1 μ l de dNTP Mix (10 mM). Llevar a 12 μ l con agua destilada estéril.
2. Calentar a 65°C durante 5 minutos y enfriar rápidamente en hielo.
3. Añadir 4 μ l de 5x First Strand Buffer, 2 μ l de 0.1 M DTT y 1 μ l de RNAsaOut (40 unidades/ μ l).
4. Mezclar suavemente e incubar a 42°C durante 2 minutos.
5. Añadir 1 μ l de SuperScript II RT (200 unidades/ μ l) y mezclar cuidadosamente con la micropipeta.
6. Añadir agua estéril para llevar la mezcla a un volumen final de 20 μ l.
7. Incubar a 42°C durante 50 minutos.
8. Inactivar la reacción incubando a 70°C durante 15 minutos.

Transfección del plásmido CTCF-GFP

1. Cultivar 200,000 células MCF-7 en cajas de cultivo de 6 pozos con 500 μ l de medio completo. Esperar a que tengan una confluencia de entre 50 y 80% para poder realizar la transfección.
2. Realizar dos mezclas para la co-transfección.

Reactivos tubo 1	[] (1x)
Lipofectamina	2 μ l
Medio DMEM sin suero bovino fetal	100 μ l
CTCF-GFP [50 ng/ μ l]	2 μ l
Reactivos tubo 2	[] (1x)
Reactivo PLUS	2 μ l
Medio DMEM sin suero bovino fetal	100 μ l

3. Mezclar las mezclas de ambos tubos e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar las células 2 veces con PBS 1x.
5. Agregar 800 μ l de medio sin suero y sin antibiótico a cada uno de los pozos. Agregar 1 ml de medio al control negativo.
6. Colocar 200 μ l del complejo DNA-lípidos en las cajas con células mediante goteo para disminuir la toxicidad y para que el plásmido entre a todas las células.
7. Incubar a 37°C durante 6 horas.
8. Inactivar la lipofectamina con medio adicionado con suero y antibiótico.
9. Incubar las células durante 24 horas antes de probar la expresión del transgen.

Oligonucléotidos

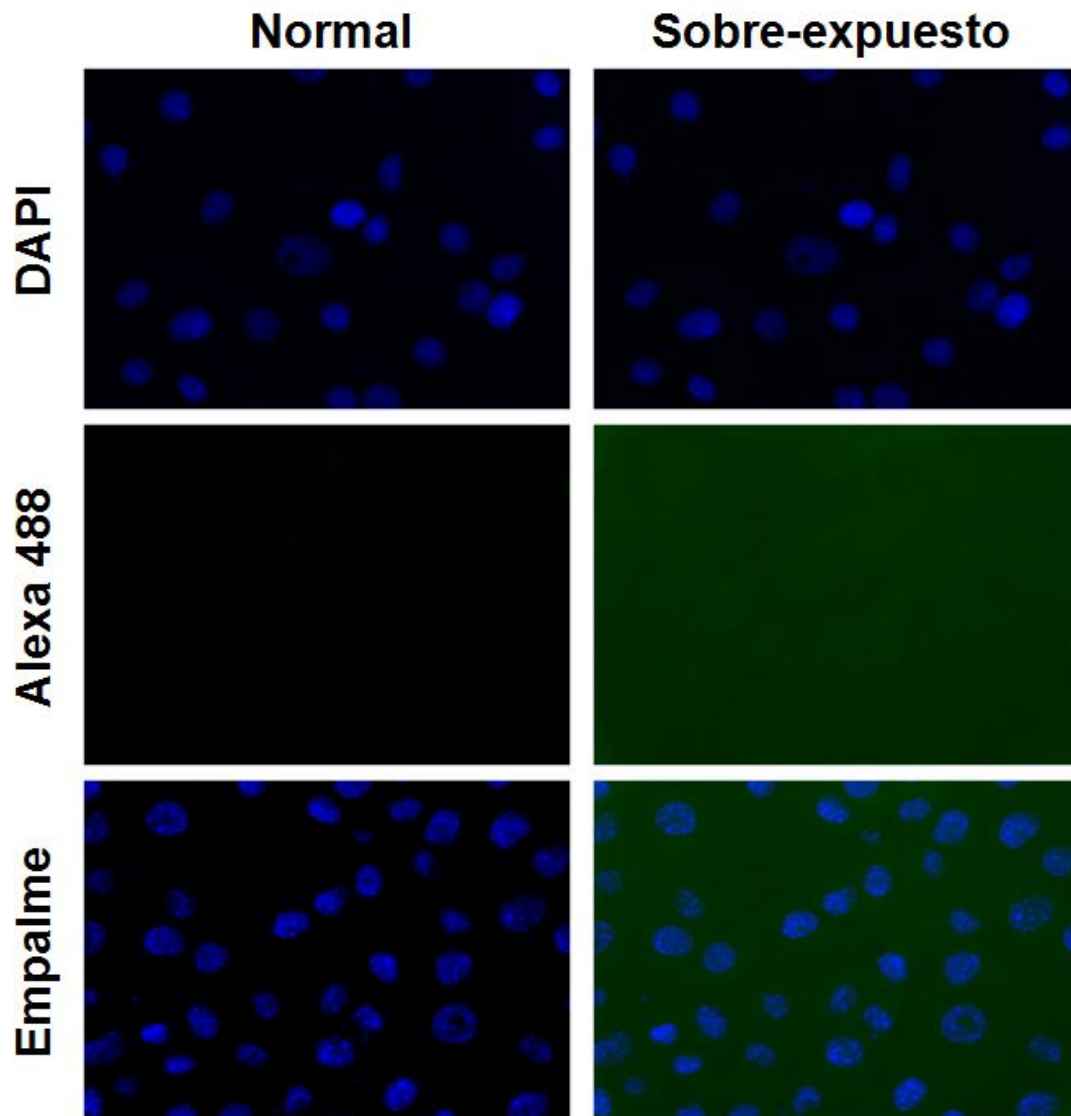
Análisis de expresión

Oligonucleótidos	Secuencia en DNA (5' – 3')	Tm (°C)	Ciclos	Tamaño esperado en cDNA	Tamaño esperado en DNA
<i>CTCF</i> FWD (Exón 5 -6)	GAGAAGCCATTCAAGTGTTCAT	66	32	85 pb	399 pb
<i>CTCF</i> RVS (Exón 5 -6)	CTCCAGTATGAGAGCGAATGTGA				
<i>CTCF-L</i> FWD (Exón 5 -6)	AAAACCTTCCGTACGGTCACTCT	66	40	84 pb	3903 pb
<i>CTCF-L</i> RVS (Exón 5 -6)	TGTTGCAGTCGTTACACTTGTAGG				

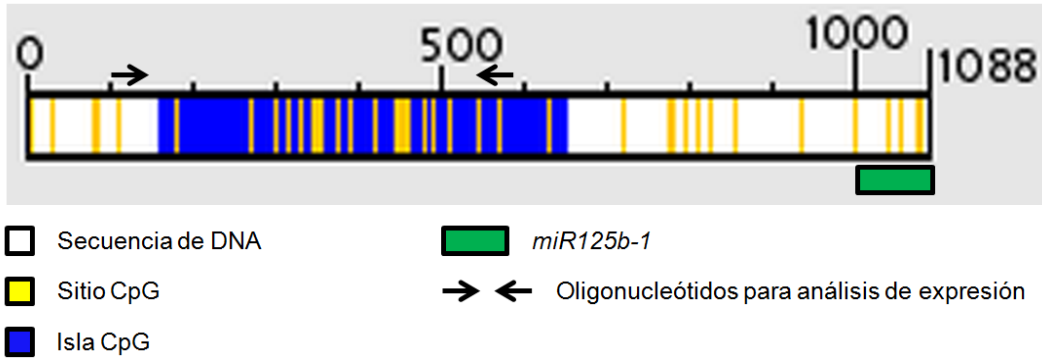
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Oligonucleótidos	Secuencia en DNA (5' – 3')	Tm (°C)	Ciclos	Tamaño esperado en cDNA	Tamaño esperado en DNA
<i>miR-125b1</i> FWD (Promotor)	GGCAAAGTGACGCTAAAG	58	32	-	481 pb
<i>miR-125b1</i> RVS (Promotor)	GGCAAGTATGCCGCATGC				
<i>p53</i> FWD (Promotor)	CACCTTCCGATTGGGCCGC	58	32	-	360 pb
<i>p53</i> RVS (Promotor)	AGTGCCTATATCAGTGCTGGG				

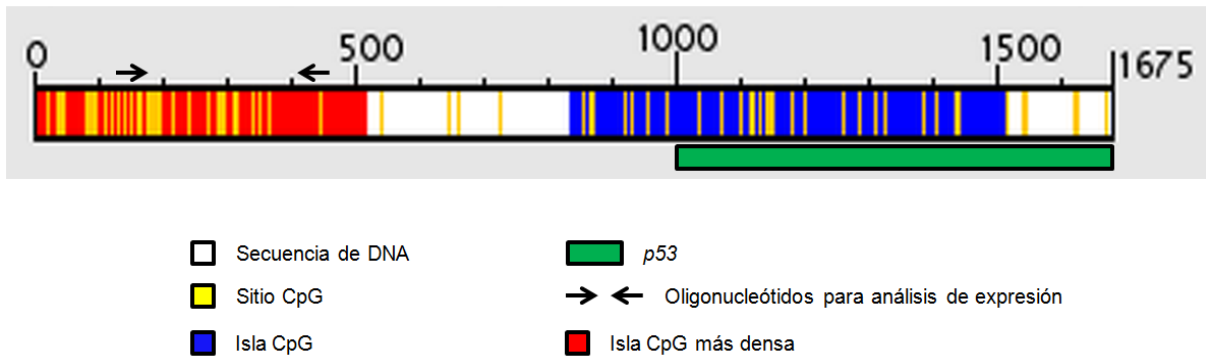
SUPLEMENTARIAS



Suplementaria 1. Control negativo de las inmunofluorescencias para estudiar la presencia y la localización de la proteína CTCF en el núcleo de células mamarias normales y cancerosas. Las imágenes se tomaron en dos condiciones, una normal y otra sobre-expuesta, para descartar la presencia de ruido de fondo (100 aumentos).



Suplementaria 2. Promotor del *miR125b-1*. Posición de los oligonucleótidos utilizados en las muestras de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar la unión de las proteínas CTCF y BORIS en la región promotora del *miR125b-1* por RT-PCR.



Suplementaria 3. Promotor de *p53*. Posición de los oligonucleótidos utilizados en las muestras de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar la unión de las proteínas CTCF y BORIS en la región promotora de *p53* por RT-PCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Artículos

- Amatya, V. J., Naumann, U., Weller, M., and Ohgaki, H. 2005. *TP53* promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathologica*, **110**: 178 – 184 p.
- Balmain, A., Gray B., and Ponder, B. 2003. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*, **33**: 238 – 244 p.
- Bartolomei, M. S., Zemel, S., and Tilghman, S. M. 1991. Parental imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature*, **351**: 153 – 155 p.
- Bell, A. C. and Felsenfeld, G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls the imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature*, **13**: 482 – 485 p.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, **16**: 6 – 21 p.
- Bourc'his, D., and Bestor, T. H. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking DNMT3L. *Nature*, **431**: 96 – 99 p.
- Bueno, M. J., Gómez de Cedrón, M., Gómez-López, G., Pérez de Castro, I., Di Lisio, L., Montes-Moreno, S., Martínez, N., Guerrero, M., Sánchez-Martínez, R., Santos, J., Pisano, D. G., Piris, M.A., Fernández-Piqueras, J., and Malumbres, M. 2011. Combinatorial effects of miRNAs to suppress the *Myc* oncogenic pathway. *Blood*, **117**: 6255 – 6266 p.
- Butcher, D. T., and Rodenhiser, D. I. 2007. Epigenetic inactivation of *BRCA1* is associated with aberrant expression of *CTCF* and DNA methyltransferase (*DNMT3B*) in some sporadic breast tumours. *European Journal of Cancer*, **43**: 210 – 219 p.
- Chávarri-Guerra, Y., Villareal-Garza, C., Liedke, P. E. R., Knaul, FI, Mohar, A., Finkelstein, D. M., and Goss, P. E. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system, **13**: e335 – e343 p.
- D'Arcy, V., Abdullaev, Z. K., Pore, N., Docquier, F., Torrano, V., Chernukhin, I., Smart, M., Farrar, D., Metodiev, M., Fernandez, N., Richard, C., Dolores Delgado, M., Lobanenkova, V., and Klenova, E. 2006. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, **12**: 5978 – 5986 p.

- D'Arcy, V., Pore, N., Docquier, F., Abdullaev, Z. K., Chernukhin, I., Kita, G. –X., Rai, S., Smart, M., Farrar, D., Pack, S., Lobanenkova, V., and Klenova, E. 2008. BORIS, a parologue of the transcription factor CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *British Journal of Cancer*, **98**: 571 – 579 p.
- DeChiara, T. M., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, **64**: 849 – 859 p.
- De la Rosa Velázquez, I. A., Rincón-Arango, H., Benítez-Bribiesca, L., and Recillas-Targa, F. 2007. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Research*, **67**: 2577 – 2585 p.
- Dindot, S. V., Farin, P. W., Farin, C. E., Romano, J., Walker, S., Long, C., and Piedrahita, J. A. 2004. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos Taurus* hybrid fetuses. *Biological Reproduction*, **71**: 470 – 478 p.
- Docquier, F., Farrar, D., D'Arcy, V., Chernukhin, I., Robinson, A. F., Loukinov, D., Vatolin, S., Pack, S., Mackay, A., Harris, R. A., Dorricott, H., O'Hare, M. J., Lobanenkova, V., and Klenova, E. 2005. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Research*, **65**: 5112 – 5122 p.
- Docquier, F., Kita, G. –X., Farrar, D., Jat, P., O'Hare, M., Chernukhin, I., Gretton, S., Mandal, A., Alldridge, L., and Klenova, E. 2009. Decreased poly(ADP-ribosyl)ation of CTCF, a transcription factor, is associated with breast cancer phenotype and cell proliferation. *Human Cancer Biology*, **15**: 5762 – 5771 p.
- Dougherty, C. J., Ichim, T. E., Liu, L., Reznik, G., Min, W. –P., Ghochikyan, A., Agadjanyan, M. G., and Reznik, B. N. 2008. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **370**: 109 – 112 p.
- Dupont, C., Armant, D. R., and Brenner, C. A. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*, **27**: 351 – 357 p.
- Engel, N., Thorvaldsen, J. L., and Bartolomei, M. S. 2006. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted *H19/Igf2* locus. *Human Molecular Genetics*, **15**: 2945 – 2954 p.
- Espinoza, C. A. and Ren, B. 2011. Mapping higher order structure of chromatin domains. *Nature Genetics*, **43**: 615 - 616 p.

- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, **7**: 21 – 33 p.
- Filippova, G. N., Lindblom, A., Meincke, L. J., Klenova, E. M., Neiman, P. E., Collins, S. J., Doggett, N. A., and Lobanenko, V. V. 1998. A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, **22**: 26 – 36 p.
- Filippova, G. N., Qi, C. F., Ulmer, J. E., Moore, J. M., Ward, M. D., Hu, Y. J., Loukinov, D. I., Pugacheva, E. M., Klenova, E. M., Grundy, P. E., Feinberg, A. P., Cleton-Jansen, A. M., Moerland, E. W., Cornelisse, C. H., Suzuki, H., Komiya, A., Lindblom, A., Dorion-Bonnet, F., Neiman, P. E., Morse 3rd, H. C., Collins, S. J., and Lobanenko, V. V. 2002. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alters its DNA-binding specificity. *Cancer Research*, **62**: 48 – 52 p.
- Furlan-Magaril, M., Rebollar, E., Guerrero, G., Fernández A., Moltó, E., González-Buendía, E., Cantero, M., Montoliu, L., and Recillas-Targa, F. 2010. An insulator embedded in the chicken α -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucleic Acids Research*, **39**: 89 – 103 p.
- Guan, Y., Yao, H., Zheng, Z., Qiu, G., and Sun, K. 2011. MiR-125b targets *BCL3* and suppresses ovarian cancer proliferation. *International Journal of Cancer*, **128**: 2274 – 2283 p.
- Han, L., Lee, D. H., and Szabo, P. E. 2008. CTCF is the master organizer of domain-wide allele-specific chromatin at the *H19-Igf2* imprinted region. *Molecular Cell Biology*, **28**: 1124 – 1135 p.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100**: 57 – 70 p.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**: 646 – 674 p.
- Handoko, L., Xu, H., Guoliang, L., Yee Ngan, C., Chew, E., Schnapp, M., Heng Lee, C. W., Ye, C., Hui Ping, J. L., Mulawadi, F., Wong, E., Sheng, J., Zhang, Y., Poh, T., Seng Chan, C., Kunarso, G., Shahab, A., Bourque, G., Cacheux-Rataboul, V., Sung, W. –K., Ruan, Y., and Wei, C. –L. 2011. CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nature Genetics*, **43**: 630 – 638 p.

- Hannafon, B. N., Sebastiani, P., de las Morenas, A., Lu, J., and Rosenberg, C. L. 2011. Expression of miRNAs and their gene targets are dysregulated in pre-invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*, **13**: R24.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., and Tilghman, S. M. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature*, **405**: 486 - 489 p.
- Heath, H., de Almeida, C. R., Sleutels, F., Dingjan, G., van de Nobelen, S., Jonkers, I., Ling, K. W., Gribnau, J., Renkawitz, R., Grosveld, F., Hendriks, R. W., and Galjart, N. 2008. CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. *The EMBO Journal*, **27**: 2839 – 2850 p.
- Heger, P., Marin, B., Bartkuhn, M., Schierenberg, E., and Wiehe, T. 2012. The chromatin insulator CTCF and the emergence of metazoan diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **43**: 17507 – 17512 p.
- Herman, J. G. and Baylin, S. B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, **349**: 2042 – 2054 p.
- Herold, M., Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. 2012. CTCF: insights into insulator function during development. *Development*, **139**: 1045 – 1057 p.
- Hines, W. C., Bazarov, A. V., Mukhopadhyay, R., and Yaswen, P. 2010. BORIS (*CTCF-L*) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. *PLoS One*, **5**: e9738.
- Hoffman, M. J., Müller, M., Engers, R., and Schulz, W. A. 2006 Epigenetic control of CTCF-L/BORIS and *OCT4* expression in urogenital malignancies. *Biochemical Pharmacology*, **72**: 1577 – 1588 p.
- Hong, J. A., Kang, Y., Abdullaev, Z., Flanagan, P. T., Pack, S. D., Fischette, M. R., Adnani, M. T., Loukinov, D. I., Vatolin, S., Risinger, J. I., Custer, M., Chen, G. A., Zhao, M., Nguyen, D. M., Barrett, J. C., Lobanenko, V. V., and Schrupp, D. S. 2005. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Research*, **65**: 7763 – 7774 p.
- Hoon Kim, T., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., Lobanenko, V. V., and Ren, B. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*, **128**: 1231 – 1245 p.

- Hore, T. A., Deakin, J. E., and Marshall Graves, J. A. 2008. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF-L in amniotes. *PLoS Genetics*, **29**: 1 - 11 p.
- Huang, L, Luo, J., Cai, Q., Pan, Q., Zeng, H., Guo, Z., Dong, W., Huang, J., and Lin, T. 2011. MicroRNA-125b1 suppresses the development of bladder cancer by targeting *EDF3*. *International Journal of Cancer*, **128**: 1758 – 1769 p.
- Illingworth, R. S. and Bird, A. P. 2009. CpG islands – “a rough guide”. *FEBS Letters*, **583**: 1713 – 1720 p.
- Issa, J. P. 2003. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phenotypes. *Clinical Cancer Research*, **9**: 2879 – 2881 p.
- Issa, J. P. 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **4**: 988 – 993 p.
- Jaenisch, R. and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, **33**(Suppl.): 245 – 254 p.
- Jelinic, P., Stehle, J. C., and Shaw, P. 2006. The testis-specific factor *CTCF-L* cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in *H19* imprinting control region methylation. *PLoS Biology*, **11**: e355.
- Jelinic, P. and Shaw, P. 2007. Loss of imprinting and cancer. *The Journal of Pathology*, **211**: 261 – 268 p.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, **3**: 2879 – 2881 p.
- Jones, T. A., Ogunkolade, B. W., Szary, J., Aarum, J., Mumin, M. A., Patel, S., Pieri, C. A., and Sheer, D. 2011. Widespread expression of BORIS/CTCF-L in normal and cancer cells. *PLoS One*, **6**: e22399.
- Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y., and Glass, C. K. 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, **90**: 430 – 440 p.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. 2004. Essential role for the *novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, **429**: 900 – 903 p.
- Kang, J. H., Kim, S. J., Noh, D. Y., Park, I. A., Choe, K. J., Yoo, O. J., and Kang, H. S. Methylation in the *p53* promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the *p53* promoter and the mutation of the *p53*

- gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology*, **81**: 573 – 580 p.
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. 2007. Role of the Dnmt3 family in *de novo* methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human Molecular Genetics*, **16**: 2272 – 2280 p.
- Klenova, E. M., Fagerlie, S., Filippova, G. N., Kretzner, L., Goodwin, G. H., Loring, G., Neiman, P. E., and Lobanenkova, V. V. 1998. Characterization of the chicken *CTCF* genomic locus, and initial study of the cell cycle-regulated promoter of the gene. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 26571 – 26579 p.
- Klenova, E. M., Morse 3rd, H. C., Ohlsson R., and Lobanenkova, V. V. 2002. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **12**: 399 – 414 p.
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., y Frenk, J. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública en México*, **51**, S335 – S344 p.
- Kondo, Y., Shen, L., Cheng, A. S., Ahmed, S., Bumber, Y., Charo, C., Yamochi, T., Urano, T., Furukawa, K., Kwabi-Addo, B., Gold, D. L., Sekido, Y., Huang, T. H., and Issa, J. P. 2008. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nature Genetics*, **40**: 741 – 750 p.
- Kornblihtt, A. R. 2012. CTCF: from insulators to alternative splicing regulation. *Cell Research*, **3**: 450 – 452 p.
- Kosaka-Suzuki, Suzuki, T., Pugacheva, E. M., Vostrov, A. A., Morse 3rd, H. C., Loukinov, D., Lobanenkova, V. 2011. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of the Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**: 27378 – 27388 p.
- Kurukuti, S., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenkova, V., Reik, W., and Ohlsson, R. 2006. CTCF binding at the *H19* imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer

- access to *Igf2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 10684 – 10689 p.
- Le, M. T., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., and Lim, B. 2009. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of *p53*. *Genes and Development*, **23**: 862 – 876 p.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, **8**: 166 – 186 p.
- Link, P. A., Zhang, W., Odunsi, K., and Karpf, A. R. 2013. *BORIS/CTCF* mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunity*, **13**.
- Liu, L. H., Li, H., Li, J. P., Zhong, H., Zhang, H. C., Chen, J., and Xiao, T. 2011. miR-125 suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of *STAT3*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **416**: 31 – 38 p.
- Lobanekov, V. V., Nicolas, R. H., Adler, V. V., Paterson, H., Klenova, E. M., Polotskaja, A. V., and Goodwin, G. H. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken *c-myc* gene. *Oncogene*, **5**: 1743 – 1753 p.
- Loukinov, D. I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S. D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A. A., Cui, H., Niemitz, E. L., Rasko, J. E., Docquier, F. M., Kistler, M., Breen, J. J., Zhuang, Z., Quitschke, W. W., Renkawitz, R., Klenova, E. M., Feinberg, A. P., Ohlsson, R., Morse 3rd, H. C., and Lobanekov, V. V. 2002. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 6806 – 6811 p.
- Martin-Kleiner, I. 2011. BORIS in Human Cancers: a Review. *European Journal of Cancer*, **48**: 929 – 935 p.
- McGarvey, K. M., Fahrner, J. A., Greene, E., Martens, J., Jenuwein, T., and Baylin, S. B. 2006. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Research*, **66**: 3541 – 3549 p.

- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Werning, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., and Lander, E. S. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, **454**: 766 – 770 p.
- Moon, H., Filippova, G., Loukinov, D., Pugacheva, E., Chen, Q., Smith, S. T., Munhall, A., Grewe, B., Bartkuhn, M., Arnold, R., Burke, L. J., Renkawitz-Pohl, R., Ohlsson, R., Zhou, J., Renkawitz, R., and Lobanenkova, V. 2005. CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Reports*, **2**: 165 – 170 p.
- Narod, S. A., y Rodríguez, A. A. 2011. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes *BRCA1* y *BRCA2*. *Salud Pública de México*, **53**: 420 – 429 p.
- Necochea-Champion, R. de., Ghochikyan, A., Josephs, S. F., Zacharias, S., Woods, Karimi-Busheri, F., Alexandrescu, D. T., Chen, C. –S., Agadjanyan, M. G., and Carrier, E. 2011. Expression of the epigenetic factor BORIS (*CTCF-L*) in the human genome. *Journal of Translational Medicine*, **9**: doi: 10.1186/1479-5876-9-213.
- Nguyen, P., Bar-Sela, G., Sun, L., Bisht, K. S., Cui, H., Kohn, E., Feinberg, A. P., and Gius, D. 2008. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, **28**: 6720 – 6729 p.
- Nguyen, P., Cui, H., Bisht, K. S., Sun, L., Patel, K., Lee, R. S., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A. P., and Gius, D. 2008. *CTCF-L/BORIS* is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal *H19* differentially methylated region. *Cancer Research*, **68**: 5546 – 5551 p.
- Nikolaev, L. G., Akopov, S. B., Didych, D. A., and Sverdlov, E. D. 2009. Vertebrate protein CTCF and its multiple roles in a large-scale regulation of genome activity. *Current Genomics*, **10**: 294 – 302 p.
- Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Maw, M. A., Smith, P. J., and Reeve, A. E. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, **362**: 749 – 751 p.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkova, V. 2001. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in Genetics*, **17**: 520 – 527 p.

- Ohlsson, R., Lobanenkov, V., Klenova, E. 2010. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *Bioessays*, **32**: 37 – 50 p.
- Pant, V., Mariano, P., Kanduri, C., Mattson, A., Lobanenkov, V., Heuchel, R., and Ohlsson, R. 2003. The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the *H19* imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes and Development*, **17**: 586 – 590 p.
- Pogribny, I. P., Pogribna, M., Christman, J. K., and James, S. J. 2000. Single-site methylation within the *p53* promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible *in vivo* relevance during tumorigenesis. *Cancer Research*, **60**: 588 – 594 p.
- Paradiso, A., and Formenti, S. 2011. Hereditary breast cancer: clinical features and risk reduction strategies. *Annals of Oncology*, **22**: i31 – i36 p.
- Phillips, J. E., and Corces, V. G. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, **137**: doi: 10.1016/j.cell.2009.06.001.
- Pugacheva, E. M., Kwon, Y. W., Hukriede, N. A., Pack, S., Flanagan, P. T., Ahn, J. C., Park, J. A., Choi, K. S., Kim, K. W., Loukinov, D., Dawid, I. B., and Lobanenkov, V. V. 2006. Cloning and characterization of zebrafish CTCF: developmental expression patterns, regulation of the promoter region, and evolutionary aspects of gene organization. *Gene*, **375**: 26 – 36 p.
- Pugacheva, E. M., Suzuki, T., Pack, S. D., Kosaka-Suzuki, N., Yoon, J., Vostrov, A. A., Barsov, E., Strunnikov, A. V., Morse 3rd, H. C., Loukinov, D., and Lobanenkov, V. 2010. The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. *PLoS One*, **5**: e13872.
- Rachmilewitz, J., Goshen, R., Ariel, I., Scheider, T., de Groot, N., and Hochberg, A. 1992. Parental imprinting of the human *H19* gene. *FEBS Letters*, **309**: 25 – 28 p.
- Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., and Feinberg, A. P. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, **362**: 747 – 749 p.
- Rakha, E. A., Pinder, S. E., Paish, C. E., and Ellis, I. O. 2004. Expression of the transcription factor CTCF in invasive breast cancer: a candidate gene located at 16q22.1. *British Journal of Cancer*, **91**: 5112 – 5122 p.

- Recillas-Targa, F., De la Rosa-Velázquez, I. A., Soto-Reyes, E., and Benítez-Bribiesca, L. 2006. Epigenetic boundaries of tumor suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **10**: 554 – 568 p.
- Recillas-Targa, F., de la Rosa-Velázquez, I. A., and Soto Reyes, E. 2011. Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF. *Biochemical Cell Biology*, **89**: 1 – 10 p.
- Renaud, S., Pugacheva, E. M., Dolores Delgado, M., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., Benhattar, J., and Lobanenkov, V. 2007. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Research*, **35**: 7372 – 7388 p.
- Risinger, J. I., Chandramouli, G. V., Maxeall, G. L., Custer, M., Pack, S., Loukinov, D., Aprelikova, O., Litzi, T., Schrupp, D. S., Murphy S. K., Berchuck, A., Lobanenkov, V., and Barrett, J. C. 2007. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clinical Cancer Research*, **13**: 1713 – 1719 p.
- Rosa-Garrido, M., Ceballos, L., Alonso-Lecue, P., Abaira, C., Delgado, M. D., and Gandarillas, A. 2012. A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS. *PLoS One*, **7**: e39371.
- Saldaña-Meyer, R., and Recillas Targa, F. 2011. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics*, **6**: 1068 – 1077 p.
- Schatten, G. P. 2008. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, London, 351 p.
- Schoenherr, C. J., Levorse, J. M., and Tilghman, S. M. 2003. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nature Genetics*, **33**: 66 – 69 p.
- Scott, G. K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C. E., Sullivan, C. S., and Benz, C. C. 2007. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**: 1479 – 1486 p.
- Sharma, S., Salehi, F., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Syro, L. V., and Kovacs, K. 2009. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Research*, **29**: 3759 – 3768 p.

- Shell, S., Park, S. M., Radjabi, A. R., Schickel, R., Kistner, E. O., Jewell, D. A., Feig, C., Lengyel, E., and Peter, M. E. 2007. *Let-7* expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 11400 – 11405 p.
- Sherr, C. 2004. Principles of tumor suppressor. *Cell*, **116**: 235 – 246 p.
- Shinagare, A. B., Giardino, A. A., Jagannathan, J. P., Van den Abebeele, A. D., and Ramaiya, N. H. 2011. Hereditary cancer syndromes: a radiologist's perspective. *American Journal of Roentgenology*, **197**: W1001 – 1007 p.
- Sidransky, D. 2002. Emerging molecular marks of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**: 210 – 219 p.
- Soo You, J., and Jones, P. A. 2012. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*, **22**: 9 – 20 p.
- Soto-Reyes, E., and Recillas-Targa, F. 2010. Epigenetic regulation of the human *p53* gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene*, **29**: 2217 – 2227 p.
- Soto-Reyes, E., González-Barrios, R., Cisneros-Soberanis, F., Herrera-Goepfert, R., Pérez, V., Cantú, D., Prada, D., Castro, C., Recillas-Targa, F., and Herrera, L. A. 2012. Disruption of CTCF at the *miR-125b1* locus in gynecological cancers. *BMC Cancer*, **12**: doi:10.1186/1471-2407-12-40.
- Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R. J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N., and de Laat, W. 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Development*, **20**: 2349 – 2354 p.
- Trainer, A. H., Thompson, E., and James, P. A. 2011. *BRCA* and beyond: a genome-first approach to familial breast cancer risk assessment. *Discovery Medicine*, **12**: 433 – 443 p.
- Tremblay, K. D., Duran, K. I., and Bartolomei, M. S. 1997. A 5' 2-kilobase- pair region of the imprinted mouse *H19* gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Molecular Cell Biology*, **17**: 4322 – 4329 p.
- van de Nobelen, S., Rosa-Garrido, M., Leers, J., Heath, H., Soochit, W., Joosen, L, Jonkers, I., Demmers, J., van der Reijden, M., Torrano, V., Grosveld, F., Delgado, M. D., Renkawitz, R., Galjart, N., and Sleutels, F. 2010. CTCF regulates the local epigenetic

- state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics and Chromatin*, **3**: doi:10.1186/1756-8935-3-19.
- van der Groep, P., van der Wall, E., and van Diest, P. J. 2011. Pathology of hereditary breast cancer. *Cellular Oncology*, **34**: 71 – 88 p.
- Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Flanagan, P. T., Custer, M., Loukinov, D. I., Pugacheva, E., Hong, J. A., Morse 3rd, H., Schrumps, D., S., Risinger, J. I., Barrett, J. C., and Lobanenko, V. V. 2005. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Research*, **65**: 7751 – 7762 p.
- Veeck, J. and Esteller, M. 2010. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **15**: 5 -17 p.
- Waddington, C. H. 1942. The Epigenotype. *Endeavour*, **1**: 18 – 20 p.
- Walerich, D., Napoli, M., Collavin, L., and Del Sal, G. 2012. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, **33**: 2007 – 2017 p.
- Wang, H., Maurano, M. T., Qu, H., Varley, K. E., Gertz, J., Pauli, F., Lee, K., Canfield, T., Waver, M., Sandstrom, R., Thurman, R. E., Kaul, R., Myers, R. M., and Stamatoyannopoulos, J. A. 2012. Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Research*, **22**: 1680 -1688 p.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Rebhan, M., and Schübeler, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, **39**: 457 – 466 p.
- Witcher, M., and Emerson, B. M. 2009. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Molecular Cell*, **34**: 271 – 284 p.
- Woloszynska-Read, A., James, S. R., Link, P. A., Yu, J., Odunsi, K., and Karpf, A. R. 2007. DNA methylation-dependent regulation of *BORIS/CTCF* expression in ovarian cancer. *Cancer Immunology*, **7**: 21 – 30 p.
- Wu, C. T., and Morris, J. R. 2001. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. *Science*, **293**: 1103 – 1105 p.
- Xiang-Quan, L., Yuan-Yuan, G., and Wei, D. 2012. DNA methylation and microRNAs in cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **18**: 882 – 888 p.

- Zhang, Y., Yan, L. X., Wu, Q. N., Du, Z. M., Chen, J., Liao, D. Z., Huang, M. Y., Hou, J. H., Wu, Q. L., Zeng, M. S., Huang, W. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y. 2011. miR-125b1 is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the *ETS1* proto-oncogen in human invasive breast cancer. *Cancer Research*, **71**: 3552 – 3562 p.
- Zlatanova, J. and Caiafa, P. 2009. CTCF and its protein partners: divide and rule? *Journal of Cell Science*, **122**: 1275 – 1284 p.
- Ziv, E. 2011. Genetics of breast cancer: applications to the Mexican population. *Salud Pública en México*, **53**: 415 – 419 p.

2. Libros

- AEP: Asociación Española de Pediatría. 2008. *Manual de Lactancia Materna: de la Teoría a la Práctica*. Tomo I. Editorial Médica Panamericana, España, 56 - 58 p.
- Baggish, M., and Karram, M. Atlas de Anatomía de la Pelvis y Cirugía Ginecológica. 2006. Editorial Médica Panamericana, España, 1105 – 1108 p.
- Bland, I. K., Copeland III, E. M. 2004. *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 3° edición. Tomo I. Editorial Médica Panamericana, España, 24 – 26, 455 - 463 p.
- Bunz, F. 2008. Principles of Cancer Genetics. Springer, New York, 1 p.
- Chung, D. C., and Haber, D. A. 2010. Principles of Clinical Cancer Genetics: a Handbook from the Massachusetts General Hospital. Springer, New York, 1 p.
- DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. 2000. *Cancer: principles & practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 8 – 11, 165, 173, 185, 193, 201, 1420 p.
- Díaz Rubio, E., y García Conde, J. *Oncología Clínica Básica*. Arán Ediciones, Madrid, 373 p.
- Koolman, J. and Röhm, K, –H. 2004. Bioquímica: Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana, España, 398 p.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., and Darnell, J. 2006. España, Editorial Médica Panamericana, 946 p.
- Passarge, E. 2007. *Color Atlas of Genetics*. Thieme, New York, 218 p.
- Peacock, J. 2002. *Breast Cancer: Perspectives on Disease and Illness*. Capstone Press, Minnesota, 14 p.
- Ruddon, R. W. 2007. *Cancer Biology*. Oxford University Press, New York, 4 p.

- Sierra García, A., Piñero Madrona, A., Illana Moreno, J. 2006. *Cirugía de la Mama: Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos*. Arán Ediciones, Madrid, 214 - 217 p.
- Tollesbol, T. O. 2011. *Handbook of Epigenetics: the New Molecular and Medical Genetics*. Academic Press, Chennai, 221 p.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 2002. *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw Hill, New York, 5 p.
- Waddington, C. H. 1968. *Towards a Theoretical Biology*. Edinburgh University Press, Scotland, 1 - 32 p.
- Welsch, U., Sobotta, J. 2009. *Histología*. Editorial Médica Panamericana, España, 537 – 547 p.

3. Páginas web

- Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). 2012. Cáncer familiar: el cáncer familiar y hereditario. < <http://www.cnio.es/es/programas/prog504a1.asp>> Consultado el 28 de octubre de 2012.
- GLOBOCAN, 2008. Mexico: most frequent cancers (women). <<http://globcan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484#WOMEN>> Consultado el 16 de enero de 2013.
- Imaginis. 2012. Histologic grades of breast cancer: helping determine a patient's outcome. <<http://www.imaginis.com/breast-cancer-diagnosis/histologic-grades-of-breast-cancer-helping-determine-a-patient-s-outcome-2>> Consultado el 30 de octubre de 2012.
- Instituto Nacional del Cáncer. 2012. Estadificación del cáncer. <<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/estadificacion>> Consultado el 1 de noviembre de 2012.
- Instituto Nacional del Cáncer. 2012. ¿Qué es el cáncer? <<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>> Consultado el 12 de abril de 2012.
- Knaul, F. M., Arreola-Ornelas, H., Lozano, R., Gómez Dantés H. 2011. México: numeralia del cáncer de mama. < <http://www.uv.mx/noticias/cancerdemama.pdf>> Consultado el 28 de octubre de 2012.

- National Cancer Institute, 2012. What is cancer? <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>> Consultado el 15 de octubre de 2012.
- Organización Mundial de la Salud. 2008. Cáncer de mama: prevención y control. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>> Consultado el 28 de octubre de 2012.
- Pérez Sánchez, V. M., Vela Chávez, T. A., Mora Tiscareño, A. 2008. Diagnóstico histopatológico y factores pronóstico en cáncer infiltrante de glándula mamaria. <<http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1215565831.pdf>> Consultado el 30 de octubre de 2012.
- The Permanente Medical Group. Regional Health Education. 2006. ¿Qué son los cánceres ginecológicos? <<http://www.permanente.net/homepage/kaiser/pdf/6269.pdf>> Consultado el 9 de abril de 2012.