



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CAMBIOS EN LOS ESTADOS DE METILACIÓN Y  
EXPRESIÓN DEL GEN *CHMP4Bp1* EN UN MODELO DE  
CÁNCER DE PÁNCREAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRO AGUILAR ARISTA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

1. Datos del alumno

Aguilar  
Arista  
Alejandro  
55 24 36 10  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310006785

2. Datos del tutor

Dra  
Magali  
Espinosa  
Castilla

3. Datos del sinodal 1

Dr  
Inti Alberto  
De la Rosa  
Velázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra  
María de Lourdes  
Segura  
Valdez

5. Datos del sinodal 3

Dr  
Julio Isael  
Pérez  
Carreón

6. Datos del sinodal 4

Dra  
Erika Patricia  
Rendón  
Huerta

7. Datos del trabajo escrito

Cambios en los estados de metilación y expresión del gen *CHMP4Bp1* en un modelo de cáncer de páncreas.  
69 p  
2019



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del  
Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la Dra.  
Magali Espinosa Castilla.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formarme académicamente, es un orgullo haber pertenecido a esta maravillosa universidad.

A la Facultad de Ciencias por enseñarme que cada obstáculo, se puede convertir en un reto y finalmente en un éxito.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica, por la preparación práctica y las facilidades que me proporcionaron para realizar este trabajo.

A mi tutora, la Dra. Magali Espinosa por toda su paciencia, enseñanzas, apoyo y comprensión que han sido muy importantes en mi formación académica y profesional. Estoy muy agradecido por la excelente persona que es.

Al Dr. Jorge Meléndez por brindarme la oportunidad y confianza de pertenecer a su grupo de trabajo y por su apoyo brindado durante mi estancia.

A la Dra. Ela Alcántara y la Dra. Gisela Ceballos, por su apoyo emocional y profesional brindado durante mi estancia en el laboratorio, los cuales enriquecieron mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, que me apoyaron y acompañaron cuando más lo necesite. De manera especial a Libertad, Ixchel, M. C. Alejandra y M. C. Benjamín.

A mi comité, por el tiempo brindado en la revisión del presente trabajo.

## **Dedicatoria**

A mis padres, por apoyarme siempre, por estar ahí en todo momento, no hay palabras que puedan describir la admiración, el agradecimiento y el cariño que siento hacia ustedes. Este logro es para nosotros y estoy seguro vendrán muchos más. Los quiero mucho.

A mis amigos(as) que son como mi familia, siempre me apoyaron y estuvieron en las buenas y en las malas. De manera especial a Victor Hugo, Karla María, Irving, Citlali, Cecilia, Alejandra Dagmara, María Fernanda, Luis Antonio, Montserrath, José Luis, Ariadna, Karen, Diana Elisa, Jonatan Alexis y Braulio. Es el final de una aventura, pero estoy seguro vendrán muchas más.

A mis profesores que me alentaron y apoyaron a perseguir mi sueño, que me inspiraron para cada día a ser mejor, de manera especial a los Dres. Valeria, María del Carmen, Sara, Bertha, Ernesto, Rodrigo, Valentina, Víctor, Marta Juana, Marisol, Rosa, Josué y M C. Octavio.

# Índice

<b>Glosario.....</b>	<b>3</b>
<b>I. Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Introducción.....</b>	<b>6</b>
1. Cáncer.....	6
1.1. Desarrollo tumoral.....	7
1.2. Epidemiología del cáncer.....	8
2. Cáncer de Páncreas.....	9
2.1. Epidemiología y factores de riesgo.....	9
2.2. Biología molecular del cáncer de páncreas.....	10
3. Regiones promotoras.....	11
4. Regiones potenciadoras.....	12
5. Metilación del DNA.....	13
5.1. Islas CpGs.....	14
5.2. Mecanismos de regulación de la metilación del DNA.....	16
5.3. La metilación del DNA como marca epigenética de represión.....	17
5.4. Metilación del DNA en cáncer.....	18
5.5. Metilación del DNA en cáncer de páncreas.....	20
6. Pseudogenes.....	22
7. Familia <i>CHM4B</i> .....	23
7.1 <i>CHMP4Bp1</i> .....	24
8. Esferoides.....	25
8.1. Esferoides Multicelulares Tumorales.....	26
<b>III. Antecedentes.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. Justificación.....</b>	<b>30</b>
<b>V. Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>VI. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
1. Objetivo general.....	32
2. Objetivos particulares.....	32
<b>VII. Métodos.....</b>	<b>33</b>
1. Líneas celulares.....	33
2. Cultivo celular.....	33
3. Cultivo de esferoides multicelulares agregados.....	33

4. Extracción de RNA.....	34
5. Síntesis de DNA complementario.....	34
6. PCR semi-cuantitativa.....	35
7. PCR en tiempo real.....	36
8. Extracción de DNA.....	36
9. Conversión por Bisulfito de Sodio.....	36
10. PCR-stepdown de DNA tratado con Bisulfito de Sodio.....	37
10.1 Enriquecimiento de la muestra.....	38
11. PCR de DNA genómico.....	39
12. Clonación.....	39
11.1 PTZ57R/T.....	39
11.2 Reacción de ligación.....	40
11.3 Transformación .....	40
13. Extracción de plásmido por Miniprep.....	41
14. Secuenciación Sanger.....	41
15. Análisis bioinformático.....	41
16. Análisis estadísticos.....	42
<b>VIII. Resultados.....</b>	<b>43</b>
1. Cultivo de esferoides.....	43
2. Estandarización de los oligos para la amplificación por PCR.....	44
3. Expresión del pseudogen <i>CHMP4Bp1</i> .....	45
4. Conversión por Bisulfito de sodio.....	48
5. Estandarización de la PCR-Stepdown para la amplificación de DNA tratado con bisulfito de sodio.....	49
6. Análisis bioinformático de la región secuenciada .....	50
7. Cambios en los estados de metilación de la región genómica cercana al pseudogen <i>CHMP4Bp1</i> .....	51
<b>IX. Discusión de resultados.....</b>	<b>55</b>
<b>X. Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>XI. Perspectivas.....</b>	<b>62</b>
<b>XII. Referencias.....</b>	<b>63</b>



## Glosario

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
gDNA	DNA genómico
-CH <sub>3</sub>	Grupo metilo
5mC	5-metil-citosina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
CpG	Citosina y Guanina enlazados por un grupo fosfato
CGs	Citosinas y/o Guaninas
CGI	Islas CpGs
TSS	Sitio de Inicio de la Transcripción
pb	pares de bases
miRNA	micro-RNA
CHMP	Proteína de Carga de Cuerpo Multivesicular
<i>CHMP4B</i>	<i>CHMP</i> familia 4 isoforma B
<i>CHMP4Bp1</i>	Pseudogen 1 de <i>CHMP4B</i>
mm	milímetros
cDNA	DNA complementario
RPM	Revoluciones por minuto
µg	microgramos
seg	segundos
min	minutos
mM	milimolar
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Transcripción reversa– Reacción en cadena de la polimerasa

## I. Resumen

El cáncer es una agrupación de más de 100 enfermedades diferentes, cada una con sus propios factores de riesgo y epidemiología. Los diferentes tipos de cáncer, se originan a partir de células con una división celular descontrolada, estas células tienen la capacidad de invadir tejidos normales y esparcirse a lugares diferentes al de su origen. El cáncer de páncreas es el tipo de cáncer con la menor sobrevida, cerca del 95% de los pacientes fallecen en los 5 años posteriores al diagnóstico.

La metilación del DNA participa en los procesos involucrados en la salud y en la enfermedad, por esa razón no es de sorprender que en el cáncer existan cambios en los patrones de metilación. En múltiples estudios realizados de manera específica o general, se ha encontrado que los patrones de metilación en diferentes tipos de cáncer se encuentran alterados.

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el genoma del cáncer de páncreas, con el objetivo de caracterizar e identificar los subtipos que puedan existir, así como encontrar posibles marcadores de prognosis y blancos terapéuticos. El análisis del genoma del cáncer de páncreas, ha permitido la identificación de diferentes elementos génicos, tales como RNA no codificantes, cambios en los patrones de metilación o mutaciones que pueden jugar un papel en el desarrollo y progresión de este tipo de cáncer. En nuestro laboratorio se realizó un microarreglo de metilación del DNA de las líneas celulares de cáncer de páncreas, con el fin de observar si existían cambios en los patrones de metilación cuando las células fueran cultivadas en esferoide.

Los resultados mostraron modificaciones en sitios metilados en diferentes regiones génicas. Una región que cambió cuando las células fueron cultivadas en esferoide y no se encuentra reportada, es la región cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*. Los análisis de secuenciación del RNA reportan que este transcrito se encuentra expresado en diferentes tejidos; sin embargo, no hay reportes de la

presencia de la proteína de este pseudogen, ni de su participación en alguna enfermedad.

En este estudio se evaluaron los cambios en los estados de metilación de la región génica cercana a *CHMP4Bp1* y la relación con su expresión. Para realizar este trabajo se utilizó como modelo experimental las líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1, cultivadas en monocapa y en esferoide. Para determinar la expresión de *CHMP4Bp1*, se utilizó la técnica de RT-PCR y qPCR; y para determinar los cambios en los patrones de metilación se utilizó la técnica de secuenciación por Bisulfito de Sodio.

El análisis mostró que existe una tendencia a la pérdida de metilación en una CpG de la región genómica cercana a *CHMP4Bp1* cuando las células son cultivadas en esferoide. Esta región genómica de acuerdo con los análisis bioinformáticos puede ser un posible potenciador. También se observó un aumento en la expresión del mRNA del pseudogen *CHMP4Bp1*. Por lo tanto, podemos concluir que la disminución en la metilación del potenciador cercano a *CHMP4Bp1*, puede estar afectando la expresión del mRNA de este pseudogen, cuando las células son cultivadas en esferoide.

## II. Introducción

### 1. Cáncer

El cáncer es una agrupación de más de 100 enfermedades diferentes, cada una con sus propios factores de riesgo y epidemiología. Los diferentes tipos de cáncer, se originan a partir de células con una división celular descontrolada, algunas de estas células tienen la capacidad de invadir tejidos normales y esparcirse a lugares diferentes al de su origen (Stratton, *et al*, 2009).

En la literatura, se proponen ciertas características biológicas (Fig. 1), que de manera general, comparten todos los tipos de cáncer en algún momento de su desarrollo. Estas características le confieren a las células cancerosas ventajas adaptativas, que les permiten a las células evadir los mecanismos regulatorios del organismo, hasta alcanzar un grado tumorigénico y finalmente maligno (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 1. *Características biológicas del cáncer*. Esta imagen ilustra las características que adquieren las células cancerígenas a nivel celular y molecular durante el proceso carcinogénico; y definen al grupo de enfermedades conocidas como cáncer (Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

Las características del cáncer le confieren a las células cancerosas ventajas adaptativas como: la generación de señales de proliferación y crecimiento, evasión de señales de arresto del ciclo celular y apoptosis (muerte celular programada), evasión del sistema inmune, generación de respuesta inflamatoria, modificación del metabolismo, invasión y metástasis (migración de células a un tejido diferente al de su origen), angiogénesis (formación de nuevo tejido vascular) e inestabilidad genómica y alta tasa de mutación (Hanahan y Weinberg, 2011).

En las últimas décadas, ha existido un gran esfuerzo por entender los eventos moleculares que dan origen al cáncer; gracias al desarrollo de nuevas tecnologías y métodos computacionales, se ha determinado que múltiples cambios en el genoma y epigenoma son factores importantes en la iniciación y progresión del cáncer, así como en la formación de tumores (Chakravarthi, *et al*, 2016).

### **1.1 Desarrollo tumoral**

El desarrollo del cáncer inicia con la acumulación gradual de cambios genéticos y epigenéticos en una célula que promueven la carcinogénesis. Los genes afectados (oncogenes y genes supresores de tumores), alteran su función de tal manera que contribuyen a la inducción de alguna de las características biológicas del cáncer. La célula transformada y la clona proliferaran de manera anormal pero pareciendo morfológicamente normal, a esta condición se le conoce como hiperplasia (Umar, *et al*, 2012; Weinberg, 1996).

Posteriormente, las células continuarán proliferando y acumularán daños en el genoma y epigenoma, esto resulta en células con forma anormal, a este proceso se le conoce como displasia. Las células displásicas empezarán a crecer y su apariencia se volverá más anormal dando lugar a una neoplasia, si el tumor no ha roto los límites de los tejidos adyacentes se le conoce como carcinoma *in situ* (Umar, *et al*, 2012; Weinberg, 1996).

Finalmente, si los cambios genéticos y epigenéticos lo permiten, el tumor empezará a invadir el tejido adyacente e ingresará al torrente sanguíneo; las células que logran escapar tienen la capacidad de establecer nuevos tumores en otras partes de cuerpo, es decir, han adquirido la capacidad de volverse malignas y generar metástasis (Fig. 2) (Umar, *et al*, 2012; Weinberg, 1996).

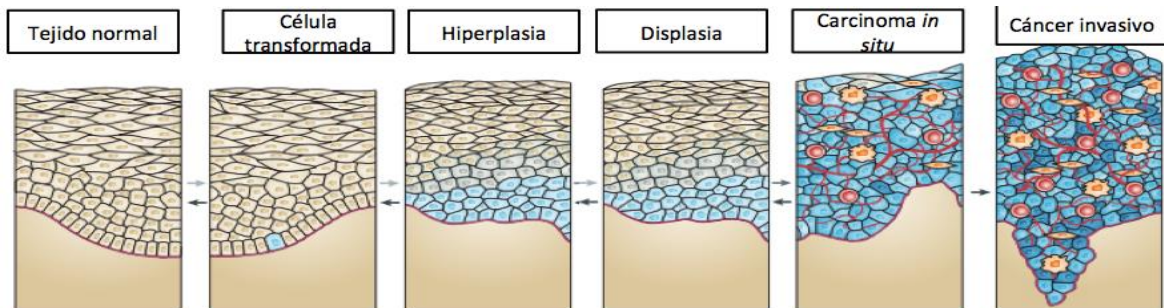


Figura 2. *Modelo de progresión tumoral.* La acumulación de mutaciones en una célula transformada, dará origen a un crecimiento celular descontrolado, hasta generar un carcinoma *in situ*; posteriormente, el tumor será capaz de invadir tejidos adyacentes y migrar a otras partes del cuerpo (metástasis) (modificado de Umar, *et al*, 2012).

## 1.2 Epidemiología del Cáncer

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en el año 2018, registró cerca de 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y una mortalidad de 9.6 millones a nivel mundial, siendo la primera causa de muerte a nivel mundial (Bray, *et al*, 2018).

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 160 mil casos nuevos y genera casi 80 mil muertes en la población mexicana. El 70% de los casos son detectados en etapas tardías de la enfermedad, esto complica el tratamiento y afecta la supervivencia de los pacientes (Secretaría de Salud, 2016). Los tipos de cáncer con mayor mortalidad en México son: colorrectal, próstata, mama, hígado, pulmón, estómago, páncreas, leucemia, cervicouterino y ovario (Bray, *et al*, 2018).

## **2. Cáncer de páncreas**

La supervivencia a 5 años de los pacientes detectados con cáncer de páncreas es menor al 5%. El tipo más común de cáncer de páncreas (cerca del 90% de los casos), se deriva de las células exocrinas del páncreas y se le conoce como adenocarcinoma ductal de páncreas (Falasca, *et al*, 2016).

La alta mortalidad del cáncer de páncreas, se debe al diagnóstico tardío de la enfermedad y a que la mayoría de los pacientes no presentan síntomas de la enfermedad sino hasta etapas avanzadas. La biología tumoral de este tipo de cáncer, también contribuye a la alta resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Kamisawa, *et al*, 2016).

### **2.1 Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de páncreas**

La IARC en el 2012 registró 337 mil casos nuevos de cáncer de páncreas y 330 mil muertes por esta enfermedad a nivel mundial. En México en el mismo año, se reportaron cerca de 4 849 casos nuevos de cáncer de páncreas y 4 445 muertes por este tipo de cáncer (Bray, *et al*, 2012). En países desarrollados como Estados Unidos de América se estima que para el año 2030, el cáncer de páncreas será la segunda causa de muerte (Rahib, *et al*, 2014).

Los factores de riesgo extrínsecos en este tipo de enfermedad son: la edad, en donde el 90% de los pacientes son mayores a 50 años; el género, los hombres son más propensos que las mujeres; enfermedades, como la pancreatitis crónica, diabetes (tipo I y II), la tolerancia anormal a la glucosa y la obesidad; así como el consumo de tabaco (Pandolfi, *et al*, 2012). En cuanto a los factores de riesgo intrínsecos, las mutaciones y los cambios epigenéticos en la línea germinal y somática pueden inducir la aparición de cáncer de páncreas (Hong, *et al*, 2011).

## 2.2 Biología molecular del cáncer de páncreas

En las últimas décadas, se han realizado diversas investigaciones sobre los aspectos moleculares del adenocarcinoma de páncreas. Actualmente se conocen ciertas mutaciones que activan o inactivan diferentes genes en el adenocarcinoma de páncreas y lo diferencian de otros tipos de cáncer (Maitra y Hruban, 2008). En la Fig. 3, se observan los genes mutados más comunes, así como su importancia en la progresión de este tipo de cáncer.

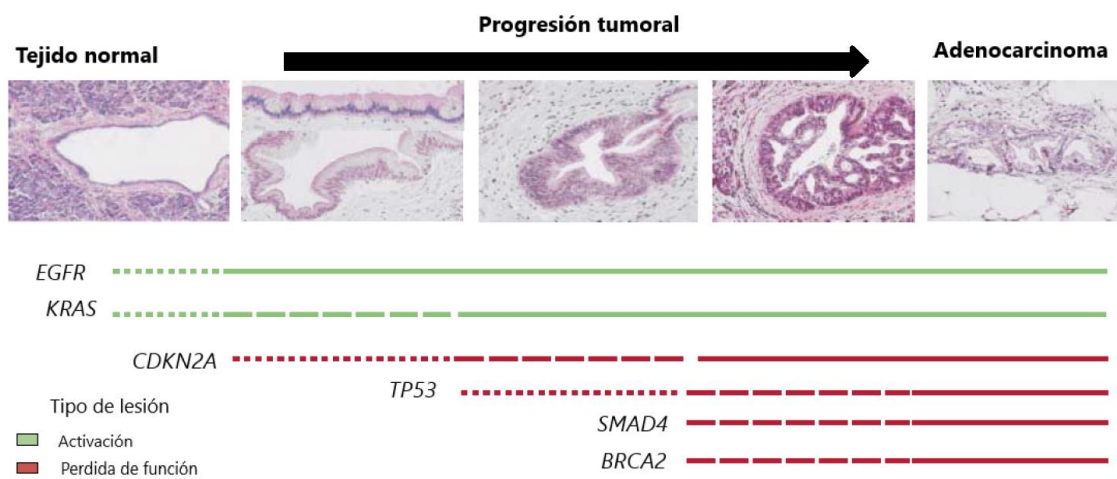


Figura 3. *Modelo de progresión genética de adenocarcinoma de páncreas*. En donde se observa como la acumulación de ciertas mutaciones (oncogenes y genes supresores de tumores) inicia el proceso de carcinogénesis en este órgano (modificado de Bardeesy y DePinho, 2002).

Las mutaciones activadoras en el oncogén *KRAS2*, son la mutación más común en el cáncer de páncreas, esta mutación se encuentra presente entre un 90 a 95% de los casos y generalmente ocurre en lesiones precursoras. La vía de *KRAS2* se encuentra involucrada en funciones como proliferación celular, supervivencia, remodelación del citoesqueleto y motilidad celular (Maitra y Hruban, 2008).

La vía *KRAS* contribuye a la estimulación autocrina del factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés) y resulta en la estimulación de la cinasa 3 de fosfatidilinositol (vía de PI3K). La estimulación autocrina en el cáncer de páncreas tiene como consecuencia la sobreexpresión de ligandos de la familia de EGF (como son TGF- $\alpha$ ) y receptores (como EGFR) (Bardeesy y DePinho, 2002).



Por otro lado, existen mutaciones de pérdida de función en el gen *CDKN2A* (p16), también conocido como *INK4A*, el cual se encuentra mutado en el 90% de los tipos de cáncer de páncreas. Las mutaciones en este gen se encuentran generalmente en lesiones precursoras. El producto de *CDKN2A* se encuentra involucrado en el control del ciclo celular y su inactivación favorece un crecimiento descontrolado en las células (Maitra y Hruban, 2008).

Otros genes inactivados en el cáncer de páncreas son: *Tp53* (70% de los casos), el cual se encuentra involucrado en la regulación del ciclo celular y apoptosis; y *SMAD4* (50% de los casos), involucrado en la vía de *TGF-β*, esta vía regula la progresión celular y apoptosis. La pérdida de función de estos genes ocurre en etapas tardías del cáncer de páncreas (Maitra y Hruban, 2008; Kamisawa, 2016).

Las mutaciones en línea germinal que inactivan al gen *BRCA2* causan un incremento en el riesgo de cáncer de páncreas (cerca del 10% de los casos). La función de *BRCA2* es reparar los daños en los entrecruzamientos de hebras del DNA y daños de doble cadena. La mutación en este gen hace hipersensibles al DNA a agentes intercalantes como mitomicina-C, cisplatino e inhibidores de la polimerasa (Hong, *et al*, 2011).

### **3. Regiones promotoras**

Un promotor es una región genómica que conduce a la transcripción autónoma de un gen. Los promotores se caracterizan por tener secuencias específicas, que permiten el ensamble de la maquinaria de traducción. También poseen marcas epigenéticas características que determinan las propiedades de la cromatina cercana al promotor. En los mamíferos, muchos de los promotores se encuentran asociados a regiones ricas en CGs (Haberle y Stark, 2018).

Las marcas epigenéticas asociadas a los promotores activos son: modificaciones postraduccionales de histonas (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 y H3k27ac) o variantes de histonas (H2A.Z y H3.3); mientras que las marcas epigenéticas asociadas a los promotores inactivos son: modificaciones postraduccionales de histonas (H3K27me3) o metilación del DNA (Haberle y Stark, 2018; Lenhard, *et al* 2012).

#### **4. Regiones potenciadoras**

Los potenciadores (del inglés, *enhancers*) son secuencias de DNA regulatorias que controlan la expresión temporal y tejido-específica de los genes. Estos elementos regulatorios actúan independientemente de su orientación y su distancia relativa a los promotores de los genes blanco (Erokin, *et al*, 2015).

En los tejidos, los potenciadores activos se unen mediante la activación de los factores de transcripción y se acercan a sus respectivos promotores blanco mediante la formación de un bucle de DNA, que se cree que está estabilizado por la cohesina y otros complejos de proteínas (Shyueva, *et al*, 2014).

El bucle de DNA se forma a partir del complejo del potenciador, mediante el reclutamiento de los factores pioneros. Estos factores controlan la accesibilidad a los potenciadores mediante el desplazamiento de los nucleosomas, la apertura de la cromatina y la desmetilación del DNA. Posteriormente, se reclutan factores de transcripción y co-activadores, lo que forma el complejo del potenciador. Estos activadores pueden mediar los contactos entre los potenciadores y los factores de transcripción en los promotores y/o funcionar como remodeladores de la cromatina (Fig. 4) (Erokin, *et al*, 2015; Shyueva, *et al*, 2014).

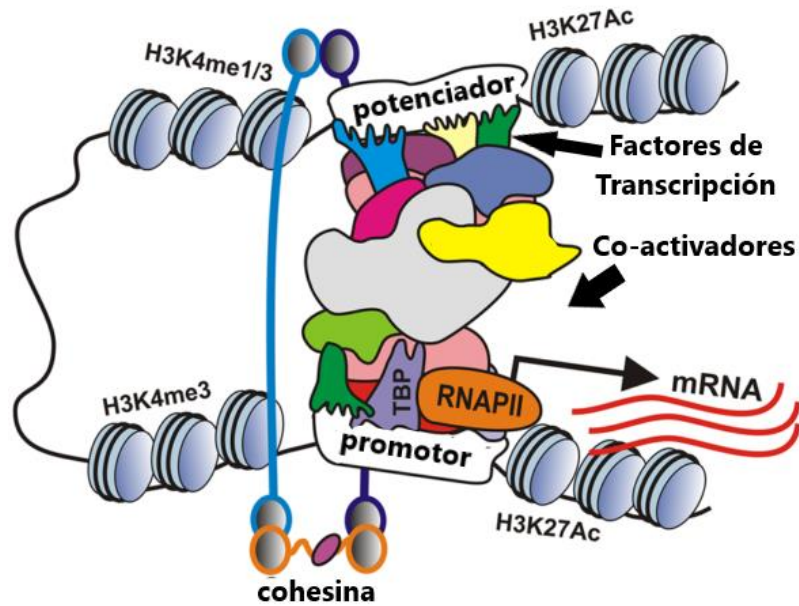


Figura 4. Potenciador formando un bucle de DNA para activar a su gen blanco. La formación del bucle de DNA, permite que el potenciador interaccione de manera directa con el promotor e induzca la transcripción del gen blanco (Imagen modificada de Erokin, *et al*, 2015).

Los potenciadores poseen algunas características epigenéticas que los definen, como son: modificaciones de histonas (H3K4me1 y H3K27ac), variantes de histonas (H2AZ y H3.3) y sitios de cromatina abierta (como sitios de hipersensibilidad a DNasa 1) (Ding, *et al*, 2018).

## 5. Metilación del DNA

Los cambios epigenéticos son todos aquellos cambios heredables que afectan la expresión de genes, sin alterar la secuencia del DNA. Las modificaciones epigenéticas afectan la expresión, porque generan cambios en los estados de la cromatina (eucromatina y heterocromatina). Los mecanismos epigenéticos descritos actualmente son: metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, variantes de histonas, RNA no codificantes (ncRNA, por sus siglas en inglés) y remodeladores de la cromatina (Allis y Jenuwein, 2016).

La metilación del DNA consiste en la unión covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al carbono 5' de la citosina, dando como resultado a la 5-metilcitosina (5mC) (Fig. 5). La mayoría de la metilación del DNA en células somáticas de eucariontes ocurre principalmente en dinucleótidos con contexto CpG (Smith y Meissener, 2013; Meng, *et al*, 2015).

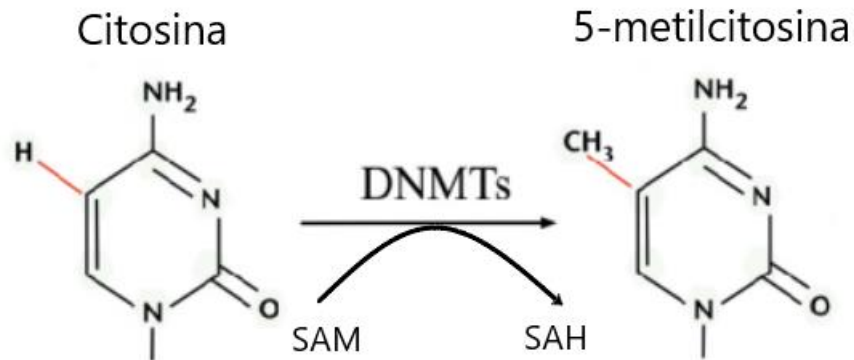


Figura 5. *Metilación del DNA*. Adición del grupo metilo al carbono 5 de la citosina y formando a la 5mC. En la reacción catalizada por las DNMTs el donador de grupos metilo es el S-adenosin metionina (SAM) (modificado de Meng, *et al*, 2015).

## 5.1 Islas CpGs

Para entender la función de la metilación del DNA, es necesario entender la distribución de los dinucleótidos CpG en el genoma (Jones, 2012). Los genomas de mamíferos carecen de dinucleótidos CpGs y de los que existen, de un 60-80% se encuentran altamente metilados; menos del 10% de las CpGs se encuentran en regiones densas en CGs (Smith y Meissener, 2013).

Los dinucleótidos CpGs que se encuentran en secuencias satélite y elementos repetitivos (centrómeros) (Fig. 6) (Meng, *et al*, 2015), se encuentran altamente metilados y son importantes para la estabilidad de los cromosomas (principalmente durante la segregación de los cromosomas en la mitosis). También es probable que supriman la expresión de elementos transponibles en el genoma en las regiones repetidas (Jones, 2012).

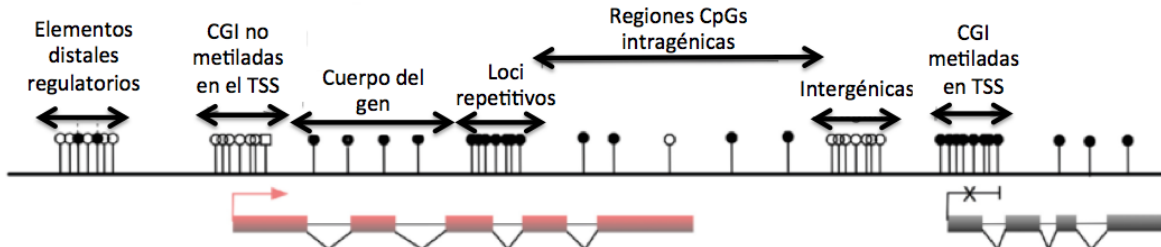


Figura 6. *Distribución de dinucleótidos CpG en genomas de mamíferos*. Los dinucleótidos CpG del genoma generalmente se encuentran metilados. Las CGIs asociadas a los promotores en los TSS de los genes generalmente están desmetiladas; la metilación en estas CGIs se asocia con el silenciamiento a largo plazo del gen. Las CGIs huérfanas, sirven como promotores para genes y se pueden encontrar de manera intergénica o intragénica; y la metilación en el cuerpo del gen se asocia con la transcripción. Por otro lado, la metilación en las regiones repetidas (centrómeros o secuencias satélite) ayuda a preservar la estructura del genoma. Los círculos blancos indican CpGs no metiladas; los círculos negros CpGs metiladas; las cajas rojas indican exones transcripcionalmente activos, mientras que las cajas negras indican exones transcripcionalmente inactivos (Imagen modificada de: Meng, *et al*, 2016).

Las regiones con una alta composición en CGs y donde es más probable encontrar dinucleótidos CpGs, se les conoce como islas CpGs (CGIs, por sus siglas en inglés). Las CGIs tienen un tamaño de aproximadamente 1000 pb y por lo general no están metiladas. En mamíferos las CGIs se encuentran asociadas a casi el 70% de los promotores de genes constitutivos, tejido-específico y relacionados con el desarrollo (Deaton y Bird, 2011).

Las CGIs asociadas a promotores de los genes, se encuentran generalmente cercanas a sitios de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) (Deaton y Bird, 2011). La metilación en este tipo de CGIs, se encuentra asociada al silenciamiento a largo plazo (Fig. 6); algunos ejemplos de genes metilados en el promotor son: genes localizados en el cromosoma-X inactivo y genes expresados en células germinales y embrionarias (Jones, 2012).

El resto de las CGIs, se encuentran localizadas entre los cuerpos de los genes (intragénicas) o en regiones entre genes (intergénicas) (Fig. 6); a este tipo se les conoce como “CGIs huérfanas” y generalmente están metiladas (más comúnmente en exones que en intrones) (Meng, *et al*, 2015). La metilación del

DNA en estas CGIs se encuentra asociada a la transcripción y elongación del gen, y es específica en genes tejido-específico y de desarrollo (Jones, 2012).

Las CGIs huérfanas actúan como promotores distales y la metilación del DNA, en estos casos favorecen la transcripción. Los análisis del genoma y del transcriptoma han confirmado que el inicio de transcritos está dentro de las CGIs huérfanas. Además estas regiones se encuentran marcadas con la H3K4me3, la cual es una marca de promotores activos (Deaton y Bird, 2011).

## **5.2 Mecanismos de regulación de la metilación de DNA**

Los mecanismos epigenéticos, se encuentran regulados por enzimas y proteínas diferentes, algunas son capaces de establecer la marca epigenética, llamadas escritores (*writers*); otras proteínas, son capaces de reconocer la marca epigenética y remodelar la cromatina, llamadas lectores (*readers*); y también, existen enzimas capaces de remover las marcas epigenéticas llamadas borradores (*erasers*) (Allis y Jenuwein, 2016).

En el caso de la metilación de DNA, las enzimas encargadas de establecer y mantener la metilación del DNA, son las DNA-metil transferasas (DNMTs, por sus siglas en inglés). Las enzimas DNMT3A y DNMT3B, se encargan de establecer la metilación en sitios CpG no metilados o hemimetilados durante el desarrollo embrionario; mientras que la DNMT1 se encarga de mantener los patrones de metilación a través de los ciclos de división celular (Meng, *et al*, 2015).

La 5mC es reconocida por varias enzimas con dominios específicos que reconocen la metilación del carbono 5 de la citosina, por ejemplo: proteínas con dominio de unión a metil-CpG (MBP, por sus siglas en inglés), que reconocen a la metilación en contexto CpG; proteínas de la familia KAI1 con motivos de dedos de zinc que reconocen al DNA metilado; y proteínas con dedos asociados a RING como la familia de proteínas tipo ubiquitina (UHRF1 y UHRF2) (Meng, *et al*, 2015).

Los mecanismos encargados de eliminar a la 5mC, pueden ser de dos tipos: activos o pasivos. Los mecanismos de desmetilación pasiva se dan mediante la elución de la marca a través de las divisiones en el ciclo celular. Los mecanismos de desmetilación activa son dependientes de las enzimas TET (del inglés *Ten-Eleven-Translocation*) y del mecanismo de reparación BER (del inglés *Base Excision Repair*). Las proteínas TET, se encargan de la oxidación del grupo metilo de la 5mC a 5hmC, y subsecuentemente a 5fC y 5caC; una vez en sus estados más oxidados, el mecanismo BER, se encarga de retirar la 5fC o 5caC y reemplazarla por una citosina normal (Pastor, *et al*, 2013).

### **5.3 La metilación del DNA como marca epigenética de represión**

La metilación del DNA en promotores CGIs es una marca epigenética asociada a silenciamiento génico (Meng, *et al*, 2015). La metilación del DNA no actúa como un evento iniciador del silenciamiento génico, sino como un bloqueo en el estado ya silenciado (Deaton y Bird, 2011).

El mecanismo por el cual se silencia la transcripción génica es ya conocido. Los promotores metilados tienen nucleosomas en el TSS, que están reprimidos por la marca de la H3K9me3 y además, están estabilizados por proteínas de reconocimiento de DNA metilado (Jones, 2012)

Las proteínas de reconocimiento de DNA metilado, como las MeCPs (proteínas tipo MBP), actúan como intérpretes y reconocen de manera específica a la 5mC en contexto CpG. Estas proteínas reclutan a diferentes modificadores de la cromatina, como Sin3A y NCoR (Meng, *et al*, 2015) y a su vez reclutan a desacetiladores de histonas (HDACs, por sus siglas en inglés) a la región; por lo tanto, se establece un ambiente de cromatina represora (Fig. 7A) (Jones, 2012).

La metilación en sitios no CGIs tienen un impacto diverso en la unión de factores de transcripción. Por ejemplo, los factores de transcripción como CREB o E2F, no se unen cuando están en presencia de 5mC y por lo tanto, el gen no es transcrito (Meng, *et al*, 2015). Otros factores de transcripción como RUNX2, LAMB3 y Oct4 disminuyen la transcripción del gen en presencia de la 5mC (Fig. 7B); mientras que factores como SP1 no muestran correlación entre la presencia de 5mC y la expresión del gen (Jones, 2012).

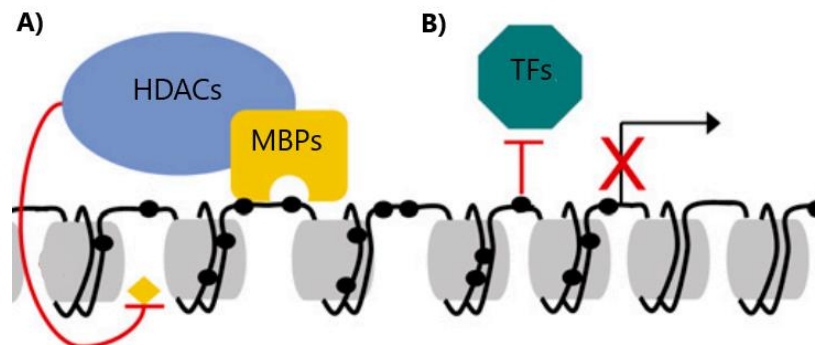


Figura 7. *Modelo de represión por metilación del DNA*. La metilación del DNA en promotores asociados a CGI está asociada al silenciamiento a largo plazo de los genes. A) La unión MBPs a CpGs metiladas, recluta a HDACs e impiden que se inicie la transcripción de los genes. B) Algunos factores de transcripción, no se unen a su secuencia blanco en presencia de la 5mC y por lo tanto, el gen no es transcrito (Imagen modificada de: Deaton y Bird, 2011).

#### 5.4 Metilación del DNA en cáncer

La metilación del DNA participa en los procesos involucrados en la salud y en la enfermedad, por esa razón no es de sorprender que en el cáncer existan cambios en los patrones de metilación. En múltiples estudios realizados de manera específica o general, se ha encontrado que los patrones de metilación en diferentes tipos de cáncer se encuentran alterados (Esteller, 2008).

En el cáncer se han reportado pérdidas y ganancias en los estados de metilación del DNA, comparado con el tejido normal. Las pérdidas en los niveles de metilación son conocidos como hipometilación del DNA, mientras que las ganancias en metilación son conocidos como hipermetilación del DNA (Ehrlich, 2002).



El primer cambio epigenético reportado en cáncer fue la hipometilación del DNA, en 1983. La pérdida de 5mC, comparado con el tejido normal, se reportó en diferentes tipos de cáncer, siendo más evidente en tumores con capacidad metastásica. La hipometilación del DNA se observó en tumores, como: adenocarcinomas de páncreas y mama; carcinomas de recto, hígado, ovario y pulmón; melanomas, leucemias y tumores de Wilm (Gama-Sosa, *et al*, 1983).

En cáncer existe una pérdida global de 5mC en el genoma. La mayor parte de la hipometilación del DNA se encuentra en secuencias repetidas, como lo son: secuencias satélite, secuencias centroméricas, elementos largos interdispersos (LINE, por sus siglas en inglés) y secuencias Alu. La hipometilación global del DNA es generalmente observada en la progresión tumoral y se encuentra asociada a la malignidad del cáncer (Ehrlich, 2009).

La hipermetilación del DNA en las CGIs asociadas a promotores de genes es otro de los cambios epigenéticos más comunes en diferentes tipos de cáncer. La hipermetilación aberrante puede generar el silenciamiento de factores de transcripción e inactivar vías de señalización completas; también, puede silenciar mecanismos asociados a la reparación celular e inducir a las células a acumular daños genéticos; incluso, puede silenciar a los genes supresores de tumores e iniciar el proceso carcinogénico y tumorigénico (Sharma, *et al*, 2010).

A lo largo de la literatura, se reportan diferentes genes que se encuentran hipermetilados en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, el promotor del gen *RUNX3* que está hipermetilado en cáncer de esófago, estómago, hígado, páncreas y colon, su silenciamiento induce la desregulación de la vía TGF- $\beta$ , esto contribuye a la progresión tumoral y a la resistencia a la apoptosis (Long, *et al*, 2007).

La hipometilación de regiones específicas (hipometilación regional) en cáncer también ha sido observada (Ehrlich, 2009). La desmetilación de las CGIs asociadas a promotores, genera que genes que usualmente están reprimidos se expresen (Esteller, 2008). Un ejemplo, es la hipometilación del gen *PAX2* en cáncer de endometrio. La hipometilación de este promotor, induce la activación de *PAX2* en este tipo de cáncer y favorece la proliferación celular (Wu, *et al*, 2005).

En estudios recientes, se ha encontrado que en el cáncer las regiones que más se encuentran diferencialmente metiladas, son los potenciadores. En los potenciadores se observa que existen en su mayoría, procesos de pérdida de 5mC, posiblemente debido a errores en la replicación (Bell, *et al*, 2016). Estos cambios en los estados de metilación de los potenciadores tienen un efecto en los perfiles de expresión de los genes (Aran, *et al*, 2013). También se ha observado que la metilación en potenciadores, participa de manera significativa en la expresión heterogénea en tumores (Aran y Hellman, 2013).

## **5.5 Metilación del DNA en cáncer de páncreas**

En el cáncer de páncreas, se ha demostrado que existen cambios en los patrones de metilación del DNA, cambios en las modificaciones postraduccionales de histonas e incluso cambios en la expresión de miRNAs. En los adenocarcinomas de páncreas se han observado estados de hipo e hipermetilación del DNA (van Kampen, *et al*, 2014).

Uno de los primeros cambios epigenéticos reportados en cáncer de páncreas, fue la hipermetilación del gen *CDKN2A*. La hipermetilación de este gen, se encuentra asociada al silenciamiento del mismo y sugiere que los procesos epigenéticos están actuando como una vía alterna de silenciamiento génico en cáncer de páncreas (Schutte, *et al*, 1997).

Actualmente, existen muchos genes reportados que se encuentran hipermetilados en los promotores asociados a CGIs en este tipo de cáncer, por ejemplo: *TFPI-2*, *SPARC*, *BNIP3*, *ppENK*, *Reprimo*, *HHIP*, *Ciclina D2*, *NPTX2*, entre otros. Estos genes están asociados a procesos como: ciclo celular, crecimiento celular, invasión y metástasis. La hipermetilación en estos genes se encuentra asociada al silenciamiento génico de los mismos, independientemente de la inactivación génica (Sato y Goggins, 2006).

Como se mencionó anteriormente, otro de los primeros cambios epigenéticos reportados en cáncer de páncreas fue la hipometilación global comparado con el tejido normal (Gama-Sosa, *et al*, 1983). La hipometilación del DNA, contribuye a la inestabilidad genómica observada en el cáncer de páncreas (Hong, *et al*, 2011).

También se ha observado hipometilación regional en este tipo de cáncer. Los genes que se encuentran reportados con hipometilación en promotores asociados a CGIs son: *14-3-3- $\sigma$* , *Maspina*, *Trefoil Factor 2*, *S100P*, *Claudina 4*, *Mesotelina*, *PSCA*, *S100A4* y *Lipocalina 2*. Estos genes, están involucrados en: progresión del ciclo celular, diferenciación celular, adhesión celular, invasión y metástasis (Sato y Goggins, 2006). La hipometilación en estos genes (*S100A4*, por ejemplo), está asociada a la sobre expresión de la proteína codificada (Sato, *et al*, 2003).

A la fecha en la que escribe este trabajo, no se tienen estudios específicos en donde se demuestre que existen cambios en los patrones de metilación de los potenciadores en el cáncer de páncreas; sin embargo, se tienen estudios que comprueban que en el cáncer de mama (Fleisher, *et al*, 2017) y en melanoma (Bell, *et al*, 2016) existen cambios en los patrones metilación en los potenciadores. Además, se ha observado que mutaciones genómicas en los potenciadores en el cáncer de páncreas tienen un efecto en la expresión de diversos genes (Feigin, *et al*, 2017). Por lo cual, es de suponer que cambios en los estados de metilación en los potenciadores en este tipo de cáncer deberían de tener algún efecto sobre su biología tumoral.

## 6. Pseudogenes

Los pseudogenes son considerados como loci genómicos que se asemejan a genes reales, pero son biológicamente inactivos porque abrigan mutaciones que anulan su transcripción o traducción. Recientemente, gracias a las nuevas tecnologías se ha descubierto que los pseudogenes participan en la regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional (Xiao-Jie, *et al*, 2015).

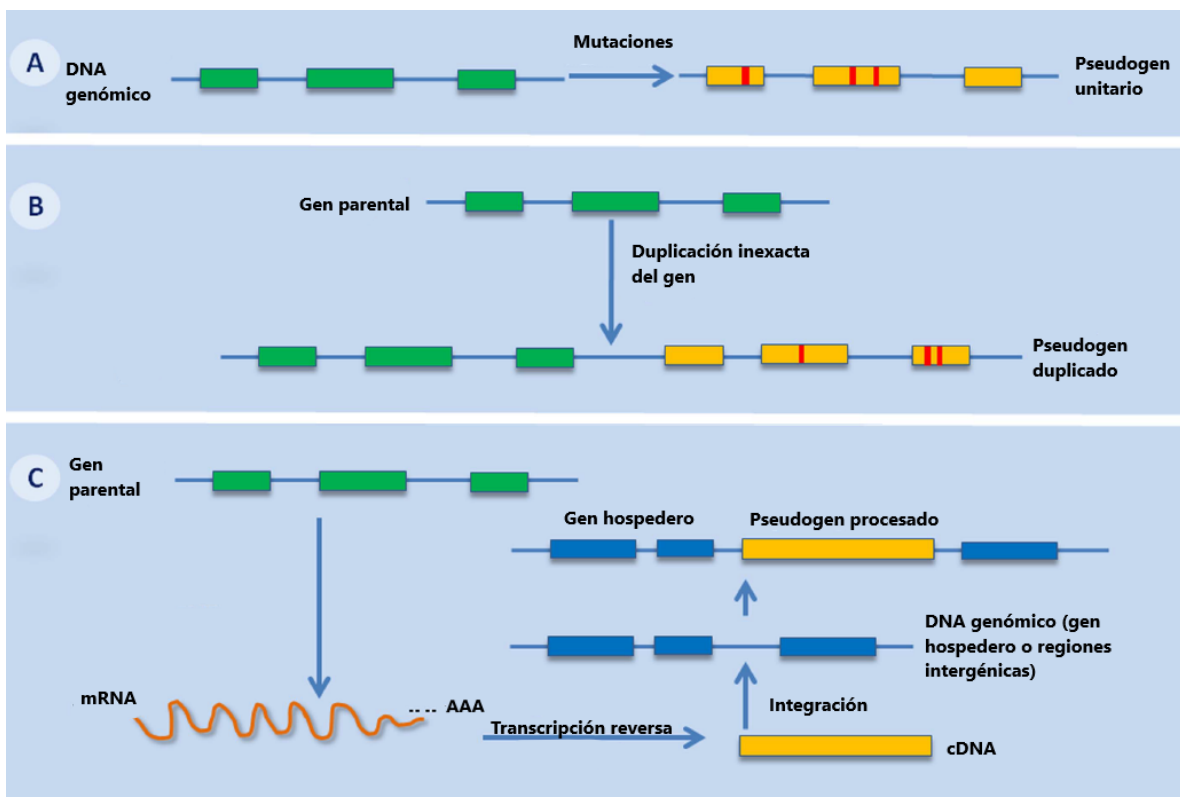


Figura 8. *Tipos de pseudogenes.* A) Pseudogen unitario. B) Pseudogen duplicado. C) Pseudogen procesado. (Imagen modificada de: Xia-Jie, *et al*, 2015).

Existen diferentes tipos de pseudogenes (Fig. 8). Los primeros son aquellos que por alguna mutación anulan la transcripción y/o traducción del gen y convierten a ese gen en un pseudogen “unitario” (Xiao-Jie, *et al*, 2015). Los pseudogenes, también se pueden originar a partir del “decaimiento” de los genes originados por eventos de duplicación génica durante el proceso evolutivo. Estos decaimientos

incluyen mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, codones de paro mal colocados o corrimientos en el marco de lectura (Tutar, 2011). Por otro lado, los pseudogenes procesados son producto de procesos de retrotransposición que se dan por la integración de cDNA al genoma en una región intergénica o en otro gen (Tutar, 2011) (Xia-Jie, *et al*, 2015).

El papel carcinogénico de los pseudogenes en el cáncer de mama, pulmón, riñón, próstata y melanoma, ha sido reportado; y al igual que los genes, los pseudogenes pueden tener papeles de tumor supresor, como: *PTENP1*, *TUSC2P* y *INTS6P1*; o de oncogen, como: *OCT4-pg4*, *HMGA1P6*, *CYP4Z2P* y *BRAFP1*. Por lo que, la desregulación de éstos puede llevar al desarrollo tumoral (Poliseno, *et al*, 2015).

Por lo cual, no es de sorprender que se hayan reportado cambios en los estados de metilación del DNA en pseudogenes durante el desarrollo carcinogénico. Por ejemplo: *PTENP1* en cáncer de endometrio, en donde la hipermetilación del promotor del pseudogen lleva a su inactivación, lo cual afecta su función regulatoria (Kovalenko, *et al*, 2013). Sin embargo, debido a que los pseudogenes apenas están tomando relevancia (Xia-Jie, *et al*, 2014), existen pocos reportes del efecto de la metilación en los pseudogenes, así como su papel en el desarrollo de otros tipos de cáncer.

## **7. Familia *CHMP4B***

Las proteínas CHMP (del inglés, *Charged Multivesicular Body Protein*), son proteínas que forman parte clave en los componentes de los complejos de clasificación de endosomas necesarios para el transporte-III (ESCRT III, por sus siglas en inglés). Los humanos expresan 11 distintas proteínas que se pueden dividir en siete familias (CHMP 1-7) (McCullough, *et al*, 2008).

El ESCRT-III, es un complejo multifuncional que participa en varios procesos celulares como son: la biogénesis de endosomas multivesiculares, la separación

de la célula durante la citocinesis y potencialmente la autofagia. Los complejos ESCRT, así como sus componentes proteicos (CHMP1-4) han sido asociados a diferentes patologías como enfermedades neurodegenerativas, infecciones por bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*), infecciones por virus (VIH, ebola, etc), cataratas y diferentes tipos de cáncer (Stuffers, *et al*, 2009).

La familia CHMP4 se divide en 3 (a-c). La proteína CHMP4B es parte fundamental del complejo ESCRT-III y facilita la incorporación y separación de las vesículas membranales (Wollert, *et al*, 2009). También se ha demostrado que la proteína CHMP4B, se encuentra asociada a la escisión de la membrana durante la citocinesis (Elia, *et al*, 2011). Por otro lado, CHMP4B está asociado a puentes cromosómicos y a micronúcleos. Los autofagosomas y lisosomas que rodean a los micronúcleos son positivos a CHMP4B y podría mediar la degradación autofagolisosomal de la cromatina extranuclear (Sagona, *et al*, 2013).

Como ya se mencionó, los complejos ESCRT se han asociado a diferentes tipos de cáncer, como leucemias, cáncer de próstata, mama y carcinoma hepatocelular; sin embargo, poco es sabido de la participación de CHMP4 en cáncer (Stuffers, *et al*, 2009). Recientemente, Hu, *et al*, demostraron que la proteína CHMP4B se encuentra sobreexpresada en cáncer hepatocelular y se encuentra relacionada con la proliferación celular y resistencia a la quimioterapia (Hu, *et al*, 2015).

### **7.1 CHMP4Bp1**

El gen *CHMP4B* tiene un pseudogen (*CHMP4Bp1*), el cual se encuentra en la posición chr14:55,298,602-55,299,496. Los análisis de secuenciación del RNA reportan que este gen se encuentra expresado en diferentes tejidos como son: páncreas, mama, piel, ovario, próstata, cerebro, pulmón, hígado, riñón, entre otros; sin embargo, no hay reportes de la expresión de la proteína de este gen, ni de su participación en alguna enfermedad (Weizmann Institute of Science, 1996-2007).

El pseudogen *CHMP4Bp1* se encuentra ubicado en el intrón 1 del gen *FBOX34* (Kent, *et al*, 2002). El gen *FBOX34* pertenece a la familia de proteínas F-box, las cuales, junto con las proteínas SKP1 y CUL-1 forman el complejo SCF. Las proteínas de la familia F-box actúan como ligasas de ubiquitina (Jin, *et al*, 2004).

## 8. Esferoides

Los tumores no son solo masas proliferativas de células cancerígenas, sino que son tejidos complejos compuestos por múltiples tipos de celulares. Las células dentro de un tumor participan en interacciones heterotípicas una con la otra y forman un microambiente tumoral, el cual juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de los tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

Los tumores sólidos al crecer en un espacio tridimensional (3D), generan gradientes de oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización; estos factores, se traducen como diferentes tipos de estrés físico y químico en las células. Los modelos de cultivo en monocapa o bidimensionales (2D), no representan de manera eficaz estos gradientes (Weiswald, *et al*, 2015).

El concepto de cultivo tridimensional, está basado en el crecimiento de estructuras esféricas (esferoides), las cuales se forman a partir de muchas capas de células. Estas estructuras mimetizan las características físicas y bioquímicas de las masas tumorales (Kapałczyńska, *et al*, 2016).

Uno de los primeros cultivos tridimensionales de células cancerígenas, fue realizado en agar suave en 1970. En este estudio se cultivaron células en esferas a partir de células troncales de mieloma, estas células provenían de diferentes tipos de neoplasias con diferentes grados de malignidad (Hamburger y Salmon, 1977).

Actualmente se han reportado cultivos tridimensionales para diferentes líneas celulares de diferentes tipos de cáncer como son: glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, melanoma, tumores de Wilms, carcinomas celulares escamosos de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, ovario, páncreas y hepatocarcinoma celular (Kapałczyńska, *et al*, 2016).

Al mimetizar la biología de un tumor, los esferoides representan de manera más exacta las interacciones que existen entre célula-célula, el ambiente extracelular, la formación de nichos, la morfología y el fenotipo celular, los gradientes de oxígeno y nutrientes, así como la expresión de genes y la bioquímica celular (Weiswald, *et al*, 2015).

Los cultivos en esferoides se han utilizado para comprender mejor el microambiente tumoral, la regulación de las células tumorales, interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, hipoxia, etc. En la investigación clínica, se utilizan en la evaluación de la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia génica y en el área de medicina personalizada (Hirschhaeuser, *et al*, 2010).

En la investigación en epigenética, se ha observado que cuando las células son cultivadas en esferoides, los patrones epigenéticos se ven afectados, por ejemplo la metilación del DNA. En los cultivos en esferoide existen pérdidas en los patrones de metilación del DNA, como es el caso del gen *E-cadherina* en células escamosas de carcinomas (Desrochers, *et al*, 2012). También, en cultivos en esferoides se han observado ganancias en la metilación del DNA en diversos genes a causa de la desregulación de las vías implicadas en el metabolismo de la metilación del DNA, en líneas de cáncer de ovario (Paullin, *et al*, 2017).

## **8.1 Esferoides Multicelulares Tumorales**

Los modelos tridimensionales de cáncer se pueden dividir en 4 grupos: 1) esferoides tumorales multicelulares (MTS, por sus siglas en inglés), son



generados en condiciones no adherentes a partir de células en suspensión; 2) tumoros-esferas, modelos que parten de células troncales de cáncer (CSC, por sus siglas en inglés); 3) esferas tumorales derivadas de tejido, son formadas a partir de la disociación parcial de tejidos de cáncer; y 4) esferoides multicelulares organotípicos, generados por el corte de tejidos de cáncer y crecidos en condiciones no adherentes (Weiswald, *et al*, 2015).

Los esferoides tumorales, se clasifican en dos de acuerdo con su origen: 1) clonogénicos, se forman a partir de una célula tumoral y generan una estructura compartimentalizada, en donde se observan tres zonas (zona de proliferación, zona de células quiescentes y zona necrótica-apoptótica) (Fig. 9); 2) agregados, se forman a partir de agregados celulares y carecen de la formación de un núcleo necrótico (Gallardo-Pérez, *et al*, 2006).

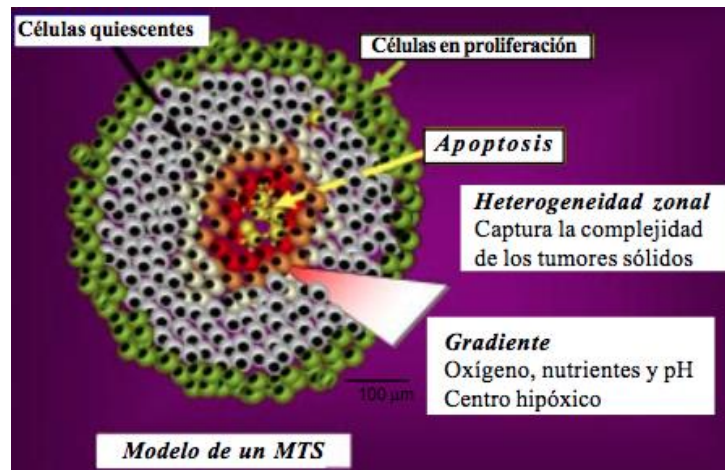


Figura 9. Estructura de un esferoide multicelular, se observa sus tres principales capas: células en proliferación, células quiescentes y centro de apoptosis. También se observa que existe la presencia de un gradiente de oxígeno, nutrientes y pH (Gallardo-Pérez, *et al*, 2006).

### III. Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el genoma del cáncer de páncreas, con el objetivo de caracterizar e identificar los subtipos que puedan existir, así como encontrar posibles marcadores de prognosis y blancos terapéuticos. El análisis del genoma del cáncer de páncreas, ha permitido la identificación de diferentes elementos génicos, tales como ncRNA, cambios en los patrones de metilación del DNA o mutaciones que pueden jugar un papel en el desarrollo y progresión de este tipo de cáncer.

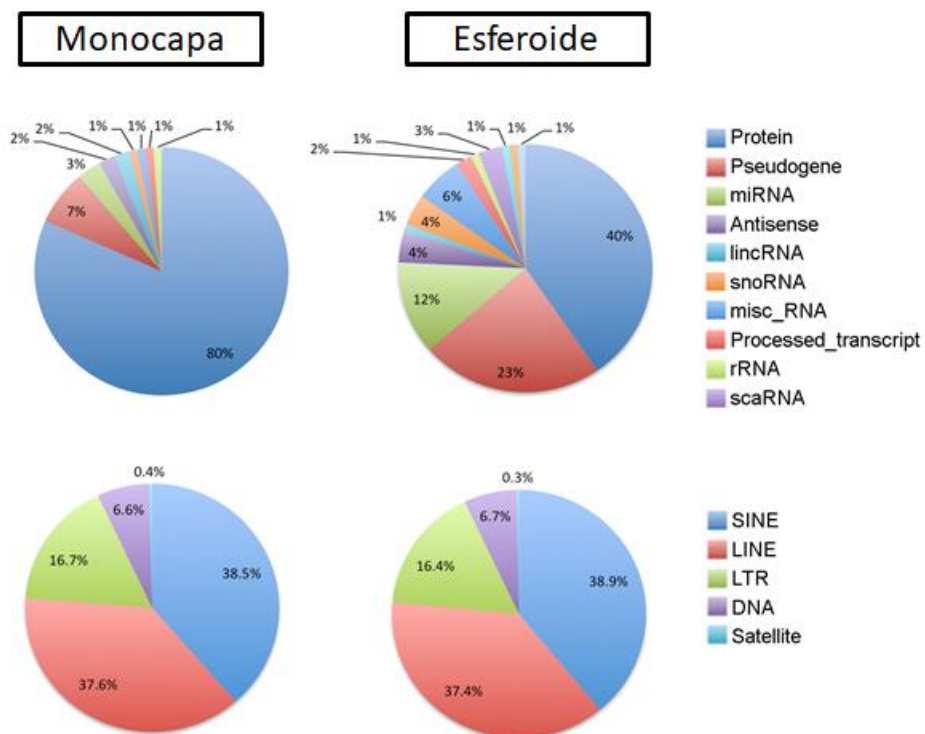


Figura 10. Análisis de un microarreglo de metilación de BxPC-3 y CFPAC-1, cultivadas en monocapa y esferoide. En donde se observan cambios en los patrones de metilación de diferentes elementos génicos, cuando estos son crecidos en cultivos en 3D (esferoide).

Para estudiar los cambios en los estados de metilación del cáncer de páncreas, en nuestro laboratorio se realizó un microarreglo de metilación del DNA de las líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1, con el fin de observar si existían cambios en los patrones de metilación cuando las células son cultivadas en esferoide (Fig. 10).

Los resultados demostraron que existen cambios en los estados de metilación del DNA, cuando las células son cultivadas en esferoide, comparadas con líneas celulares cultivadas en monocapa. Diversos elementos génicos cambian en sus estados de metilación del DNA, como son: genes que codifican para proteínas, pseudogenes (Fig. 10, color rojo monocapa 1% vs esferoide 2%) ncRNA y regiones regulatorias.

Una de las regiones genómicas que se encuentra diferencialmente metilada cuando las células son cultivadas en esferoide y no se encuentra reportada, es la región cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*. Es importante mencionar que esta región probablemente sea regulatoria, porque se encuentra enriquecida con las marcas epigenéticas H3K27ac y H3K4me1; así como en una región hipersensible a DNasa 1, características asociadas a regiones regulatorias conocidas como potenciadores.

## IV. Justificación

La sobrevivencia de los pacientes detectados con cáncer de páncreas es menor al 5%. La alta tasa de mortalidad, es debida al diagnóstico tardío de la enfermedad y a que la mayoría de los pacientes no presentan síntomas. Además, la biología tumoral contribuye a la alta resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia. En las últimas décadas se han llevado a cabo estudios que han permitido entender con mayor profundidad los eventos moleculares que son claves en la biología del cáncer de páncreas. Estos estudios han determinado que múltiples cambios en el genoma y el epigenoma son factores importantes en la iniciación y la progresión del cáncer, así como en la formación de los tumores.

Con el fin de estudiar el genoma del cáncer de páncreas en nuestro grupo de trabajo, se han realizado experimentos enfocados a la metilación del DNA en este tipo de cáncer. Uno de ellos es un microarreglo de metilación, en donde diferentes regiones genómicas se encontraron diferencialmente metiladas, cuando las células eran cultivadas en esferoide.

La metilación del DNA, es un proceso involucrado en la salud y la enfermedad, por lo cual no es de sorprender que en el cáncer existan cambios en los patrones de metilación. En la literatura, se tienen reportados cambios en los estados de metilación del DNA en el cáncer de páncreas, como la hipermetilación y hipometilación en promotores de diferentes genes.

Sin embargo, el papel de la metilación en otras regiones genómicas en el cáncer de páncreas es poco estudiado, así como su relación con la expresión génica. Motivo por el cual, decidimos estudiar la región génica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*, para comprobar si existen cambios en sus estados de metilación y si éstos afectan la expresión de *CHMP4Bp1*. Decidimos ocupar cultivos tridimensionales de cáncer de páncreas, debido a que representan mejor la biología tumoral.

## V. Hipótesis

La metilación del DNA en los dinucleótidos CpGs presentes en la región genómica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*, afectará la expresión de *CHMP4Bp1* cuando las células sean cultivadas en esferoide.

## VI. Objetivos

### 1. Objetivo general

Comprobar los cambios en los estados de metilación del DNA de los dinucleótidos CpGs que se encuentran en la región genómica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1* en un modelo tridimensional de cáncer de páncreas.

### 2. Objetivos específicos

- Establecer el cultivo de esferoides de las líneas celulares de cáncer de páncreas, BxPC-3 y CFPAC-1.
- Analizar el nivel de mRNA de *CHMP4Bp1* de la líneas celulares de BxPC-3 y CFPAC-1, cultivadas en monocapa y esferoide.
- Comparar los estados de metilación de las CpGs que están en la región genómica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*, entre las líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1.
- Cuantificar el porcentaje de metilación de las CpGs de las líneas celulares, cultivadas en monocapa y en esferoide.

## VII. Métodos

### 1. Líneas celulares

- BxPC-3: Línea celular obtenida de un tumor primario de una paciente con adenocarcinoma de páncreas (Número: ATCC® CRL-1687™). A nivel molecular, esta línea celular está caracterizada por tener mutaciones en los genes *CDKN2A*, *MAP2K4*, *SMAD4* y *Tp53*.
- CFPAC-1: Línea celular que proviene de metástasis de un hepatocarcinoma, el cual generó un adenocarcinoma ductal de páncreas (Número: ATCC® CRL-1687™). A nivel molecular esta línea celular está caracterizada por tener mutaciones en los genes *KRAS*, *SMAD4* y *Tp53*.

### 2. Cultivo celular

La línea celular BxPC-3 se cultivó en medio RPMI, mientras que las células CFPAC-1 se cultivaron en medio IMDM; cada medio estaba complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Una vez alcanzada una confluencia del 80% las células se trataron con tripsina, para posteriormente ser expandidas o criopreservadas (con SFB y DMSO al 10%).

### 3. Cultivo de esferoides multicelulares agregados

Los esferoides se cultivaron con la técnica: “*Liquid overlay*”. En la cual se sembraron aproximadamente 500 000 células en cajas de Petri de 60 mm previamente cubiertas con una capa de agarosa al 2X y medio DMEM 1X (concentración 1:1). Los esferoides se cultivaron con el medio que les correspondía, suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v). Las células se mantuvieron en la incubadora por 5 días.

Posteriormente, las células se pasaron a frascos de cultivo para células en suspensión con medio *Leibovitz* (L-15) complementado con SFB al 10%, con cambios de medio cada dos días. Los esferoides se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm y con una temperatura de 37°C hasta los 10 días de iniciado el cultivo. Para realizar la curva de crecimiento, los esferoides se midieron cada 2 días con un porta objetos graduado (1mm) (n=10).

#### **4. Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó con la técnica de trizol-cloroformo. Las células se homogeneizaron con la solución de lisis de TRI Reagent™ Solution (*Invitrogen*), posteriormente se añadió cloroformo y se centrifugó. La fase acuosa se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70% con agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se disolvió en agua-dietilpirocarbonato (DEPC). La pureza del RNA extraído se comprobó con la relación 260/280 D.O., y la integridad con electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

#### **5. Síntesis de DNA complementario**

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se realizó mediante técnica de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés). La síntesis se realizó con el Kit de High-Capacity cDNA Reverse Transcription™ (*AppliedBiosystems*). Para realizar la reacción se emplearon: 3 µg de RNA total, oligos aleatorios, 2.5 mM de desoxinucleótidos (dNTPs) y la enzima transcriptasa reversa MultiScribe™ en buffer de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de la reacción fueron: 1) activación de la enzima por 10 min a 25°C; 2) síntesis de cDNA por 120 min a 37°C; 3) inactivación de los componentes de la reacción a 85°C por 5 min; 4) incubación a 37°C por 20 min.

De manera alterna se realizó la síntesis del cDNA mediante la técnica de transcripción reversa por oligo(dT)<sub>20</sub>. La síntesis se realizó con el kit de SuperScript™ III First Strand Synthesis System for qRT-PCR (*Invitrogen*). Para



realizar la reacción se emplearon: 500 ng de RNA total, oligo(dT)<sub>20</sub>, 2.5 mM de dNTPs y la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ III RT en buffer de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de la reacción fueron: 1) desnaturalización del RNA por 5 min a 65°C; 2) alineación de los oligos por 10 min a 25°C; 3) síntesis de cDNA por 50 min a 50°C; 4) inactivación de los componentes de la reacción a 85°C por 5 min; 5) remoción del RNA residual con RNasa H a 37°C por 20 min.

## 6. PCR semi-cuantitativa

La expresión del pseudogen *CHMP4Bp1*, se observó con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para realizar la reacción se utilizaron: 2.5 unidades de DNA polimerasa termoestable AmpliTaq® (*Applied Biosystems*), 2 mM de dNTPs, 10 picomolar de oligos específicos (Tabla 1) y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. La expresión del RNA mensajero se normalizó con la expresión del gen constitutivo *TBP*. Las temperaturas de alineación (TM, por sus siglas en inglés) y ciclos empleados en cada PCR, se observan en la Tabla 1. Los productos de PCR, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y mediante la técnica de densitometría en el programa ImageJ (Schneider, *et al*, 2012)

Tabla 1. Especificaciones de oligos empleados para PCR de cDNA					
Oligo	Secuencia (5'-3')	(TM)	Condiciones	Ciclos	Producto esperado
<i>TBP</i>	Sentido CCAGACTGGCAGCAAGAAAAT	55.9°C	95°C por 30 seg 56°C por 1 min 72°C por 30 seg	35	119 pb
	Antisentido CCTTATAGGAAACTTCACATCACAGC	55.6°C			
<i>CHMP4Bp1</i>	Sentido GAGAAGAAAATCGAGCAGAGG	53.1°C	95°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 30 seg	35	171 pb
	Antisentido GAGCACCTCGGTATTGGTGT	57.1°C			

## 7. PCR en tiempo real

La expresión relativa del pseudogen *CHMP4Bp1*, se cuantificó con la técnica de PCR en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés). La qPCR se llevó a cabo con el Master Mix de SYBR® Green (*Applied Biosystems*). La detección de la intensidad de la emisión del SYBR® Green a la unión del DNA de doble cadena fue lograda con el equipo de 7900HT Fast Real Time PCR-System (*Applied Biosystems*). Los oligos específicos y las TMs utilizadas en la qPCR, fueron los mismos que se emplearon para la PCR semi-cuantitativa (Tabla 1), los ciclos se aumentaron a 45. Los cambios en la expresión de *CHMP4Bp1* fueron determinados con la técnica de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## 8. Extracción de DNA

El DNA genómico (gDNA) se extrajo con el kit DNeasy® (*QIAGEN*), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Durante la extracción se realizó un tratamiento con RNasa A, debido a que el RNA puede reducir la eficiencia de la conversión por bisulfito de sodio. La pureza del DNA se comprobó con la relación 260/280 D.O., mientras que la integridad con electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

## 9. Conversión por Bisulfito de Sodio

La conversión por bisulfito de sodio del gDNA extraído, se realizó con el kit de EpiTect® Plus DNA Bisulfite (*QIAGEN*), de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Fig. 11). Para realizar la conversión se utilizó el DNA con un índice 260/280 D.O., de 1.80 a 2.0; para cada reacción, se convirtieron entre 500 ng a 1000 ng de gDNA.

**Paso 1:**  
Desnaturalización

**Paso 2:**  
Conversión por bisulfito de sodio

**Paso 3:**  
Desulfonación

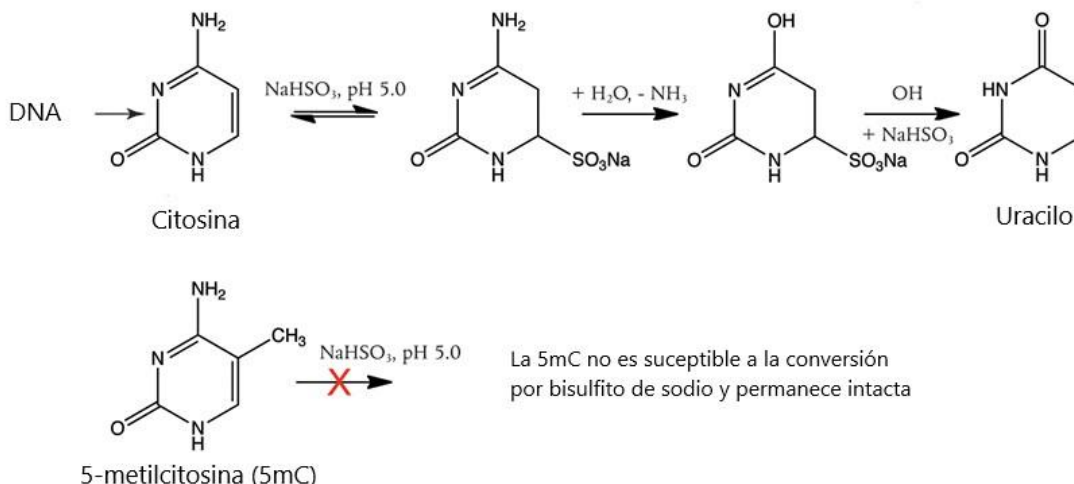


Figura 11. *Reacción de Bisulfito de Sodio, de acuerdo con el kit de EpiTect® Plus DNA Bisulfite (QIAGEN), consta de tres pasos.* 1) Desnaturalización: Incubación a 95°C de DNA. 2) Conversión por bisulfito de sodio: incubación con bisulfito de sodio a 60°C, desamina a las citosinas no metiladas. 3) Desulfonación: incubación con pH alto a temperatura ambiente por 15 min, remueve al grupo sulfito y genera un uracilo, donde antes había una citosina no metilada.

## 10. PCR-stepdown de DNA tratado con Bisulfito de Sodio

La region cercana al pseudogen *CHMP4Bp1* se amplificó a partir de DNA tratado con bisulfito de sodio, mediante PCR por stepdown. Los oligos específicos se diseñaron con el programa BiSearch (Tusnady, *et al*, 2005) (Tabla 2). Para realizar la reacción se necesitaron: 2.5 unidades de polimerasa de DNA termoestable AmpliTaq® (*Applied Biosystems*), 2 mM de dNTPs, 10 picomolar de oligos específicos (Tabla 2) y 1.5 mM de buffer de  $\text{MgCl}_2$ . Para confirmar que el DNA se convirtió por bisulfito de sodio el gen *MUC2* se utilizó como control (Tabla 2). Las condiciones de la PCR por Stepdown se muestran en la tabla 3. Los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Oligo	Secuencia (5'-3')	(TM)	CpGs	Producto esperado (pb)
<i>CHMP4Bp1</i>	Sentido ACAATATTCCTCCACTTACTAAA	58.8°C	2	277 pb
	Antisentido GGTAAAAAAGAAATTTTGG	56.8°C		
<i>MUC2</i>	Sentido TGGGGGTGTTAGTGATTTTATAGTC	59°C	1	100 pb
	Antisentido ACTAAACCCCATTCCTAACGAA	60°C		

Pasos	Condiciones	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 10 min	1
Alineación	95°C por 30 seg 68°C por 1 min	3
Primera extensión	95°C por 30 seg 65°C por 30 seg 72°C por 1 min	3
Segunda extensión	95°C por 30 seg 60°C por 30 seg 72°C por 1 min	3
Tercera extensión	95°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 1 min	3
Extensión final	95°C por 30 seg 50°C por 30 seg 72°C por 1 min	35
Terminación	72°C por 7 min	1

### 10.1 Enriquecimiento de producto de PCR

Los productos de PCR obtenidos de la PCR-stepdown, fueron enriquecidos por PCR. Para realizar la reacción se necesitaron: 2.5 unidades de polimerasa de DNA termoestable AmpliTaq® (*Applied Biosystems*), 2 mM de dNTPs, 10 picomolar de oligos específicos (Tabla 2), 1.5 mM de buffer de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 3. Los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

## 11. PCR de DNA genómico

La región cercana al pseudogen *CHMP4Bp1* se amplificó a partir de gDNA, mediante PCR. Los oligos específicos se diseñaron con el programa Primer3Plus (Tabla 4). Para realizar la reacción se necesitaron: 2.5 unidades de polimerasa de DNA termoestable AmpliTaq® (*Applied Biosystems*), 2 mM de dNTPs, 10 picomolar de oligos específicos (Tabla 4) y 1.5 mM de buffer de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 4. Los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Oligo	Secuencia (5'-3')	(TM)	Condiciones	Ciclos	Producto esperado
<i>CHMP4Bp1</i>	Sentido ATAAAAGTCTTTGAAAACCCCTCTACTTCT	64°C	95°C por 30 seg 55°C por 30 seg	45	267 pb
	Antisentido CCTAGACATCCATTTGTAAAGAACTT	62°C	72°C por 30 seg		

## 12. Clonación

### 12.1 Vector pTZ57R/T

El vector pTZ57/RT es específico para clonar productos de PCR generados a partir de DNA polimerasas que añaden adeninas en los extremos del producto de PCR, tales como la DNA polimerasa termoestable que fue empleada. El vector viene lineal y presenta extremos ddT para la óptima inserción de los productos de PCR. Este vector consta de 2886 pb, presenta un sitio múltiple de clonación dentro del gen *lac Z*, así como un marcador de resistencia para ampicilina (Fig. 12).

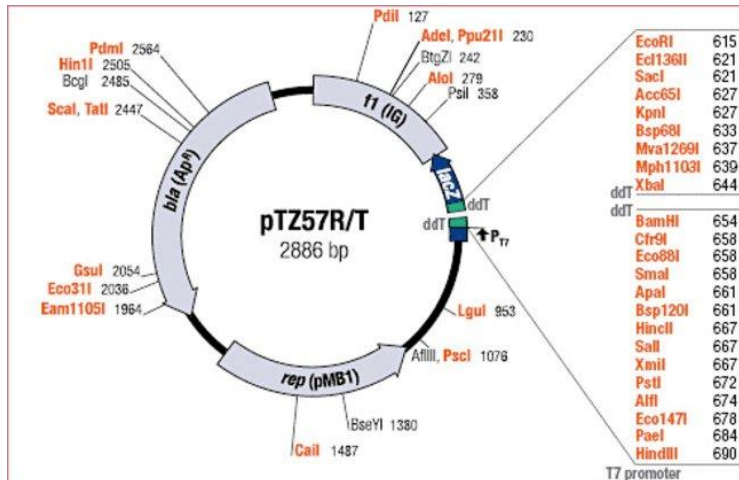


Figura 12. Mapa del vector pTZ57R/T. Los sitios de restricción son mostrados.

## 12.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación del plásmido pTZ57R/T con el producto enriquecido de PCR, se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del kit de InsTAclone™ PCR Cloning (*Thermo Scientific*). Las condiciones para realizar la reacción fueron: 0.17 picomolar de pTZ57R/T, 0.52 picomolar de producto de PCR, buffer de ligación y 5 unidades de enzima T4 ligasa. La reacción de ligación se incubó durante 1 hora a 22°C.

## 12.3 Transformación

Un cuadro de *Escherichia coli* (cepa: XL1-Blue) de 4x4 mm se sembró en medio-C, durante 2 horas en agitación constante. Al finalizar la reacción de ligación e incubación, se llevó a cabo la transformación de acuerdo con el protocolo de InsTAclone™ PCR Cloning Kit (*Thermo Scientific*). Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de agar-LB con ampicilina (1mg/μl), durante toda la noche a 37°C.

### **13. Extracción de plásmido por Miniprep**

Una colonia de bacteria fue sembrada (por reacción) en medio LB con ampicilina (1mg/μl) y se dejó incubando de 12-16 horas en agitación constante a 100 rpm a una temperatura de 37°C. Las bacterias fueron cosechadas y se extrajo el DNA de plásmido con el kit de QIAprep® (QIAGEN), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La pureza del plásmido se comprobó con la relación 260/280 D.O., mientras que la integridad con electroforesis en geles de agarosa.

### **14. Secuenciación Sanger**

Las muestras fueron secuenciadas mediante la técnica de Sanger, en el secuenciador de tipo Sanger 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems*). La secuenciación fue realizada por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las muestras secuenciadas fueron: BxPC-3 monocapa y esferoide, y CFPAC-1 monocapa y esferoide (4 colonias de cada uno) y 2 colonias de DNA no tratado con bisulfito de sodio. El análisis en los cambios en los niveles de metilación se llevó a cabo, por la comparación de los picos de la señal de citosina con los picos de la señal de timina, en las regiones CpG de interés.

### **17. Análisis bioinformático**

La región genómica de interés fue analizada en el programa *Genome Browser* (*Kent, et al, 2002*). En donde se le pidió al programa que desplegará las regiones regulatorias, como regiones *ORegAnno* y *GeneHancer*; y que mostrara otras genómicas como: regiones sensibles a DNasa 1, regiones enriquecidas con marcas de histonas (H3K27ac y H3K4me3) y CGIs.

## 16. Análisis estadísticos

Para determinar si los cambios observados en los experimentos de PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real eran significativos, se realizó una prueba T de *Student* de una cola. Los cambios en la expresión se consideraron significativos cuando el valor de  $p \leq 0.05$ .

Para determinar, si los cambios en los estados de metilación eran significativamente significativos, se realizó una prueba de  $\chi^2$ , con un análisis de Fisher. Los cambios en los estados de metilación se consideraron significativos cuando el valor de  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Prism 6, para MAC OS X.



## VIII. Resultados

### 1. Cultivo de esferoides

Para tener condiciones que se asemejarán más a un tumor (interacciones celulares, gradientes de oxígeno, nutrientes, pH, etc.), realizamos el cultivo de esferoides, que representan mejor la biología tumoral (Weiswald, *et al*, 2015). Se realizaron esferoides MTS de las líneas celulares de páncreas, BxPC-3 (Fig. 13A) y CFPAC-1 (Fig. 13B).

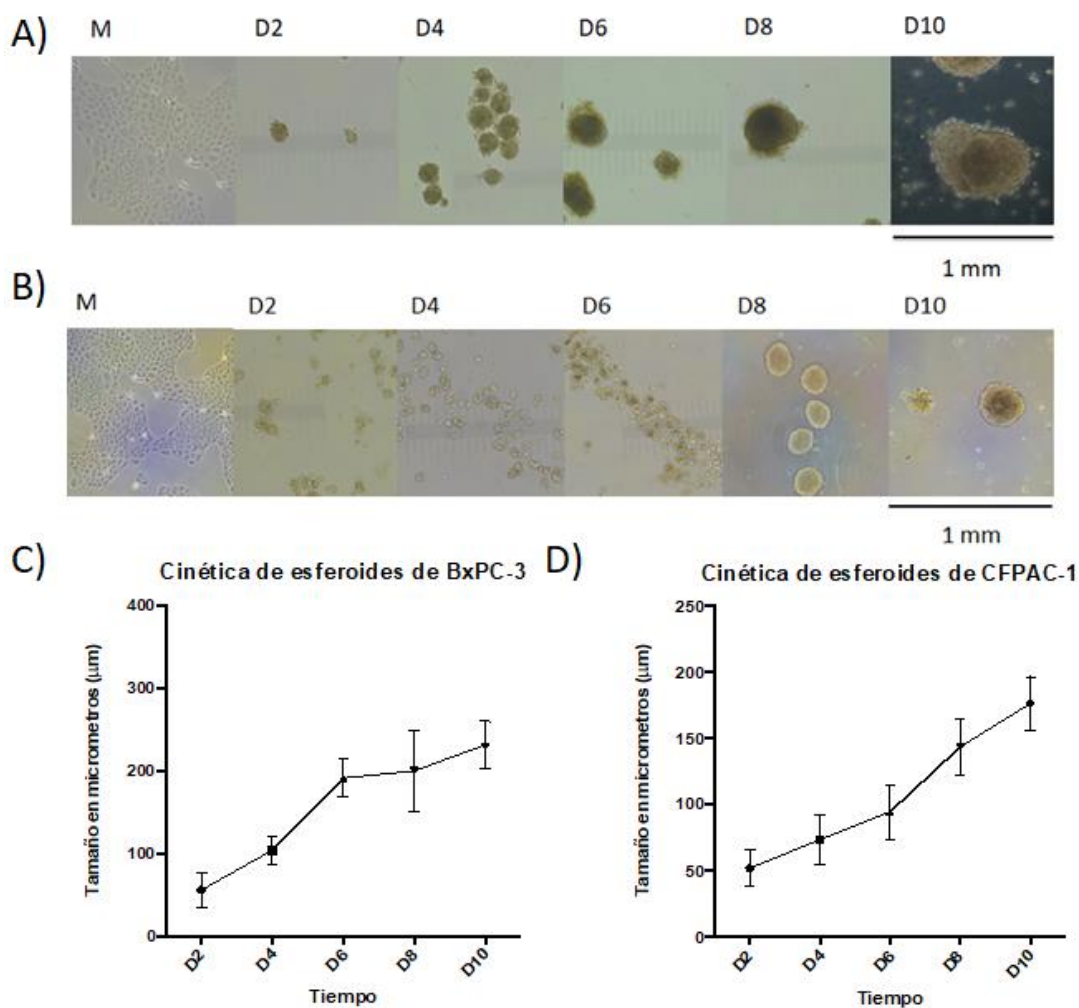


Figura 13. *Modelo tridimensional de cáncer de páncreas*. A) Crecimiento de esferoides de BxPC-3. B) Crecimiento de esferoides de CFPAC-1. C) Gráfica de crecimiento de esferoides de BxPC-3 (n=10). D) Gráfica de crecimiento de esferoides de CFPAC-1 (n=10).

Los cultivos en esferoides se mantuvieron por 10 días, alcanzando su tamaño máximo en este día. El tamaño promedio que alcanzan los esferoides de la línea celular BxPC-3 es de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  (Fig. 13C), mientras que para CFPAC-1 es de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  (Fig. 13D).

## 2. Estandarización de los oligos para la amplificación por PCR

Para poder estandarizar la expresión del mRNA del pseudogen *CHMP4Bp1* mediante la técnica de PCR, se realizó la estandarización de los oligos específicos para este gen a partir del ajuste de la temperatura de alineación y el número de ciclos por reacción. Adicionalmente, se realizó la estandarización de los oligos para el gen constitutivo *TBP*, con el cual se normalizó la expresión de *CHMP4Bp1*.

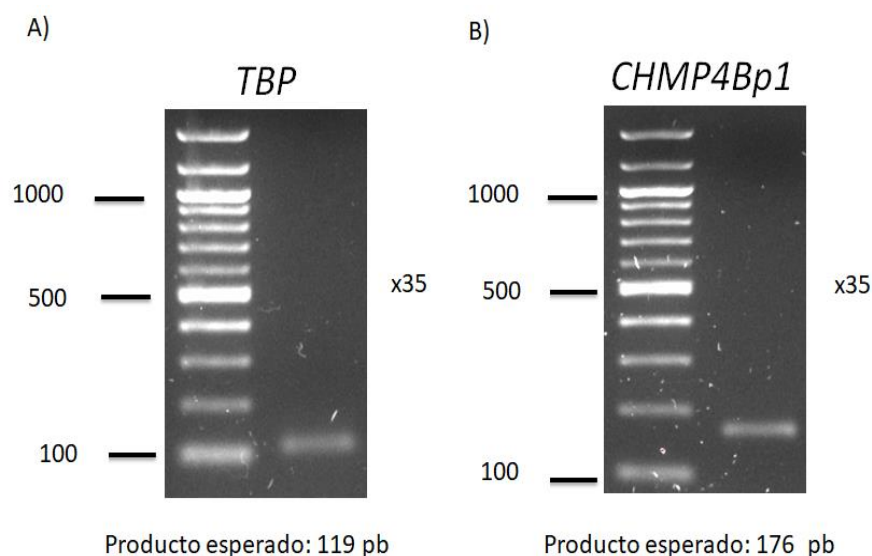


Figura 14. Estandarización de oligos para PCR. A) Gen *TBP*. B) Gen *CHMP4Bp1*.

Los productos se obtuvieron a los 35 ciclos de reacción para los oligos de *CHMP4Bp1* y *TBP*. La amplificación de los fragmentos se confirmó mediante el peso molecular e intensidad de la banda en geles de agarosa al 1.5% (Fig. 14). La TM estandarizada se ocupó en la PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real.

### 3. Expresión del pseudogen *CHMP4Bp1*

Después de establecidas las condiciones para la amplificación del mRNA, se realizó una PCR semi-cuantitativa para determinar si *CHMP4Bp1* cambia su expresión cuando las células son cultivadas en esferoide. Se observa que en BxPC-3 no hay cambios en la expresión de *CHMP4Bp1*, cuando las células son crecidas en esferoide (Fig. 15A). Por otro lado, en CFPAC-1 se observa un aumento en la expresión de *CHMP4Bp1*, cuando las células son cultivadas en esferoide. Aunque este resultado no es significativo ( $p \leq 0.05$ ), se observa una tendencia (Fig. 15B).

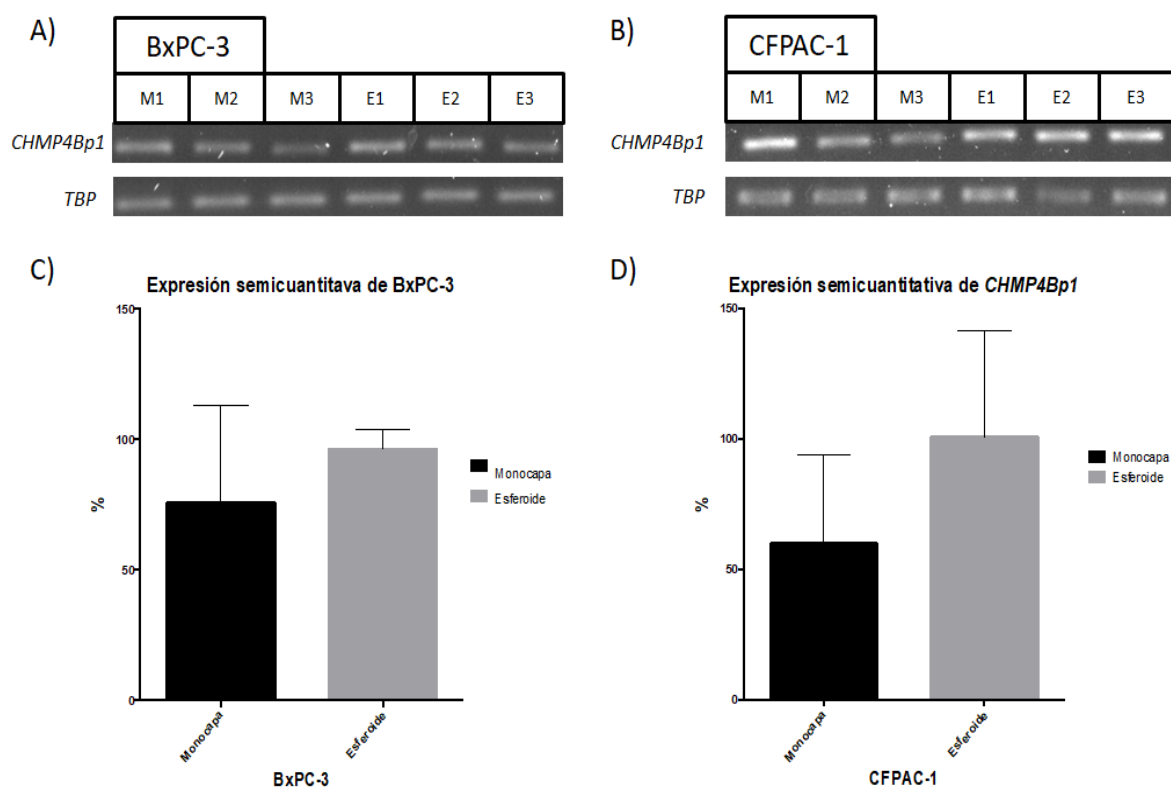


Figura 15. PCR semi-cuantitativa de *CHMP4Bp1*. Geles de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de *CHMP4Bp1* para: A) BxPC-3 en monocapa y esferoide; y, B) CFPAC-1 en monocapa y esferoide. Densitometría expresada en porcentaje de: C) BxPC-3 (n=3); y, D) CFPAC-1 (n=3). (M=Monocapa ; E=Esferoide).

Para determinar de manera semi-cuantitativa, se realizó un análisis de densitometría, en donde se calculó el promedio de las tres áreas de monocapa y las tres de esferoide, para cada línea celular. El análisis indica que en la línea BxPC-3, no hay cambios en la expresión de *CHMP4Bp1*, cuando las células son cultivadas en esferoide (Fig. 15C). En CFPAC-1, *CHMP4Bp1* se expresa más en los esferoides (Fig. 15D).

Para determinar la expresión del mRNA de *CHMP4Bp1* de manera cuantitativa, se realizó una RT-PCR en tiempo real. En la qPCR se observa que tanto en células de BxPC-3 como en CFPAC-1, existe un aumento en la expresión de *CHMP4Bp1*, cuando las células son cultivadas en esferoide (Fig. 16).

En BxPC-3 el cambio en la expresión, no es estadísticamente significativo porque el valor de p es mayor a 0.05 (Fig. 16A). En el caso de CFPAC-1, se puede observar que el cambio en la expresión entre monocapa y esferoide si es estadísticamente significativo debido a que el valor de p es menor a 0.05 (Fig. 16B).

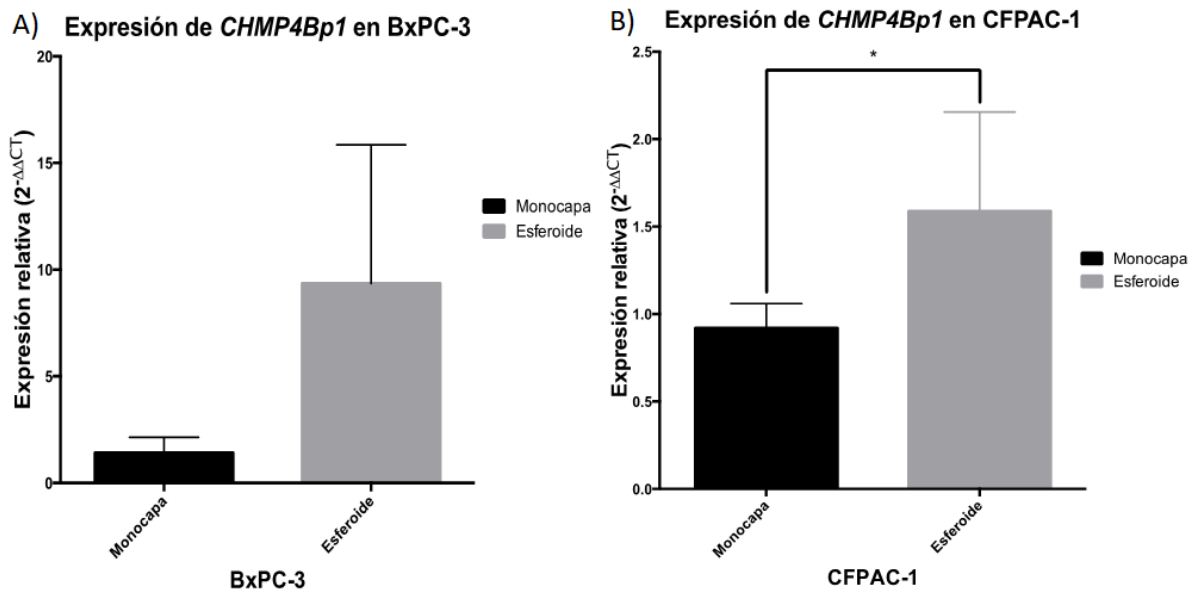


Figura 16. Nivel de expresión relativa de *CHMP4Bp1* cuando las células son crecidas en monocapa y esferoide. Expresión relativa de *CHMP4Bp1* en: A) BxPC-3; y, B) CFPAC-1. El asterisco indica la diferencia significativa entre los tipos de cultivo con una  $p \leq 0.05$ .

Debido a que el pseudogen *CHMP4Bp1* se encuentra en el intrón 1 del gen *FBXO34*, podría existir la posibilidad que durante el proceso de retrotranscripción con hexámeros aleatorios, se haya convertido a cDNA el pre-mRNA de *FBXO34*; lo cual, podría estar afectando el resultado observado durante la amplificación por RT-PCR y qPCR. Por lo anterior, de manera alterna se realizó una RT con oligo dT (n=1) y una posterior qPCR para observar si la tendencia se conserva.

En la Figura 17, se muestra que la tendencia previamente observada por la qPCR de cDNA obtenido a partir de hexámeros aleatorios se conserva cuando el cDNA es obtenido a partir de oligo(dT)<sub>20</sub>. En BxPC-3 y CFPAC-1 se observa que *CHMP4Bp1* aumenta su expresión cuando las células son cultivadas en esferoide. Los rangos obtenidos al realizar el cálculo de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para BxPC-3 esferoide fueron: rango inferior 5.17, rango superior 9.25; y para CFPAC-1: rango inferior 3.92, rango superior 7.20.

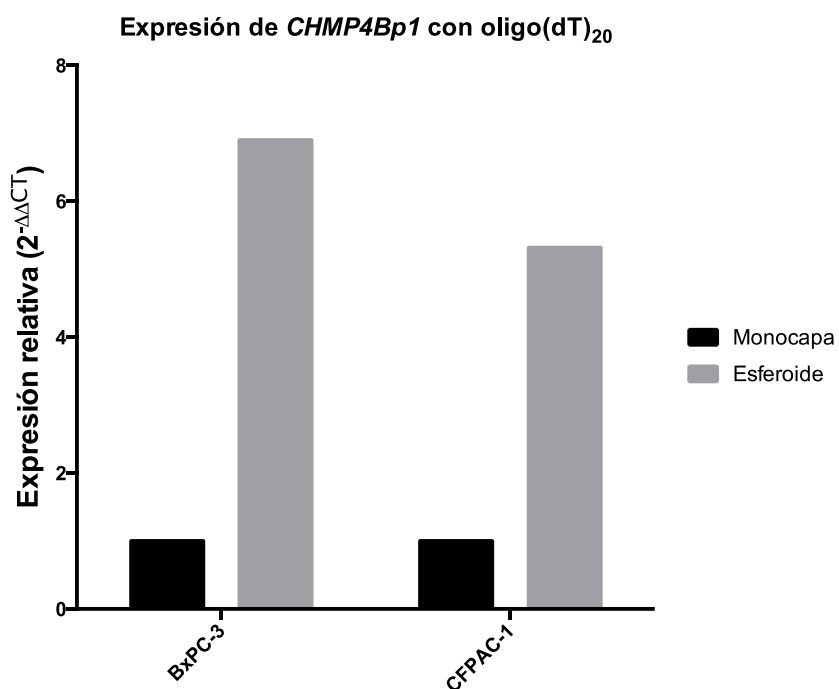


Figura 17. Nivel de expresión relativa de *CHMP4Bp1*. Expresión relativa de *CHMP4Bp1* en donde se utilizó la técnica de oligo(dT)<sub>20</sub> para la retrotranscripción del RNA a cDNA. En la líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1 cultivadas en esferoide.

#### 4. Conversión por Bisulfito de Sodio

Para determinar si el DNA se había convertido por Bisulfito de Sodio, se realizó una PCR metil-específica (MSP, por sus siglas en inglés) de una región del promotor CpG del gen *MUC2*. Los oligos empleados son los mismos utilizados por el equipo de Yamada, *et al*, en el 2006, para la región 1 del promotor. En este artículo se encuentra reportada la metilación de un 50% de esta región para la línea celular BxPC-3, por lo cual es un buen control positivo para DNA tratado con bisulfito de sodio (Yamada, *et al*, 2006).

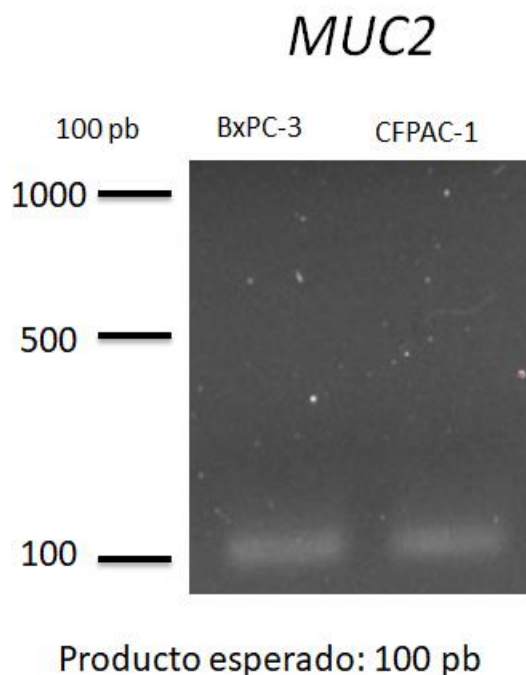


Figura 18. PCR metil-específica para el gen *MUC2* en las líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1

Al ser oligos específicos para DNA tratado con bisulfito de sodio, sólo amplifican el DNA convertido de manera exitosa. En la Figura 18, se observan los amplicones esperados para BxPC-3 (tratado con bisulfito de sodio) y CFPAC-1 (tratado con bisulfito de sodio).

## 5. Estandarización de la PCR-stepdown para la amplificación de DNA tratado con bisulfito de sodio

Para amplificar la región genómica de interés del pseudogen *CHMP4Bp1*, se realizó una PCR de DNA tratado con bisulfito mediante la técnica de PCR-stepdown. Los oligos específicos, se estandarizaron a partir del ajuste de las temperaturas de alineación y el número de ciclos por reacción. Los productos se obtuvieron de acuerdo con lo esperado por el programa BiSearch.

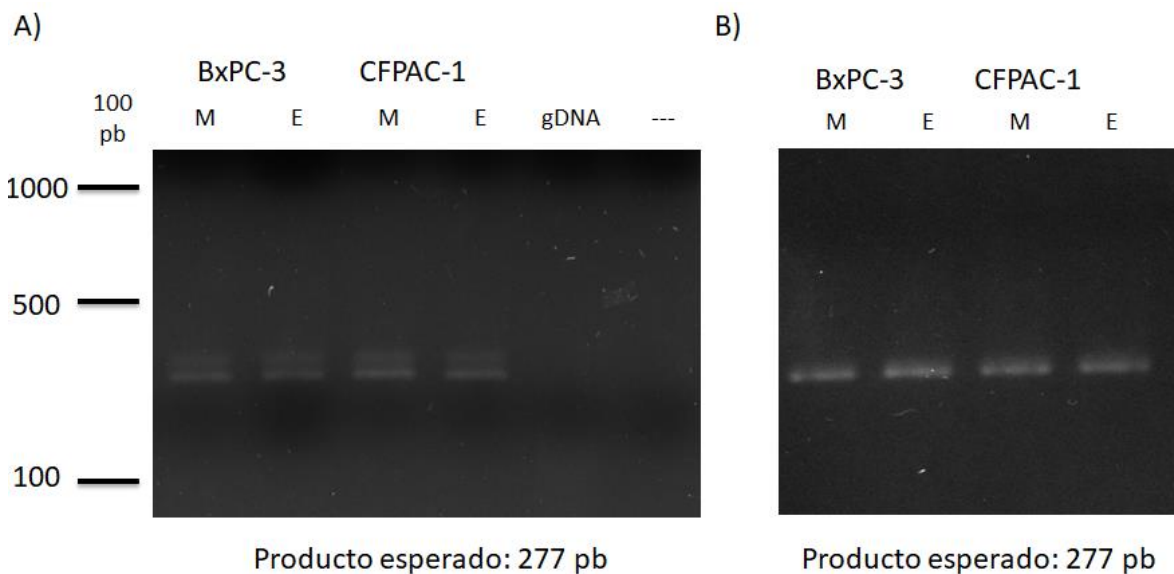


Figura 19. Estandarización de oligos para PCR de DNA tratado con Bisulfito de Sodio. A) PCR en Stepdown de las muestras de BxPC-3 (tratados con bisulfito de sodio) CFPAC-1 (tratado con bisulfito de sodio); gDNA (genómico) y control negativo. B) Productos de PCR de las líneas celulares BxPC-3 y CFPAC-1 enriquecidos. (M = monocapa; E = esferoide)

La amplificación de los fragmentos se confirmó mediante el peso molecular e intensidad de la banda en el gel. En la Figura 19A se observan productos para los DNA extraídos de las líneas celulares de BxPC-3 y CFPAC-1, las cuales fueron tratadas con Bisulfito de Sodio; no se observa amplificación en el gDNA, lo cual indica que los oligos, sólo amplifican el DNA tratado con Bisulfito de Sodio. En el gel de agarosa se observan dos bandas, por lo cual es probable que se haya amplificado un producto inespecífico.

Para aumentar la concentración del producto y eliminar la inespecificidad de los oligos, se optó por enriquecer la muestra mediante una PCR por Stepdown a los productos obtenidos. En la Figura 19B, se observa que el producto de PCR está dentro del tamaño esperado, con una banda más intensa y sin el producto inespecífico previamente observado.

## 6. Análisis bioinformático de la región secuenciada

Para determinar los elementos genómicos cercanos a la región de interés, se realizó un análisis de esta región en el *Genome Browser* (Kent, *et al*, 2002). El análisis bioinformático reveló que la región genómica secuenciada se encuentra a 500 pb del pseudogen *CHMP4Bp1*. La región secuenciada es una región genómica altamente regulada, pues se encuentra en una región enriquecida con las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me1; en una región sensible a DNasa 1; y sobre posibles regiones regulatorias, como: sitios de unión de moléculas reguladoras (regiones *ORegAnno*) y sitios de posibles promotores o potenciadores (regiones *GeneHancer*) (Fig. 20).

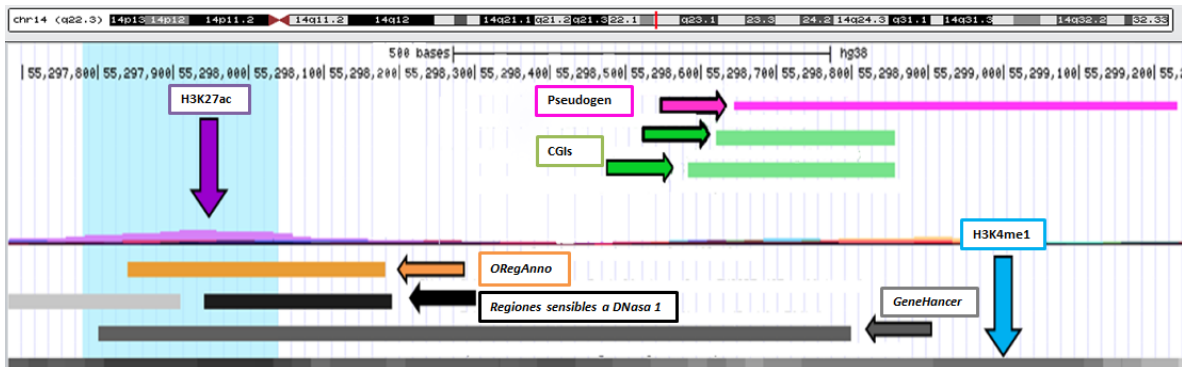


Figura 20. *Región genómica secuenciada*. Elementos genómicos cercanos a la región genómica secuenciada. La región secuenciada se encuentra marcada en color azul; las flechas de diferentes colores indican diferentes elementos genómicos. El enriquecimiento de marcas de histonas están marcadas con flechas de color morado (H3K27ac) y azul (H3K4me1); las regiones regulatorias están marcadas con flechas de color naranja (sitios *ORegAnno*) y gris (sitios *GeneHancer*); y, las regiones genómicas están marcadas con flechas de color negro (sitios sensibles a DNasa 1), verdes (regiones CGIs cercanas al TSS del pseudogen) y magenta (pseudogen *CHMP4Bp1*).



## 7. Cambios en los patrones de metilación en la región genómica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*

Los estados de metilación de la región genómica cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*, fueron determinados por secuenciación de tipo Sanger del producto clonado en el vector pTZ57R/T (Fig. 21). Es importante mencionar que en la región secuenciada existen dos dinucleótidos CpGs. El porcentaje de conversión por bisulfito de sodio en las muestras secuenciadas fue de un 97%.

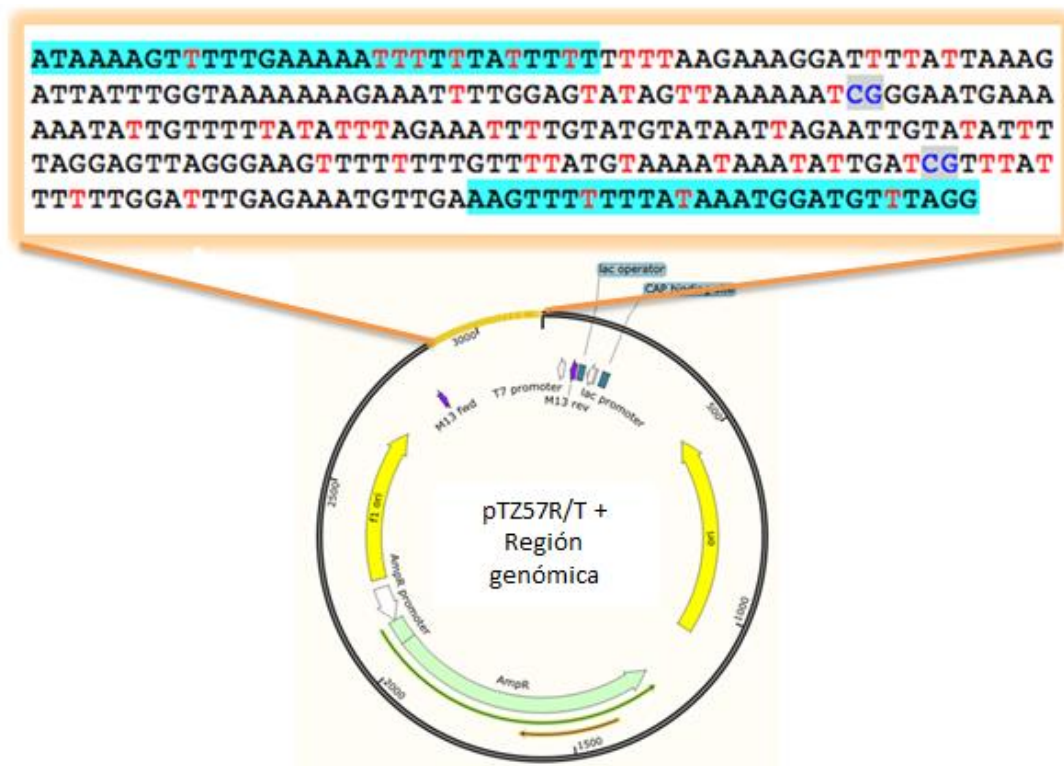


Figura 21. Construcción del vector más el producto secuenciado. La secuencia se encuentra convertida teóricamente por bisulfito de sodio; las Timinas marcadas en rojo son sitios donde originalmente se encontraba una Citosina; las CpGs, están marcadas en azul; y, los sitios de alineación de los oligos están subrayados en color azul celeste.

Los cambios en los estados de metilación se determinan cuando en un dinucleótido CpG, existe un cambio de C por T, esto indica que dicha región no está metilada. Las muestras secuenciadas para BxPC-3 y CFPAC-1, fueron de cultivos en monocapa y esferoide (4 colonias de cada uno), además se secuenciaron 2 colonias de DNA no tratado con bisulfito de sodio (control).

En la línea celular BxPC-3, la primera CpG se encuentra desmetilada, tanto en monocapa como en esferoide. En la segunda CpG, existen cambios en los estados de metilación de monocapa a esferoide. En monocapa esta región se encuentra metilada en un 50%; mientras que en esferoide esta región no se encuentra metilada (Fig. 22).

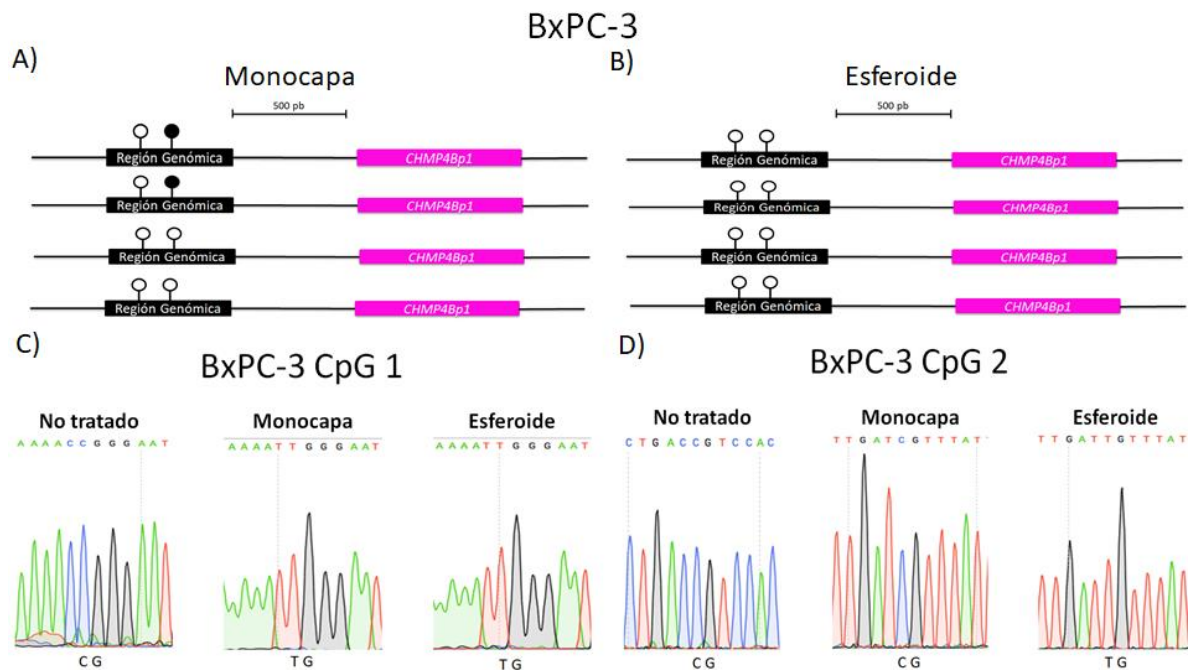


Figura 22. Secuenciación de DNA tratado por bisulfito de sodio de la región genómica en la línea celular BxPC-3. Representación esquemática de la región genómica secuenciada (negro) y el pseudogen *CHMP4Bp1* (magenta), A) en BxPC-3 monocapa (n=4); y, B) en esferoide (n=4). C) Electroferogramas de la primera CpG de la región genómica secuenciada; y, D) de la segunda CpG. En ambos electroferogramas se observan los gráficos representativos, para el control (no tratado) y para BxPC-3 (monocapa y esferoide). Nota. Las bolitas blancas representan regiones no metiladas; las bolitas negras representan regiones metiladas.

De manera similar en la línea celular CFPAC-1, la primera CpG se encuentra desmetilada, tanto en monocapa como en esferoide. En la segunda CpG, existen cambios en los estados de metilación de monocapa a esferoide. En monocapa esta región se encuentra metilada en un 25%; mientras que en esferoide esta región no se encuentra metilada (Fig. 23).

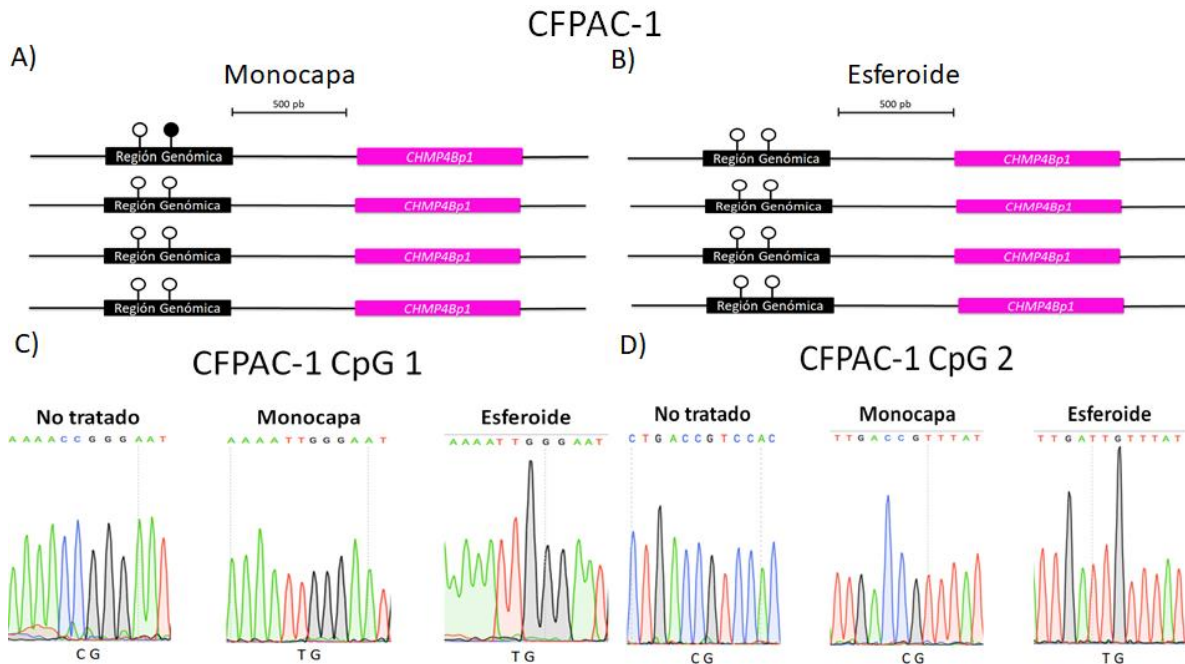


Figura 23. Secuenciación de DNA tratado por bisulfito de sodio de la región genómica en la línea celular CFPAC-1. Representación esquemática de la región genómica secuenciada (negro) y el pseudogen *CHMP4Bp1* (magenta), A) en CFPAC-1 monocapa (n=4); y, B) en esferoide (n=4). C) Electroferogramas de la primera CpG de la región genómica secuenciada; y, D) de la segunda CpG. En ambos electroferogramas se observan los gráficos representativos, para el control (no tratado) y para CFPAC-1 (monocapa y esferoide). Nota. Las bolitas blancas representan regiones no metiladas; las bolitas negras representan regiones metiladas.

Para determinar de manera cuantitativa, si el cambio en el estado de metilación de la región CpG ya mencionada era estadísticamente significativo, se realizó una prueba de  $\chi^2$  y un análisis de Fisher. El análisis (Fig. 24) no reveló significancia estadística (p mayor a 0.05), pero se observó una evidente tendencia a la pérdida de metilación cuando las células son cultivadas en esferoide, en ambas líneas celulares.

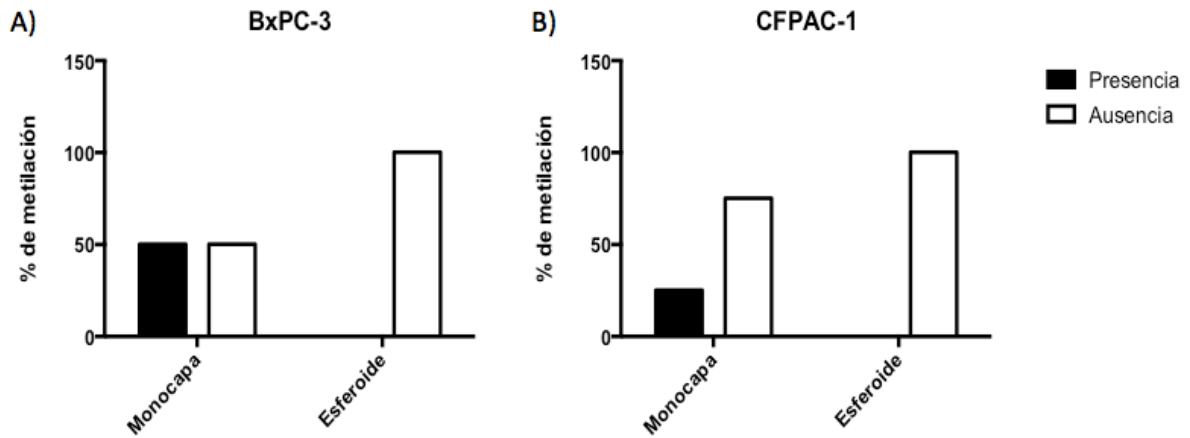


Figura 24. *Presencia y ausencia de metilación en la segunda CpG.* El análisis se realizó con una prueba de  $\chi^2$  y una análisis de Fisher, en ambos casos, no se encontró diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) ( $n=4$ ), para BxPC-3 o CFPAC-1. A) BxPC-3. B) CFPAC-1. Nota. Las barras negras indican presencia de CpG metiladas; mientras que las barras blancas indican ausencia de CpGs metiladas.

## IX. Discusión de resultados

El cáncer de páncreas representa un problema de salud pública, la sobrevivencia en este tipo de cáncer es menor al 5%. En los últimos años ha existido un gran esfuerzo por entender los eventos moleculares que se encuentran relacionados con el origen y progresión de este tipo de cáncer. Uno de los más novedosos son los cambios en los estados de metilación del DNA. En el cáncer de páncreas se ha demostrado que cambios en los estados de metilación del DNA, están relacionados con la iniciación y la progresión del cáncer, así como en la formación de los tumores (Hong, et al, 2011; Quilichini y Haumaitre, 2015; Sato y Goggins, 2006). En el trabajo presente demostramos cambios en los estados de metilación en la región cercana a *CHMP4Bp1* y cambios en su nivel de expresión.

Los modelos de cultivo celular en monocapa, son ineficientes para representar la biología de un tumor. Por otro lado, los cultivos en esferoides representan de manera más exacta las interacciones y gradientes presentes en los tumores. En los últimos años, se ha utilizado este modelo para estudiar nuevos biomarcadores, así como nuevos tratamientos (Kapałczyńska, et al, 2016). En el estudio de la epigenética, los esferoides son una herramienta para el mejor entendimiento y comprensión de los procesos epigenéticos que se desarrollan durante la carcinogénesis (Postovit, et al, 2006).

En este estudio cultivamos los esferoides en ausencia de factores externos de crecimiento y en una matriz de agarosa. Los esferoides de la línea celular BxPC-3, alcanzaron su tamaño máximo (aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ ) entre el día 8 al 10, en estas condiciones, lo que coincidió con lo previamente reportado (Longati, et al, 2013 ; Ware, et al, 2016). Por otro lado, los esferoides de la línea celular CFPAC-1, crecen con un tamaño aproximado de 100  $\mu\text{m}$ , en aproximadamente una semana, concordando con los resultados observados (Qu, et al, 2005, Herreros-Villanueva, et al, 2016).

La expresión diferencial de genes, en cultivos en esferoide ha sido demostrada (Kim, *et al*, 2012), este fenómeno también se observa en esferoides de cáncer de páncreas (Longati, *et al*, 2013). En este proyecto, se analizó la expresión diferencial del pseudogen *CHMP4Bp1* en cultivo en esferoide.

En el análisis de la expresión del mRNA del pseudogen *CHMP4Bp1* se encontró que en la línea BxPC-3 existe un aumento al ser cultivada en esferoide (estadísticamente no significativo); mientras que en CFPAC-1 el aumento si es estadísticamente significativo, cuando las células se mantienen en este tipo de cultivo.

En el proceso de transcripción en eucariontes, la RNA polimerasa II transcribe tanto intrones como exones, sintetizando una versión previa al mRNA conocido como pre-mRNA (Pandya-Jones, 2011). Para que el pre-mRNA no sea degradado y pueda cumplir su función, es necesario que ocurra un proceso de maduración por parte de la maquinaria de transcripción. La maduración del mRNA consiste en la adición de una caperuza (7-metilguanosina) en el extremo 3'; el corte y empalme de los intrones; y, la adición de una cola de poli(A) en el extremo 5' (Proudfoot, 2000; Hocine, *et al*, 2010).

En estudios recientes se ha demostrado que los procesos de corte y empalme en humanos ocurren muy temprano en la síntesis del RNA, siendo un proceso que ocurre casi co-trasncripcionalmente, para genes codificantes y en algunos ncRNAs. Por lo cual, la adición de la cola de poli(A) ocurre posterior al corte y empalme de los intrones (Nojima, *et al*, 2015; Schlackow, *et al*, 2017).

Debido a que el pseudogen *CHMP4Bp1* se encuentra en el intrón 1 del gen *FBXO34* (Kent, *et al*, 2002), podría existir la posibilidad que el efecto observado sea consecuencia del pre-mRNA de *FBXO34* y no del mRNA de *CHMP4Bp1*. Por lo que, se realizó una qRT-PCR de cDNA obtenido a partir de oligo(dT)<sub>20</sub>. La síntesis de cDNA por oligo(dT)<sub>20</sub>, ocurre solamente de mRNA que tenga una cola

de poli(A) (Krug y Berger, 1987), es decir mRNA que es maduro y libre de intrones. Los resultados mostraron la misma tendencia observada anteriormente en la síntesis de cDNA con hexámeros aleatorios. Por lo tanto, podemos decir que existe un aumento de expresión de *CHMP4Bp1* cuando las células son cultivadas en esferoide.

La regulación de la transcripción y la expresión de genes en células eucariontes es el resultado del efecto sinérgico de la estructura del DNA (cromatina); las interacciones entre las proteínas, llamadas factores de transcripción (Philips, 2008); y de regiones genómicas como los potenciadores (Ong y Corces, 2011). La estructura de la cromatina, la interacción de factores de transcripción y la activación de elementos regulatorios, depende de diversos factores epigenéticos como la metilación del DNA (Allis y Jenuwein, 2016).

El microarreglo de metilación que se realizó en nuestro grupo de estudio, nos indica que la región cercana al pseudogen *CHMP4Bp1*, cambió su estado de metilación de manera significativa. Esta región de acuerdo con el análisis bioinformático, nos podría estar sugiriendo que sea una región regulatoria importante.

La región genómica que estudiamos está enriquecida con las marcas epigenéticas H3K27ac y la H3K4me1 (Fig 20). Estas marcas se encuentran asociadas a potenciadores activos H3K27ac (Creyghton, *et al*, 2010) y H3K4me1 (Calo y Wysocka, 2013). Los potenciadores, se encuentran en regiones de cromatina abierta revelados por la digestión con la enzima DNasa 1, a estas regiones se les conoce como regiones sensibles a DNasa 1 (Bulger y Groudine, 2011), característica presente en la región secuenciada.

Esta región también se encuentra en una región *ORegAnno* (del inglés, *Open Regulatory Annotation database*). Estas son regiones regulatorias donde existen sitios de unión a factores de transcripción, a RNA, variantes regulatorias,

haplotipos y otros elementos regulatorios (Lesurf, *et al*, 2016). En esta región también se encuentra una región de *GeneHancer*, las cuales son posibles sitios de promotores o potenciadores (Fishilevich, *et al*, 2017). Por lo cual, podemos sugerir que la región secuenciada es un potenciador; esto explicaría porque existe expresión del pseudogen incluso en cultivo en monocapa, para ambas líneas celulares.

La secuenciación del posible potenciador reveló que en monocapa existe un 50% de metilación para BxPC-3 y un 25% de metilación para CFPAC-1 en una CpG. En esferoide, para ambas líneas celulares, existe un proceso de pérdida de la 5mC (hipometilación). Los cambios en la metilación del DNA, no son estadísticamente significativos, debido a que la  $n$  muestral es muy pequeña. El tamaño de la  $n$ , afecta la significancia estadística en un experimento (Zoolman, 1993).

A pesar que un valor de  $p$  no significativo puede llevar a una mala interpretación de los datos por el sesgo del investigador (Hewitt, *et al*, 2008), los previos reportes de hipometilación global en cáncer de páncreas y su relación con la malignidad y tumorigenicidad (Gama-Sosa, *et al*, 1983; Hong, *et al*, 2011), así como los cambios en el microarreglo de metilación, nos pueden indicar que la tendencia observada en la secuenciación de esta región se relaciona con el cultivo de células en esferoide.

Los potenciadores regulan la expresión de los genes en ambas direcciones del potenciador, así como regular la expresión de genes a cientos o miles de pares de bases de distancia (Andersson, 2014). Por lo cual, no podemos afirmar si el potenciador afecta al gen *FBXO34*, al pseudogen *CHMP4Bp1* o ambos.

Actualmente se sabe que los potenciadores de genes en mamíferos, pueden transcribirse y generar ncRNAs (Erokhin, *et al*, 2015). Estos transcritos juegan un papel importante en la transcripción y regulación de genes proximales, y en



enfermedades como el cáncer estos transcritos se encuentran desregulados (Ding, et al, 2018).

Los análisis bioinformáticos disponibles en el *GeneHancer* indican que el pseudogen *CHMP4Bp1* puede estar siendo regulado por un potenciador (Fishilevich, et al, 2017). Esta evidencia, nos podría sugerir que el potenciador que nosotros estudiamos puede estar afectando la expresión del pseudogen; sin embargo, son requeridos más experimentos para establecer una relación directa.

La metilación del DNA es una marca epigenética asociada al silenciamiento génico (Meng, et al, 2015). Los mecanismos por los cuales la metilación del DNA silencia a los genes son, mediante el reclutamiento de proteínas asociadas a la formación de cromatina (Jones, et al, 1998; Bird y Wolffe, 1999) o por el impedimento directo de la unión de factores de transcripción (Campanero, et al, 2000).

Como ya se mencionó anteriormente, la metilación del DNA no actúa como un evento iniciador del silenciamiento génico, sino como un bloqueo en el estado ya silenciado (Deaton y Bird, 2011), por lo que, el hecho de que en un cultivo en esferoide se observe la hipometilación de regiones genómicas como potenciadores, indicaría que otros mecanismos epigenéticos que controlan el silenciamiento de esta región podrían estar alterados de igual manera.

El efecto de la 5mC en los potenciadores aún permanece como un misterio, sin embargo; se sabe que la presencia de 5mC en potenciadores es antagónica, es decir, cuando una región génica está enriquecida con marcas de histonas relacionadas con potenciadores, estas zonas generalmente se encuentran hipometiladas (Calo y Wysocka, 2013). Por lo cual, la pérdida de la metilación en esta región podría indicar que el potenciador se está activando e induciendo la activación de sus genes blanco.

Es importante mencionar que sólo encontramos cambios en los estados de metilación en una CpG del potenciador; sin embargo, no secuenciamos toda la región regulatoria, por lo que podrían existir más cambios en esta zona. Existen reportes en donde el cambio en los estados de metilación del DNA en unas cuantas CpGs, si afectan la expresión del gen, como es el caso de *RANKL* en células del sistema óseo (Kitazawa y Kitazawa, 2007).

A nivel biológico, la hipometilación en regiones específicas que regulan la expresión de genes, puede estar contribuyendo a la formación y al desarrollo de los tumores, porque activan genes involucrados en procesos carcinogénicos (Ehrlich, 2009). La hipometilación observada, es posible que pueda tener dos posibles orígenes: 1) pérdida en la actividad de las DNMTs, a causa de daños en el genoma (Zhang y Xu, 2017); y 2) debido a la hipoxia generada por el cultivo en esferoides (Shahzad, 2007).

Los pseudogenes, si bien son definidos como genes que han perdido su funcionalidad, existen algunos que tienen funciones regulatorias y epigenéticas. Actualmente los pseudogenes están empezando a considerarse como ncRNAs y como posibles blancos terapéuticos (Roberts y Morris, 2013).

El pseudogen *CHMP4Bp1* analizado en este estudio, aún no tiene una función reportada; sin embargo, está expresado diferencialmente en muchos tejidos (Weizmann Institute of Science, 1996-2007). Aquí demostramos que la expresión de *CHMP4Bp1* aumenta cuando las células son cultivadas en esferoide y se encuentra en una zona transcripcionalmente activa y muy regulada, por lo cual, podemos suponer que podría tener alguna función regulatoria en el proceso carcinogénico. Para determinar si *CHMP4Bp1* tiene o no alguna función, es necesario realizar más estudios.

## X. Conclusiones

- *CHMP4Bp1* aumenta su expresión cuando las células son cultivadas en esferoide; con diferencia estadísticamente significativa en la línea celular CFPAC-1 ( $p=0.039$ ) y sin significancia estadística en BxPC-3 ( $p=0.12$ ).
- Existe cambio en los estados de metilación de la región secuenciada. En el cultivo de esferoides, esta región se hipometila.
- La disminución en los patrones de metilación de la región secuenciada podría afectar la expresión del mRNA del pseudogen *CHMP4Bp1*.
- La región secuenciada de acuerdo con el análisis bioinformático, indica la presencia de un potenciador.

## XI. Perspectivas

- Determinar la relación experimental entre el potenciador, el gen *FBOX34* y el pseudogen *CHMP4Bp1*.
- Determinar los patrones de metilación de las Islas CpG que se encuentra dentro del pseudogen *CHMP4Bp1*.
- Determinar si existen cambios en la misma región, en diferentes líneas celulares de cáncer.
- Determinar si *CHMP4Bp1* tiene un papel en el desarrollo de las células tumorales.

## XII. Referencias

1. Allis, C. D., y Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500.
2. Aran, D., & Hellman, A. (2013). DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell*, 154(1), 11–13.
3. Aran, D., Sabato, S., & Hellman, A. (2013). DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biology*, 14(3), R21.
4. Andersson, R. (2014). Promoter or enhancer, what's the difference? Deconstruction of established distinctions and presentation of unifying model. *Bioessays*, 36, 1–10.
5. Bardeesy, N., y DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897–909.
6. Bell, R. E., Golan, T., Sheinboim, D., Malcov, H., Amar, D., Salamon, A., Liron, T., Gelfman, S., Gabet, Y., Shamir, R., & Levy, C. (2016). Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality. *Genome Research*, 26, 601–611.
7. Bird, A. P., & Wolffe, A. P. (1999). Methylation-Induced Repression— Belts, Braces, and Chromatin. *Cell*, 99(5), 451–454.
8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin*, Published online 12 September 2018; <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492> . Consultado el 6 de octubre del 2018
9. Bulger, M., & Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 144(3), 327–339.
10. Campanero, M. R., Armstrong, M. I., & Flemington, E. K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6481–6486.
11. Calo, E., & Wysocka, J. (2010). Modification of enhancer chromatin: what, how and why? *Mol Cell*, 8(24), 4017–4018.
12. Chakravarthi, B. V. S. K., Nepal, S., & Varambally, S. (2016). Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *American Journal of Pathology*, 186(7), 1724–1735.
13. Creighton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Frampton, G. M., Sharp, P. A., Boyer, L. A., Young R. A., & Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21931–21936.

14. Deaton, A., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development, 25*(10), 1010–1022.
15. Desrochers, T. M., Shamis, Y., Alt-holland, A., Kudo, Y., Takata, T., Wang, G., Jackson-Grusby L., & Garlick, J. A. (2012). The 3D tissue microenvironment modulates DNA methylation and E-cadherin expression in squamous cell carcinoma. *Epigenetics, 7*(1), 34–46.
16. Ding, M., Liu, Y., Liao, X., Zhan, H., Liu, Y., & Huang, W. (2018). Enhancer RNAs (eRNAs): New Insights into Gene Transcription and Disease Treatment. *Journal of Cancer, 9*(13), 2334–2340.
17. Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene, 21*(35), 5400–13.
18. Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics, 1*(2), 239–25
19. Erokhin, M., Vassetzky, Y., Georgiev, P., & Chetverina, D. (2015). Eukaryotic enhancers: Common features, regulation, and participation in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences, 72*(12), 2361–2375.
20. Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine, 358*(11), 1148–1159.
21. Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., & Lippincott-schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108*(12), 4846–51.
22. Falasca, M., Kim, M., y Casari, I. (2016). Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1865*(2), 123–132.
23. Fishilevich, S., Nudel, R., Rappaport, N., Hadar, R., Plaschkes, I., Iny Stein, T., Rosen, N., Kohn, A., Twik, M., Safran, M., Lancet, D., & Cohen, D. (2017). GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation, 2017*, 1–17.
24. Fleischer, T., Tekpli, X., Mathelier, A., Wang, S., Nebdal, D., Dhakal, H. P., Kleivi-Sahlberg, K., Schichting, E., Borresen-Dale, A., L., Borgen E., Naume, B., Eskeland, R., Frigessi, A., Tost, J., Hurtado, A., & Kristensen, V. N. (2017). DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages. *Nature Communications, 8*(1379), 1–14.
25. Gallardo-Pérez, J. C., Espinosa-Castilla, M., Meléndez-Zajgla, J., & Maldonado-Lagunas, V. (2006). Esferoides Tumorales Multicelulares en la Evaluación de Estrategias Terapéuticas Anticancerosas. *REB, 25*(4), 101–107.
26. Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., & Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Research, 11*(19), 6883–6894.

27. Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(October), 621–637.
28. Hamburger, A., & Salmon, S. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 9(978), 9–11.
29. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
30. Herreros-Villanueva, M., Zhang, J., S., Koenig, A., Abel, E. V, Smyrk, T. C., Bamlet, W. R., de Narvajias, A., A., M., Gómez, T. S., Simeone, D., M., Bujanda, L., & Billadeau, D. (2013). SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 2(8), e61.
31. Hewitt, C. E., Mitchell, N., Torgerson, D. J., Hewitt, C., & Torgerson, D. (2008). Heed the data when results are not significant. *BMJ*, 336(January), 23–25.
32. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, 148(1), 3–15.
33. Hocine, S., Singer, R. H., & Grünwald, D. (2010). RNA processing and Export. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000752.
34. Hong, S. M., Park, J. Y., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Molecular signatures of pancreatic cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(6), 716–27.
35. Hu, B., Jiang, D., Chen, Y., Wei, L., Zhang, S., Zhao, F., Ni, R., Lu, C., & Wan, C. (2015). High CHMP4B expression is associated with accelerated cell proliferation and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 36(4), 2569–2581.
36. Jin, J. (2004). (2001). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes & Development*, 18(1), 2573–2580.
37. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492.
38. Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., & Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19, 187–191.
39. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 6736(16), 1–13.
40. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Blizniak, R., Luczewski, L., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, (November), 1–10.
41. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC . *Genome Res*.2002 Jun;12(6):996-1006.

42. Kim, H., Phung, Y., & Ho, M. (2012). Changes in Global Gene Expression Associated with 3D Structure of Tumors: An Ex Vivo Matrix-Free Mesothelioma Spheroid Model. *PLoS ONE*, 7(6), e39556.
43. Kitazawa, R., & Kitazawa, S. (2007). Methylation Status of a Single CpG Locus 3 Bases Upstream of TATA-Box of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Gene Promoter Modulates Cell- and Tissue-Specific RANKL Expression and Osteoclastogenesis. *Molecular Endocrinology*, 21(1), 148–158.
44. Kovalenko, T. F., Sorokina, A. V., Ozolinya, L. A., & Patrushev, L. I. (2013). Methylation of the pseudogene PTENP1 5'-terminal region in endometrial cancer and hyperplasia. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(4), 397–405.
45. Krug, M. S., & Berger, S. L. (1987). First-Strand cDNA Synthesis Primed with Oligo(dT). *Methods in Enzymology*, 152(C), 316–325.
46. Lesurf, R., Cotto, K. C., Wang, G., Griffith, M., Kasaian, K., Jones, S. J., Montgomery, S. B., & Griffith, O. L. (2016). ORegAnno 3.0: A community-driven resource for curated regulatory annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D126–D132.
47. Long, C., Yin, B., Lu, Q., Zhou, X., Hu, J., Yang, Y., Yu, F., & Yuan, Y. (2007). Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Investigation*, 25(8), 685–690.
48. Longati, P., Jia, X., Eimer, J., Wagman, A., Witt, M., Rehnmark, S., Verbeke, C., Toftgard, R., Löhr, M., & Heuchel, R. L. (2013). 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*, 13(95), 1–13.
49. Maitra, A., & Hruban, R. (2008). Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol*, (3), 157–188.
50. Meng, H., Cao, Y., Qin, J., Song, X., Zhang, Q., Shi, Y., & Cao, L. (2015). DNA methylation, its mediators and genome integrity. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 604–617.
51. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), 7687–7691.
52. Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A. R. F., Kimura, H., Dye, M. J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., & Proudfoot, N. J. (2015). Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing. *Cell*, 161(3), 526–540.
53. Ong, C.T., & Corces, V. G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific expression. *Nat Rev Genet*, 12(4), 283–293.
54. Pandol, S., Gukovskaya, A., Edderkoui, M., Dawson, D., & Eibl, G. (2013). Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: Role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol*, 27(0 2), 127–134.



55. Pandya-Jones, A. (2011). Pre-mRNA splicing during transcription in the mammalian system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(5), 700–717.
56. Pastor, W. A., Aravind, L., y, Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(6), 341–56.
57. Paullin, T., Powell, C., Menzie, C., Hill, R., Cheng, F., Martyniuk, C. J., & Westerheide, S. D. (2017). Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses. *PloS One*, 12(8), 1–19.
58. Phillips, T. (2008) Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education* 1(1):199
59. Poliseno, L., Marranci, A., & Pandolfi, P. P. (2015). Pseudogenes in Human Cancer. *Frontiers in Medicine*, 2(September), 1–8.
60. Postovit, L.M., Seftor, E., Seftor, R. E. B., & Hendrix, M. J. C. (2006). A Three-Dimensional Model to Study the Epigenetic Effects Induced by the Microenvironment of Human Embryonic. *Stem Cells*, 24, 501–505.
61. Proudfoot, N. J. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *TIBS*, 25(June), 290–293.
62. Qu, C. F., Song, Y. J., Rizvi, S. M. A., Li, Y., Smith, R., Perkins, A., Morgenstern, A., Brechbiel, M., & Allen, B. J. (2005). In Vivo and in Vitro inhibition of pancreatic cancer growth by targeted alpha therapy using 213Bi-CHX.A-C595. *Cancer Biology & Therapy*, 4(8), 848.854.
63. Quilichini, E., & Haumaitre, C. (2015). Implication of epigenetics in pancreas development and disease. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(6), 883–98.
64. Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research*, 74(11), 2913–2921.
65. Roberts, T. C., & Morris, K. V. (2013). Not so pseudo anymore: Pseudogenes as therapeutic targets. *Pharmacogenomics*, 14(16), 2023–2034.
66. Sagona, A. P., Nezis, I. P., & Stenmark, H. (2014). Association of CHMP4B and autophagy with micronuclei: Implications for cataract formation. *BioMed Research International*, 2014, 1–10.
67. Sato, N., y Goggins, M. (2006). The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 13(4), 286–295.
68. Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., Adenocarcinoma, D., Heek, N. T. Van, Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C. A., Rosty, C., & Goggins, M. (2003). Frequent Hypomethylation of Multiple Genes Overexpressed in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Frequent

- Hypomethylation of Multiple Genes Overexpressed in Pancreatic. *Cancer Research*, 63(12), 4158–4166.
69. Schlackow, M., Nojima, T., Gomes, T., Dhir, A., Carmo-Fonseca, M., & Proudfoot, N. J. (2017). Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs. *Molecular Cell*, 65(1), 25–38.
70. Secretaria de Salud. (2016). 160 mil nuevos casos de cáncer al año en México. Disponible: <https://www.gob.mx/salud/prensa/160-mil-nuevos-casos-de-cancer-al-ano-en-mexico>, consultado el 29 de noviembre 2017.
71. Shahrzad, S., Bertrand, K., Minhas, K., & Coomber, B. L. (2007). Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics*, 2(2), 119–125.
72. Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27–36.
73. Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, *Nature methods* 9 (7): 671-675, PMID 229398234 (en Google Scholar).
74. Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S. B., Kern, S. E., & Herman, J. G. (1997). Abrogation of the Rb / p16 Tumor-suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas Advances in Brief Abrogation of the Rb / p16 Tumor-suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas. *Cancer Research*, 57(15), 3126–3130y
75. Shlyueva, D., Stampfel, G., & Stark, A. (2014). Transcriptional enhancers : from properties to genome-wide predictions. *Nature Publishing Group*, 15(4), 272–286.
76. Smith, Z. D., y Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204–220.
77. Stratton, M. R., Campbell, P. J., y Andrew F, P. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724.
78. Stuffers, S., Brech, A., & Stenmark, H. (2009). ESCRT proteins in physiology and disease. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1619–1626.
79. Tutar, Y. (2012). Pseudogenes. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 6–9.
80. Tusnady, G. E., Simon, I., Varadi, A., & Aranyi, T. (2005). BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(1), e9.
81. Umar, A., Dunn, B. K., y Greenwald, P. (2012). Future directions in cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 835–848.
82. Van Kampen, J. G. M., Marijnissen-van Zanten, M. A. J., Simmer, F., Van der Graaf, W. T. A., Ligtenberg, M. J. L., & Nagtegaal, I. D. (2014). Epigenetic targeting in pancreatic cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), 656–664.
83. Ware, M. J., Keshishian, V., Law, J. J., Ho, J. C., Favela, C. A., Smith, B., Mohammad, S., Hwang, R. F., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Huang, S., Edwards, D. P., Corr, S. J., Godin, B.,

- & Curley, S. A. (2016). Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials*, *108*, 129–142.
84. Weinberg, R. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, (September), 62–70.
85. Wu, H., Chen, Y., Liang, J., Shi, B., Wu, G., Zhang, Y., Wang, D., Li, R., Zhang, H., Sun, L., & Shang, Y. (2005). Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature*, *438*(7070), 981–987.
86. Weizmann Institute of Science, 1996-2007. GeneCards: *CHMP4Bp1* gene (pseudogene). Disponible en: <http://www.genecard.org> , consultado el 9 de noviembre del 2016.
87. Weiswald, L. B., Bellet, D., y Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *17*(1), 1–15.
88. Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-schwartz, J., & James, H. (2009). Membrane Scission by the ESCRT-III Complex. *Nature*, *458*(7235), 172–177.
89. Xiao-Jie, L., Ai-Mei, G., Li-Juan, J., & Jiang, X. (2015). Pseudogene in cancer: real functions and promising signature. *Journal of Medical Genetics*, *52*(1), 17–24.
90. Yamada, N., Hamada, T., Goto, M., Tsutsumida, H., Higashi, M., & Nomoto, M. (2006). MUC2 expression is regulated by histone H3 modification and DNA methylation in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, *119*, 1850–1857.
91. Zhang, W., & Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomarker Research*, *5*(1), 1.
92. Zolman, J. (1993). *Biostatistics Experimental Design and Statistical Inference*. New York: Oxford University Press.