



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR EPIGENÉTICO BORIS (*CTCF*) EN
LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN
CÁNCER DE OVARIO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA:
TATIANA MALDONADO HUERTA**

**TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
[Universidad Autónoma Metropolitana](#)**

**COMITÉ TUTOR:
Dra. Langley McCarron Elizabeth
[Instituto Nacional de Cancerología](#)
Dr. Flores Jasso Fabian
[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)**

Ciudad de México. Diciembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE CONTENIDO

1. ÍNDICE DE FIGURAS	3
2. ABREVIATURAS	4
3. RESUMEN	5
4. ABSTRACT	6
5. INTRODUCCIÓN	7
5.1. Cáncer de ovario	7
5.1.1. Alteraciones moleculares y celulares en COE.....	11
5.2. El factor nuclear CTCF	14
5.2.1. Las funciones de CTCF	15
5.3. El gen <i>CTCF</i> (<i>CCCTC-binding factor like</i>) y su proteína BORIS.....	17
5.3.1. El gen <i>CTCF</i> (<i>CCCTC-binding factor like</i>)	17
5.3.2. La regulación de la expresión de <i>CTCF</i>	17
5.3.3. La proteína BORIS	18
5.3.4. La unión de BORIS al ADN.....	18
5.3.5. Las funciones de BORIS.	19
5.3.6. BORIS en cáncer.....	20
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
7. HIPÓTESIS	23
8. OBJETIVOS	23
8.1.1. Objetivo general.....	23
8.1.2. Objetivos particulares	23
9. RESULTADOS	24
9.1. El análisis de enriquecimiento de vías de <i>nov</i> de genes diferencialmente expresados (DEG) en OVCAR3.....	24
9.2. El análisis de enriquecimiento funcional.....	25
9.3. El análisis de expresión de muestras de ovario neoplásicas y sanas.	27
9.4. El análisis de la región promotora de <i>VEGFA</i> y su regulación por BORIS y CTCF	30
10. DISCUSIÓN	34

11. CONCLUSIÓN	38
12. PERSPECTIVAS	39
13. MÉTODOS	40
13.1. Los análisis de enriquecimiento de vías <i>de novo</i>	40
13.2. El análisis de enriquecimiento funcional.....	40
13.3. La determinación de la expresión génica en muestra de ovario neoplásicas y sanas 41	
13.4. El análisis de la región promotora de <i>VEGFA</i>	41
14. BIBLIOGRAFÍA	43
15. SUPLEMENTARIAS	50
16. PUBLICACIONES GENERADAS	53

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación y estadificación del cáncer de ovario	9
Figura 2. Participación de bevacizumab en la inhibición de la angiogénesis	14
Figura 3. Funciones de CTCF	16
Figura 4. Diferencias y similitudes entre CTCF y BORIS	21
Figura 5. Identificación de red DEGs con potencial importancia en CaOv	26
Figura 6. Expresión génica de los genes de la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2 en muestras de CaOv y de ovario normal	29
Figura 7. Análisis de la región promotora de VEGFA y sus sitios de unión a BORIS Y CTCF	33
Figura 8. Diagrama del diseño experimental para ensayos de gen reportero EGFP .	39
Figura suplementaria 1. Expresión génica relativa (puntuación z de lecturas normalizadas) de los 149 DEG encontrados en las condiciones experimentales CTCFL-OE y CTCFL-KD	50
Figura suplementaria 2. Niveles de expresión en Muestras de Ovario	51
Figura suplementaria 3. Región promotora de los genes XIST y BAG1	52

2. ABREVIATURAS

BORIS: del ingles "Brother Of the Regulator of Imprinted Sites"
BP: Proceso Biológico
CA125: Antígeno de Carbohidratos 125
CC: Componente celular
COE: Cáncer de Ovario Epitelial
ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina
CTA: Antígenos de Cáncer de testículo
CTCF: El factor de unión a CCCTC
CTCFL: CTCF-like
CTSs: Sitios de unión a CTCF
DE: Expresión diferencial
DEG: Genes diferencialmente expresados
FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
H2AK5Ac: Acetilación de la lisina 5 de la histona H2A
H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
H3k4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3
HE4: Proteína 4 del epidídimo humano
HGSC: Carcinomas serosos de alto grado
ICR: Región de control de la impronta
KPM: "KeyPathwayMiner"
LGSC: Carcinomas serosos de bajo grado
MF: Función Molecular
CaOv: Cáncer de ovario
TAD: Dominios topológicamente asociados
TSS: Sitios de inicio de la transcripción
WP: "WikiPathways"
XIC: Centro de inactivación X
ZF: Dedos de Zinc

3. RESUMEN

El cáncer de ovario epitelial (COE) es una de las neoplasias malignas ginecológicas con el mayor índice de mortalidad, a consecuencia de la falta de estrategias efectivas para la detección temprana del cáncer de ovario y a la inespecificidad de los síntomas, alrededor del 70% de las mujeres son diagnosticadas en una etapa avanzada. Esto pone en evidencia que es necesario priorizar la búsqueda de nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento de COE. Un potencial biomarcador es la proteína BORIS, la cual se expresa únicamente en tejido no neoplásico de testículo, sin embargo, se encuentra elevada en diversos tipos de neoplasias incluyendo el cáncer de ovario. Se ha demostrado que el aumento de BORIS lleva a cambios en la expresión de múltiples genes implicados en procesos como la angiogénesis y metástasis, además de regular vías alteradas en cáncer como lo es la vía PI3K-AKT. Sin embargo, hasta ahora se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales BORIS regula a estos genes.

Con el fin de identificar genes con importancia clínica en cáncer de ovario regulados por BORIS y esclarecer el posible mecanismo de esta regulación se evaluaron genes con expresión diferencial en ovario para determinar la posible red de interacciones de proteínas reguladas BORIS y a los enriquecimientos funcionales a los que pertenecen. Ambos análisis dieron como resultado a los genes participantes en la vía de señalización VEGFA-VEGFR2. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente donde *VEGFA* podría ser un blanco de BORIS al presentar cambios en su expresión en presencia de BORIS además de tener un sitio de unión a este factor transcripcional. Nuestros resultados apuntan a que BORIS podría ser un factor transcripcional relevante en la regulación de la expresión de *VEGFA*. Esto abre una nueva ventana en el tratamiento de cáncer de ovario, donde BORIS podría ser un importante blanco terapéutico.

4. ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer (EOC) is one of the gynecologic malignancies with the highest mortality rate. Due to the lack of effective strategies for early detection of ovarian cancer and the nonspecificity of symptoms, about 70% of women are diagnosed at an advanced stage. This highlights the need to prioritize the search for new biomarkers and therapeutic targets for the diagnosis and treatment of COE. One potential biomarker is the BORIS protein, which is expressed only in non-neoplastic testicular tissue, however, it is elevated in various types of neoplasms including ovarian cancer. It has been demonstrated that the increase of BORIS leads to changes in the expression of multiple genes involved in processes such as angiogenesis and metastasis, in addition to regulating altered pathways in cancer such as the PI3K-AKT pathway. However, the molecular mechanisms by which BORIS regulates these genes remain unknown.

In order to identify genes with clinical relevance in ovarian cancer regulated by BORIS and to clarify the possible mechanism of this regulation, differentially expressed genes in the ovary were evaluated to determine the possible interaction network of BORIS-regulated proteins and the functional enrichment to which they belong. Both analyses resulted in the genes participating in the VEGFA-VEGFR2 signaling pathway. These results coincide with previous reports where *VEGFA* could be a target of BORIS by showing changes in its expression in the presence of BORIS as well as having a binding site to this transcriptional factor. Our results point out that BORIS could be a relevant transcriptional factor in the regulation of *VEGFA* expression. This opens a new window in the treatment of ovarian cancer, where BORIS could be an important therapeutic target.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaOv) es la quinta causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres y es el segundo tumor maligno ginecológico más común, sin embargo, el más mortal de todos los cánceres reproductivos femeninos (Siegel et al., 2022). La Sociedad Americana de Cáncer estima que para el presente año, tan solo en Estados Unidos, se diagnosticarían 19 880 nuevos casos y que sería el causante de aproximadamente 12 810 muertes (Siegel et al., 2022). En México en el 2020 se reportaron 4 963 nuevos casos y 3 038 muertes derivadas por cáncer de ovario (Sung et al., 2021).

Los síntomas del cáncer de ovario históricamente han sido inespecíficos y vagos, además de estar ausentes en etapas iniciales de la enfermedad, algunos de estos síntomas son dolor o presión abdominal y pélvica, micción frecuente, urgencia urinaria, problemas gastrointestinales y ascitis, este último es el síntoma más frecuente en las pacientes en etapas avanzadas (American Cancer Society, 2021; National Cancer Institute, 2021; Stewart et al., 2019). La inespecificidad de los síntomas ocasiona que a menudo pasen desapercibidos, presentando un reto para el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Sumado a esto, los procedimientos de detección aún son deficientes, las actuales pruebas diagnósticas estándar son la ecografía abdominal y transvaginal, la prueba del antígeno de carbohidratos 125/Muc16 (CA-125) y de niveles séricos de la proteína 4 del epidídimo humano (HE4), que presentan una alta prevalencia de falsos positivos, tenido un bajo valor predictivo en etapas tempranas del cáncer de ovario. Por ello, es prioritario el desarrollo de ensayos clínicos para identificar estrategias efectivas (American Cancer Society, 2021).

Debido a los síntomas inespecíficos y a la falta de estrategias efectivas para la detección temprana del CaOv, alrededor del 70% de las mujeres son diagnosticadas en una etapa avanzada y solo el 30.2% de ellas tendrá una supervivencia de 5 años (American Cancer Society, 2021; Jones et al., 2017; Stewart et al., 2019), tanto para

el diagnóstico como para determinar las estrategias terapéuticas es indispensable conocer el tipo de tumor que presenta el paciente y el estadio, como se representa en la figura 1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el CaOv en tres categorías morfológicas según el tipo de célula del que se originan, representadas en la figura 1A: cáncer de ovario de células germinales, cáncer de ovario del estroma del cordón sexual y cáncer de ovario epitelial o carcinoma (COE) que representa el 90% de los casos (Chen et al., 2013).

El COE se divide en cinco subtipos histológicos; carcinoma seroso de alto grado (HGSC), carcinoma endometriode, carcinoma de células claras, carcinomas serosos de bajo grado (LGSC) y carcinoma mucinoso. Los HGSC representan del 70% al 80% de todos los subtipos de COE, además de ser el subtipo más común, tiene el peor pronóstico (Jones et al., 2017; Stewart et al., 2019).

El pronóstico para aquellas mujeres que desarrollan cáncer de ovario está directamente relacionado con el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico (Stewart et al., 2019), las pacientes diagnosticadas en un estadio localizado tienen una supervivencia relativa de 92.9% de 5 años o más, en contraste, aquellas que se han diagnosticado con CaOv distante (que presentan metástasis) en estadios III y IV tienen una supervivencia relativa de solo 30.2% a 5 años, por lo tanto, cuanto más temprano sea el diagnóstico más probabilidad tendrán de sobrevivir (American Cancer Society, n.d.).

La estadificación del cáncer de ovario se clasifica en estadios del I a IV utilizando la escala de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (figura 1B, tabla1) (Prat et al., 2015; Prat and FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2014). La estadificación es fundamental para determinar el tratamiento a seguir, para cada una de las diferentes etapas. Si la estadificación no se realiza correctamente, es posible que no se lleve el tratamiento ideal para tratar este tipo de neoplasia (American Cancer Society, 2018; National Cancer Institute, 2021). El tratamiento estándar para COE es la intervención quirúrgica con el objetivo de

extirpar la mayor cantidad posible del tumor, seguida de quimioterapia (American Cancer Society, 2018; Grunewald and Ledermann, 2017; Zyl et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de las mujeres con cáncer de ovario podrían presentar una recurrencia tumoral después de la terapia de primera línea en los siguientes 5 años, y en casi todas, eventualmente se desarrollará resistencia a los fármacos, lo que conducirá a la muerte por COE, este escenario ha llevado a la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis de CaOv para poder identificar dianas moleculares para el diagnóstico y el tratamiento en etapas tempranas (Grunewald and Ledermann, 2017; Wang et al., 2020).

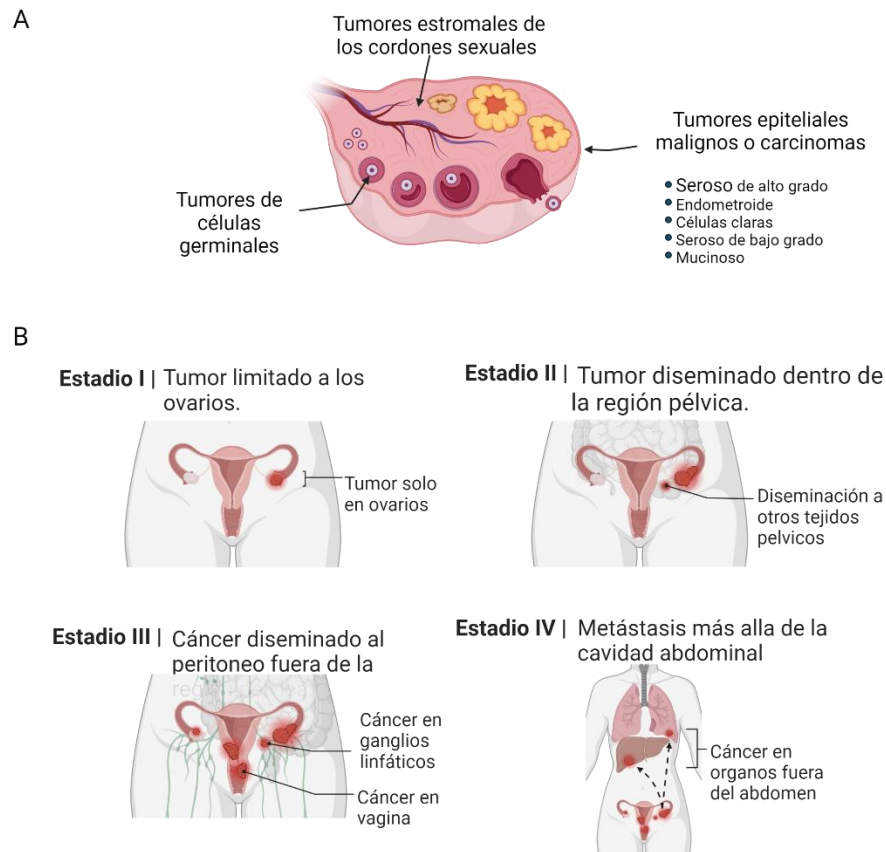


Figura 1. Clasificación y estadificación del cáncer de ovario. **A.** Clasificación del cáncer de ovario con base a las estructuras anatómicas de las cuales se origina. **B.** Estadificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) del cáncer de ovario. *Imagen creada en BioRender.com.*

Tabla 1. Sistema de estadificación FIGO y sistema AJJC (Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer) para el cáncer de ovario.

FIGO	AJJC	Descripción
● Estadio I	T1	Tumor limitado a uno o ambos ovarios.
○ IA	T1a	Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta); sin tumor en la superficie de los ovarios; sin células malignas en la ascitis o lavados peritoneales
○ IB	T1b	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsulas intactas); sin tumor en la superficie; sin células malignas en la ascitis o lavados peritoneales
○ IC	T1c	Tumor limitado a uno o ambos ovarios, con cualquiera de los siguientes:
▪ IC1	T1c1	Derrame quirúrgico
▪ IC2	T1c2	cápsula rota antes de la cirugía o tumor en la superficie de los ovarios o las trompas de Falopio
▪ IC3	T1c3	Células malignas en la ascitis o lavados peritoneales
● Estadio II	T2	El tumor afecta uno o ambos ovarios con extensión pélvica (debajo del borde pélvico).
○ IIA	T2a	Extensión y / o implantes en útero y / u ovarios
○ IIB	T2b	Extensión a otros tejidos intraperitoneales pélvicos
● Estadio III	T1 / T2-N1	El tumor involucra uno o ambos ovarios, con diseminación confirmada citológica o histológicamente al peritoneo fuera de la pelvis y / o metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales
○ IIIA1	T3-N0 / N1	Solo ganglios linfáticos retroperitoneales positivos (comprobado citológica o histológicamente)
○ IIIA2	T3a2-N0 / N1	Afectación peritoneal extrapélvica microscópica (por encima del borde pélvico) con o sin ganglios linfáticos retroperitoneales positivos
○ IIIB	T3b-N0 / N1	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis hasta 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.
○ IIIC	T3c-N0 / N1	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis más de 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluye extensión del tumor a la cápsula del hígado y el bazo sin afectación parenquimatosa de ninguno estos órganos)
● Estadio IV	Cualquier T y N, M1	Metástasis a distancia excluidas las metástasis peritoneales
○ IVA	Cualquier T y N, M1	Derrame pleural con citología positiva
○ IVB	Cualquier T y N, M1	Metástasis parenquimatosas y metástasis a órganos no abdominales (incluidos los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal)

5.1.1. Alteraciones moleculares y celulares en COE

El HGSC además de ser el subtipo más abundante y agresivo también es el que presenta mayores alteraciones moleculares, predominando las mutaciones génicas, Aproximadamente el 50% de los HGSC presentan deficiencias en recombinación homóloga (HR), causada principalmente por mutaciones en la línea germinal de los genes supresores de tumores *BRCA1* y en *BRCA2*, genes que participan en la reparación del ADN mediante HR, el 15% de todos los COE presentan mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* lo cual promueve la inestabilidad genómica que puede conducir a la transformación maligna del COE (Atallah et al., 2021; Grunewald and Ledermann, 2017; Koti et al., 2013; Norquist et al., 2016).

Otra mutación que se presenta de manera frecuente en HGSC es en el gen supresor de tumores *TP53*, está presente en el 96% de los casos (Norquist et al., 2016). La proteína de p53 es un supresor de tumores que participa en la activación de otros oncogenes y tiene un importante papel durante el daño al ADN regulando vías de señalización implicadas en la muerte celular programada, la detención del ciclo y el envejecimiento celulares (Rojas et al., 2016). También se observa ganancia en genes implicados en el ciclo celular como es *CCNE1* (ciclina E1) que contribuye a la oncogénesis y la inestabilidad genética, particularmente en presencia de p53 mutante (Norquist et al., 2016; Rojas et al., 2016).

Adicional a estas mutaciones características en los subtipos de COE también encontramos diversos genes alterados que son parte de vías de señalización importantes en el desarrollo y progresión del cáncer.

5.1.1.1. La vía Pi3k-AKT

Además de las mutaciones mencionadas anteriormente, los pacientes con HGSC presentan mutaciones en genes que codifican para proteínas que participan en la vía de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) / proteína cinasa B (AKT) / diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (PI3K / AKT / mTOR), siendo las más comunes las mutaciones activadoras, resultado de un mayor número de copias de ADN de las subunidades p110 α (*PI3KCA*) y p110 β (*PI3KCB*) de PI3K. Otros genes con

mutaciones en COE incluyen: p85 (*PIK3R1*), *AKT1*, *AKT2*, *INPP4B*, *MTOR* y la delección de *PTEN* (Dobbin and Landen, 2013; Ghoneum and Said, 2019; Rojas et al., 2016).

La vía PI3K / Akt / mTOR es un regulador central tanto en la fisiología celular normal como en la proliferación, tumorigénesis y metástasis del cáncer (Dobbin and Landen, 2013). Los datos del “*Cancer Genome Atlas (TCGA)*” revelaron la hiperactivación de la vía PI3K / AKT / mTOR en más del 60% de los pacientes con CaOv. Esta vía desempeña importantes funciones multifacéticas en el crecimiento de las células cancerosas, la supervivencia, la programación metabólica, la autofagia, la regulación de la transcripción y la angiogénesis (Dobbin and Landen, 2013; Ghoneum and Said, 2019).

A diferencia de los HGSC, se ha observado que los LGSC se caracterizan por una baja frecuencia en la mutación de *TP53* pero alta frecuencia de mutaciones en *BRAF* y *KRAS*, las cuales conducen a la activación constitutiva de la vía de señalización de las MAP cinasas (Atallah et al., 2021; Cho and Shih, 2009). La ruta de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) consta de tres proteínas cinasas activadas secuencialmente responsables de la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. En el COE, las proteínas posteriores de la vía MAPK / ERK desempeñan un papel fundamental en la promoción de la migración y la invasión de la enfermedad y, por lo tanto, pueden contribuir a la metástasis y la quimiorresistencia (Atallah et al., 2021).

5.1.1.2. La vía de señalización VEGFA-VEGFR2 en CaOv

El regimiento de nuevos vasos sanguíneos, conocido como angiogénesis, juega un papel fundamental en el crecimiento tumoral, la formación de ascitis y en el proceso de metástasis.

Las células endoteliales, que forman a los nuevos vasos sanguíneos, dependen para su supervivencia de la familia de factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF) y de sus receptores, en conjunto forman parte de las vías de

señalización más importantes en la angiogénesis tumoral (Grunewald and Ledermann, 2017; Kumaran et al., 2009).

El factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGFA) es el ligando VEGF mejor caracterizado y parece jugar un papel dominante en la angiogénesis al unirse a las tirosinas quinasas del receptor de VEGF (VEGFR).

En la angiogénesis, los 2 miembros más importantes de la familia VEGFR son VEGFR1 y VEGFR2, donde este último regula los efectos angiogénicos y mitogénicos, por su parte VEGFR1 es el responsable de reclutar células, principalmente monocitos, derivados de la médula ósea en la vasculatura tumoral (Ferrara and Kerbel, 2005; Grunewald and Ledermann, 2017).

La unión de VEGFA a su receptor VEGFR2 ocasiona la autofosforilación del mismo, activando a su vez cascada abajo las vías Ras/ Raf/ ERK y PI3K / AKT / mTOR, lo que da como resultado un aumento en la supervivencia celular, proliferación celular, funciones antiapoptóticas y permeabilidad celular (Nilsson and Heymach, 2006; Shek et al., 2019; Trinh et al., 2009).

La inhibición de VEGFA, mediante agentes antiangiogénicos, restauran el equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos, normalizando así la estructura y función de los vasos sanguíneos tumorales. Esto influye en el crecimiento tumoral y se cree que mejora la administración de medicamentos de quimioterapia a los tumores y disminuye su potencial metastásico (Grunewald and Ledermann, 2017).

Actualmente, el único fármaco anticariogénico aprobado por la FDA para el CaOv es bevacizumab, el cual es un anticuerpo monoclonal recombinante que se une a VEGFA circulante, esquematizado en la figura 2 (American Cancer Society, 2018; Bridges and Harris, 2011). El uso de bevacizumab reduce y retarda el crecimiento de tumores en pacientes con COE en estadios avanzados, no obstante, la tasa de supervivencia en pacientes con CaOv no se ve incrementada (Wang et al., 2020).

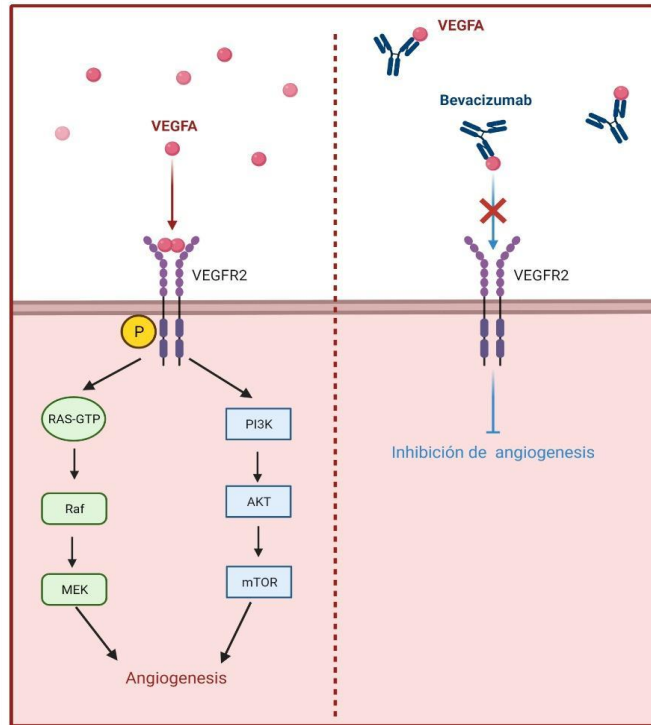


Figura 2. Participación de bevacizumab en la inhibición de la angiogénesis. Inducción de angiogénesis a través de la vía de señalización VEGFA-VEGFR2 (Izq). Inhibición de angiogénesis por unión del anticuerpo bevacizumab al ligando VEGFA (der). *Imagen creada en BioRender.com.*

5.2. El factor nuclear CTCF

El factor de unión a CCCTC (CTCF) es una proteína nuclear de dedos de zinc (ZF) con capacidad de unión al ADN que se expresa de forma ubicua y está altamente conservada en eucariotas, desde *Drosophila* hasta humanos (Kim et al., 2007; Phillips and Corces, 2009). El gen CTCF codifica a una proteína de 82 KDa compuesto por 727 residuos de aminoácidos (Klenova et al., 1993; Martinez and Miranda, 2010). Consta de tres dominios: un dominio N-terminal (~265 residuos), el dominio C-terminal (~148 residuos) y una región de dominio central con capacidad de unión al ADN formada por 11 ZF (Kim et al., 2015; Martinez and Miranda, 2010). El uso de diferentes combinaciones de estos ZF permite que CTCF se una a diferentes secuencias de ADN y/o interactúe con varios factores proteicos formando así complejos proteicos, lo cual le confiere un abanico de funciones celulares (Ren and Zhao, 2019).

Se ha demostrado que los sitios de unión a CTCF (CTSs) son específicos del tipo celular y que se encuentran presentes en diferentes regiones del ADN, el 50% de los CTSs están en regiones intergénicas, mientras que el 35% son intragénicos y el resto se encuentran distribuidos en promotores proximales. Esta distribución a lo largo del ADN y el uso diferencial de sus ZF le permite a CTCF unirse a diversos sitios y desempeñar funciones que van desde la regulación genética hasta la organización de la arquitectura cromosómica (Chen et al., 2013; Kim et al., 2015).

5.2.1. Las funciones de CTCF

CTCF es una proteína con expresión ubicua en humanos y multifuncional, como se esquematiza en la figura 3, inicialmente CTCF fue catalogada como un represor transcripcional, esto debido a que los primeros estudios llevados a cabo por medio de genes reporteros demostraron que tenía la capacidad de unirse a las regiones regulatorias del gen *c-Myc* de pollo, reprimiendo la expresión de este (Klenova et al., 1993; Lobanenkov et al., 1990). Tiempo después, se descubrió que no solo tenía la capacidad de represor, además podía actuar como un activador transcripcional mediante la unión al promotor del gen de la proteína precursora β amiloide humana (Vostrov and Quitschke, 1997).

Una de las funciones de CTCF es su capacidad de aislar, cuando CTCF se une a un “*insulator*”, la interacción entre un potenciador y un promotor genético se ve obstaculizada, por lo tanto, la transcripción del gen se bloquea.

Por ejemplo, como se aprecia en la figura 3A en *Gallus gallus* el loci de los genes *H19* e *Igf2* se encuentran separados entre sí por la región de control de la impronta (ICR), que puede metilarse en el ADN de manera alelo específica. CTCF solo se une a la ICR no metilada en el cromosoma materno impidiendo la comunicación entre el potenciador proximal *H19* y el promotor *Igf2*, en consecuencia, *Igf2* paterno permanece inactivo. En el cromosoma paterno CTCF no es capaz de unirse a la ICR por efecto de la metilación, por lo tanto, el potenciador puede activar la transcripción de *Igf2* desde el cromosoma paterno (Hark et al., 2000; Kim et al., 2015).

La hipótesis de que CTCF puede actuar como un elemento de barrera/límite surgió a través de mapeo en todo el genoma. Este mapeo permitió identificar CTSs localizados en límites entre dominios de cromatina activas y represivas marcados por la acetilación en la lisina 5 de la histona H2A (H2AK5Ac) y la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), respectivamente, impidiendo la propagación de la cromatina represiva como se observa en la figura 3B (Cuddapah et al., 2009).

Las diversas funciones de CTCF son posibles gracias a su capacidad para formar bucles de cromatina en colaboración con cohesina, como se esquematiza en la figura 3C, teniendo un papel fundamental en la organización de la estructura tridimensional (3D) de la cromatina. Dada la importancia de CTCF, éste ha sido nombrado el tejedor maestro del genoma (Arzate-Mejía et al., 2018; Phillips and Corces, 2009).

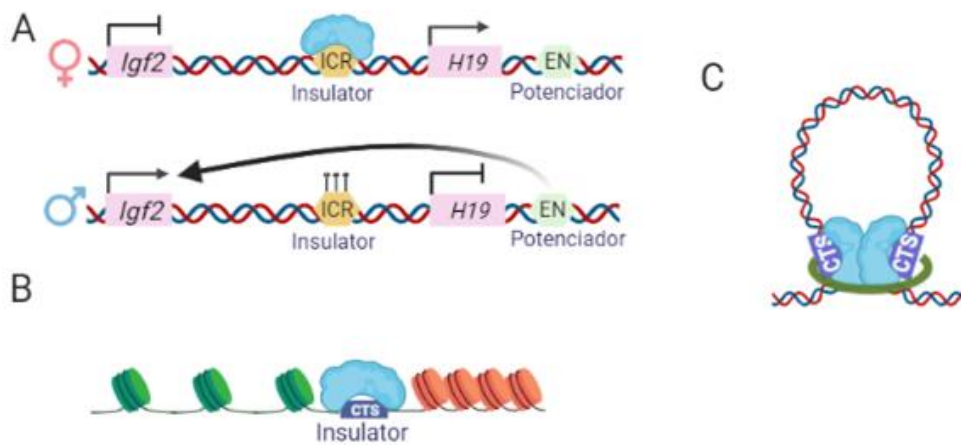


Figura 3. Funciones de CTCF. **A.** Bloqueo del potenciador (EB). **B.** Unión de CTCF a “insulators”, formando compartimientos de cromatina abierta (verde) y cerrada (rojo) **C.** Formación de asas de cromatina en colaboración con cohesina. *Imagen creada en BioRender.com*

5.3. El gen *CTCF* (*CCCTC-binding factor like*) y su proteína BORIS

5.3.1. El gen *CTCF* (*CCCTC-binding factor like*)

La duplicación del gen *CTCF* durante la evolución temprana de amniotes, antes de la división de mamífero-reptil, dio lugar al gen *CTCF-like* (*CTCFL*), hace aproximadamente 310 millones de años. *CTCFL* es el único parólogo conocido de *CTCF* (de Necochea-Campion et al., 2011; Pugacheva et al., 2015).

La identidad entre los ortólogos *CTCFL* humano y de otros vertebrados dentro de las secuencias de codificación para el dominio 11-ZF es del 80.4%, mientras que para los dominios N y C-terminal es inferior al 35%. El gen *CTCFL* humano se localiza en la banda 13.31 del brazo largo del cromosoma 20 (20q13.31) (Acceso NC_000020.11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), está constituido por 27,931 pb con 11 exones (3493 pb), la secuencia de codificación está dentro de los exones 2–11 (Martin-Kleiner, 2012).

5.3.2. La regulación de la expresión de *CTCFL*

La transcripción de *CTCFL* está regulada por tres promotores alternativos A, B y C. El promotor A, ubicado en –2071 a –1276 pb tiene una alta actividad transcripcional. El promotor B está ubicado en –1106 a –996 pb, mientras que el promotor C está en –821 a –622 pb. Además, cuenta con tres sitios de inicio de la transcripción los cuales están en –1447, –899 y –658 pb río arriba del primer ATG (Martin-Kleiner, 2012; Renaud et al., 2007).

Pugacheva y colaboradores reportaron 23 variantes de transcripción obtenidas por empalme alternativo de exones, nombradas A1 a A6, B0 a B7 y C1 a C9 dependiendo del promotor que regula su transcripción, a su vez, se clasifican en 6 subfamilias (sf1-sf6). Las 23 variantes se traducen en 17 productos polipeptídicos distintos. Las 17 isoformas de BORIS contienen diferentes ZF en su dominio de unión al ADN, diferentes extremos amino y carboxilo, y distintos perfiles de

expresión en varias células normales y cancerosas (de Necochea-Campion et al., 2011; Soltanian and Dehghani, 2018).

Las isoformas de *CTCF* son abundantes en espermatoцитos de testículos humanos adultos, donde los niveles de metilación de CpG se reducen. Además, se demostró que la desmetilación inducida en fibroblastos humanos resulta en la activación de la expresión isoforma B0. Sumado a estos resultados, se ha relacionado la desmetilación del promotor *CTCF* con la expresión de este en cáncer. Esto sugiere que la expresión de *CTCF* es reprimida por la metilación de regiones CpG en sus promotores (Pugacheva et al., 2010; Woloszynska-Read et al., 2007).

Además de la metilación de CpG, la expresión de la *CTCF* disminuye en respuesta a la activación de p53. Esto resalta la importancia de la expresión de isoformas de *CTCF* como un componente de la transformación de células oncogénicas (Pugacheva et al., 2010).

5.3.3. La proteína BORIS

El gen *CTCF* codifica a la proteína "*brother of the regulator of imprinted sites*" (BORIS), al igual que CTCF, BORIS tiene la capacidad de unirse al ADN mediante 11 ZF, dicha región muestra una alta conservación entre ambas proteínas (> 70% de identidad), sin embargo, los dominios N y C-terminales tienen una identidad menor al 18% como se observa en la figura 4^a (Loukinov et al., 2002; Pugacheva et al., 2010).

5.3.4. La unión de BORIS al ADN.

Debido a que BORIS y CTCF tienen homología en sus 11 ZF como se esquematiza en la figura 4B, se ha propuesto que BORIS tiene la capacidad de unirse al ADN de manera similar a CTCF, teniendo el potencial de unirse a los mismos sitios que CTCF. Esto implicaría una competencia en los tejidos donde se encuentran presentes ambas proteínas, lo cual se reflejan en cambios en la regulación genómica (Pugacheva et al., 2010). Sin embargo, Pugacheva y colaboradores, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación masiva

(ChIP-seq), identificaron que, contrario a lo que se esperaría, BORIS solamente ocupa del 29-38% de los sitios de CTCF (BORIS y CTCF). Un análisis en las secuencias mostró que las regiones BORIS y CTCF en realidad están compuestas por 2 sitios (2xCTSs), separados por 58 pb, los cuales pueden estar ocupados por dímeros CTCF-CTCF, BORIS-CTCF y BORIS-BORIS. Los 2xCTSs se encuentran localizados principalmente en potenciadores y promotores activos presentando diferencias funcionales dependiendo del dímero presente (Pugacheva et al., 2015).

Se sabe que CTCF tiene una especificidad de unión a secuencias de ADN no metiladas, por su parte, la relación de BORIS con el estado de metilación aún no está dilucidado, mientras algunos ensayos mostraron que BORIS es una proteína de unión a ADN independiente de la metilación, otros experimentos reportaron que BORIS se une preferentemente a la región *H19* paterna metilada, lo que sugiere un mecanismo en el que la afinidad de CTCF por el alelo materno no metilado dirige la unión de BORIS hacia el alelo paterno (Nguyen et al., 2008).

También, se ha reportado un enriquecimiento de BORIS en regiones de cromatina "abierta" marcada por la acetilación H3K27, di y trimetilación de H3K4, dimetilación de H3K79 y acetilación H3K9 más la variante de histona H2A.Z. Además de enriquecerse en los sitios de inicio de la transcripción y las regiones unidas por factores de transcripción (Bergmaier et al., 2018).

5.3.5. Las funciones de BORIS.

El gen *CTCF* se expresa preferentemente en testículo adulto, donde se ha visto que su función principal ocurre durante la espermatogénesis. Por lo que, se ha propuesto que BORIS actúe como un regulador transcripcional de células germinales masculinas. Esto es consistente con los estudios que demuestran que ratones machos knockout *Ctcf* *-/-* (no expresan BORIS) presentan subfertilidad parcialmente penetrante debido a defectos en la meiosis (Marshall et al., 2014; Sleutels et al., 2012). Además, se ha determinado que las isoformas de BORIS se expresan de manera diferencial a lo largo de la espermatogénesis, esto puede

indicar funciones distintas para isoformas individuales durante el desarrollo de la línea germinal masculina (Pugacheva et al., 2010).

Además de los testículos, *CTCF* se expresa en ovarios fetales, pero no en ovarios adultos, sin embargo, el patrón de la expresión de las isoformas BORIS es distinto del de los testículos adultos, esto puede sugerir que las isoformas son funcionales y especializadas en estas dos líneas germinales (Pugacheva et al., 2010).

5.3.6. BORIS en cáncer

BORIS pertenece a la familia de antígenos de cáncer de testículo (CTA), un grupo de genes expresados en testículos normales y expresados anormalmente en tumores malignos (de Necochea-Campion et al., 2011; Kalejs and Erenpreisa, 2005). Como miembro de la familia CTA, BORIS es crítico para el desarrollo de la línea germinal normal, pero también puede desempeñar un papel en la transformación oncogénica (Pugacheva et al., 2010).

El factor transcripcional BORIS se expresa con frecuencia varios tipos de cáncer, incluidos los de mama, útero y ovario. La expresión ectópica de BORIS en líneas celulares promueve la inmortalización y el crecimiento celulares, lo que implica un papel en la oncogénesis (Link et al., 2013).

Pugacheva y colaboradores demostraron por medio de qPCR, que las seis subfamilias BORIS se expresaban en el 70% de las líneas celulares de cáncer analizadas (Pugacheva et al., 2010).

Karpf y colaboradores encontraron que, en comparación con ovarios no neoplásicos, los tumores de cáncer de ovario epitelial (COE) presentaron una disminución en la metilación del promotor de *CTCF*. Demostrando así que, esta expresión anormal de *CTCF* en cáncer, es ocasionada por los cambios en los estados de metilación del ADN en células cancerosas (Woloszynska-Read et al., 2007). Además, la relación de expresión de ARNm de BORIS /CTCF está estrechamente asociada con la hipometilación del ADN y confiere un pronóstico desfavorable en COE (Woloszynska-Read et al., 2011).

Sin embargo, aún no está claro el efecto que tiene este aumento de BORIS en COE, por esta razón nuestro grupo de investigación demostró que el aumento de BORIS se relaciona con la malignidad en COE, además demostraron que BORIS produce cambios en la expresión de múltiples genes entre los que destacan los involucrados en la vía de señalización PI3K-Akt, además del gen *VEGFA* en el cuál además encontraron motivos de unión de BORIS (Salgado-Albarrán et al., 2022).

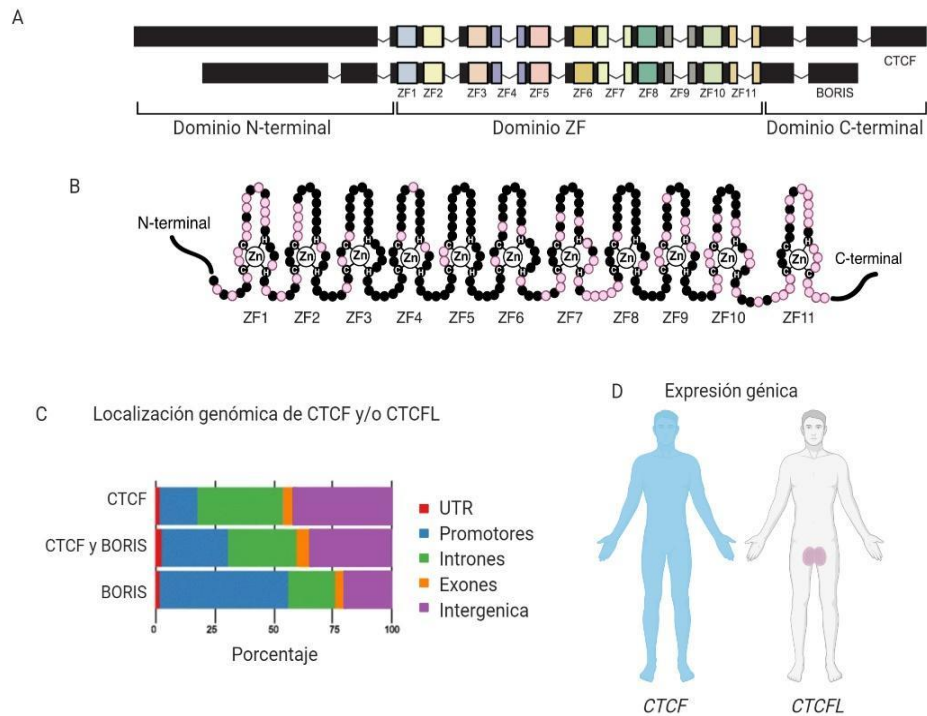


Figura 4. Diferencias y similitudes entre CTCF y BORIS. **A.** Estructura génica de *CTCF* y *CTCFL*. **B.** esquema que destaca los residuos de aminoácidos superpuestos (negro) y diferentes (rosa) entre *CTCF* y *BORIS*. **C.** Gráfica de la localización genómica de *CTCF*, *CTCF* con *BORIS* y *BORIS*. **D.** Esquema que representa la expresión en tejidos humanos de *CTCF* (azul) y *CTCFL* (*BORIS*) (rosa) tomado y modificado de (Hore et al., 2008)

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de ovario epitelial (COE) es una de las neoplasias malignas ginecológicas con el mayor índice de mortalidad y debido a que no existen estrategias efectivas para la detección temprana del cáncer de ovario, alrededor del 70% de las mujeres son diagnosticadas en una etapa avanzada. Esto enfatiza la necesidad de desarrollar biomarcadores y blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento de COE.

Hasta ahora, existen pocos biomarcadores empleados en COE, un potencial biomarcador es la proteína BORIS, la cual se encuentra elevada en diversos tipos de neoplasias incluyendo al COE. Dentro de nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el aumento de BORIS lleva a cambios en la expresión de múltiples genes tales como el receptor de andrógenos (AR), un marcador de progresión para COE y alteraciones en la vía de señalización PI3K-AKT, la segunda vía más alterada en cáncer (Salgado-Albarrán et al., 2022, 2019). Teniendo los antecedentes de las alteraciones que se pueden tener en la expresión de genes debido a la presencia de BORIS en el presente trabajo se buscó determinar que genes estaban alterados y la importancia que esto representa en las vías de señalización conocidas en la progresión del cáncer, con el fin de inferir el mecanismo de regulación de BORIS sobre los genes diferencialmente expresados y los efectos biológicos que tendría en el desarrollo y progresión del cáncer.

7. HIPÓTESIS

La alteración en los niveles de expresión de *CTCF* en cáncer de ovario ocasiona cambios transcripcionales en genes asociados a vías de señalización desreguladas en cáncer.

8. OBJETIVOS

8.1.1. Objetivo general

Identificar genes con importancia clínica en cáncer de ovario regulados a nivel transcripcional por BORIS.

8.1.2. Objetivos particulares

1. Determinar la red de interacciones proteína-proteína regulada por la presencia y ausencia de BORIS en genes diferencialmente expresados (DEG).
2. Seleccionar genes con importancia clínica en CaOv mediante un análisis de enriquecimiento funcional de los genes representados en la red obtenida.
3. Comprobar el efecto de BORIS sobre los genes seleccionados en muestras de pacientes de CaOv.
4. Identificar *in silico* la posible regulación de *VEGFA* por el factor transcripcional de BORIS.

9. RESULTADOS

9.1. El análisis de enriquecimiento de vías de *novo* de genes diferencialmente expresados (DEG) en OVCAR3.

Con el fin de identificar genes que presentan cambios en su expresión debido a la presencia o ausencia de BORIS, se utilizaron datos publicados, obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación, de RNA-seq de líneas celulares derivadas de cáncer de ovario (OVCAR3), con sobreexpresión (CTCFL-OE) y con disminución de CTCFL (CTCFL-KD) (Salgado-Albarrán et al., 2022). Se identificaron 86 genes diferencialmente expresados (DEG) únicos en el grupo CTCFL-OE y 2713 DEG independientes en CTCFL-KD, mientras que 149 DEG se reportaron en ambas condiciones, dentro de estos genes están objetivos de BORIS reportados anteriormente, tales como *H19*, *TGBI* y *FN1*, los cambios de expresión relativa de los 149 DEG resultantes se representan en el mapa de calor de la figura suplementaria 1.

Utilizando los 149 DEG reportados, se identificaron interacciones proteína-proteína que se afectan debido a la presencia o ausencia de BORIS, mediante la ejecución de un Análisis de Enriquecimiento de Vías de *novo* en la plataforma KeyPathwayMiner (KPM). El análisis con KPM permite comparar los DEG con todo el interactoma anotado previamente en la base de datos de BioGRID, extrayendo la red máxima que contiene los genes desregulados por BORIS en los modelos KD y sobreexpresión de *CTCFL*. Estas redes pueden representar módulos funcionales o nuevas vías activas que no sería posible identificar usando la información contenida en otras bases de datos (List et al., 2016). En la Figura 5A se esquematiza la red de interacciones proteína-proteína resultante, la cual contiene 29 DEG regulados por BORIS y dos excepciones, marcadas en rojo ($k=2$), cabe resaltar que dentro de esta red están presentes *VEGFA*, *TGFBI* y *MAP1B* tres de los genes previamente reportados con BS para BORIS en las líneas celulares OVCAR3 (Salgado-Albarrán et al., 2022) y OVCAR8 (Pugacheva et al., 2015) marcados con círculos verdes.

9.2. El análisis de enriquecimiento funcional

Teniendo la red de interacciones de los DEG regulados por BORIS, se realizó la identificación de posibles genes de importancia en CaOv para cumplir este objetivo se recurrió al análisis de enriquecimiento funcional con gProfiles de los DEGs representados en la red resultante.

El resultado de este análisis (Figura 5) mostró que los genes *MAP1*, *TGFB1* y *VEGFA* son los principales genes participantes en los términos enriquecidos de Gene Ontology (GO). También observamos que las principales vías enriquecidas son las vías de PI3K-AKT y VEGFA-VEGFR2, la cual juega un papel muy importante en la angiogénesis tumoral. En ambas vías encontramos la participación de VEGFA, el cual es un objetivo terapéutico en el tratamiento de CaOv debido a su importancia en el crecimiento tumoral, por lo cual, su inhibición reduce la angiogénesis y el potencial metastásico (Grunewald and Ledermann, 2017; Kumaran et al., 2009). Teniendo estos antecedentes se seleccionaron los genes participantes en la vía VEGFA-VEGFR2 para los siguientes análisis.

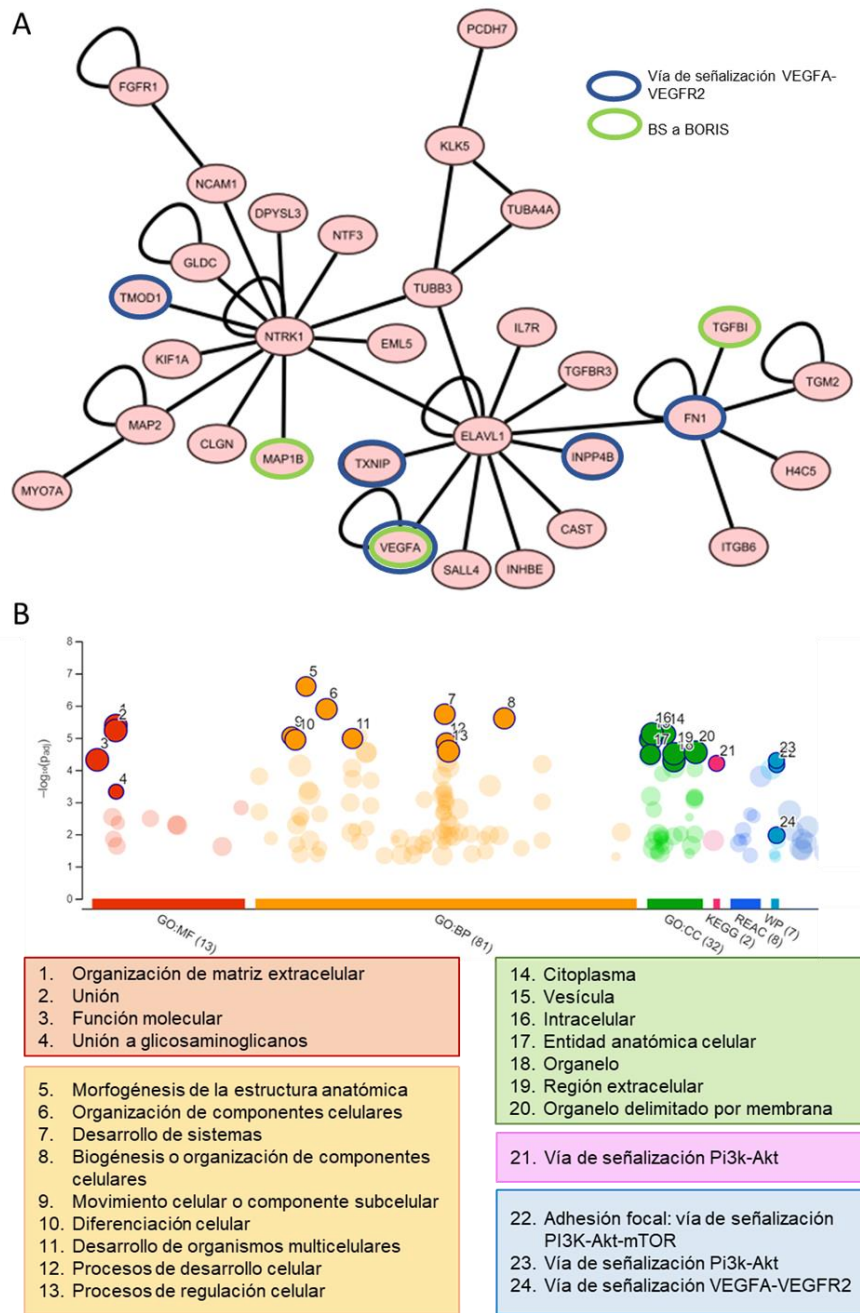


Figura 5. Identificación de red DEGs con potencial importancia en CaOv. A. Red de novo de interacciones proteína-proteína, análisis con KPM utilizando la base de datos de BioGRID. Los nodos (círculos) representan proteínas y las líneas indican la interacción entre ambos. El contorno azul representa los genes implicados en la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2, el verde representa a los DEGs con sitios de unión a BORIS reportados previamente, excepciones en rojo. B. Análisis funcional de los DEGs resultantes de la red de interacciones (29 genes), términos enriquecidos en Molecular Function (MF), Biological Process (BP), Cellular Component (CC) de Gene Ontology y en vías de señalización biológicas de KEGG, Reactome y WikiPathways (WP).

9.3. El análisis de expresión de muestras de ovario neoplásicas y sanas.

La red resultante y el análisis de enriquecimiento funcional evidenciaron que, en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario, BORIS está regulando la expresión de genes con implicaciones en CaOv como son los participantes en la vía de señalización VEGFA-VEGFR2, por lo cual, nuestro siguiente objetivo fue comprobar si BORIS, al igual que en nuestro modelo, está regulando esta vía en muestras de pacientes con CaOv. Para esto se usaron datos de expresión de tejido neoplásico (TCGA) y de ovario normal (GTEx), contenidos en Xena Browser.

Se obtuvieron un total de 88 muestras de tejido normal, agrupadas en la categoría (CONTROL_SANO) y 419 muestras de cistoadenocarcinoma seroso de ovario (TCGA), estas últimas muestras neoplásicas se clasificaron en 2 grupos mediante la segmentación en cuartiles esquematizada en la figura suplementaría 2. En el primer grupo se encuentran 39 muestras que presentan una alta expresión de *CTCF* (UP_BORIS), mientras que el segundo grupo está formado por 126 muestras que contienen poca expresión de *CTCF* (DOWN_BORIS).

En la figura 6 se muestran las gráficas de caja resultantes de comparar la expresión de cada gen entre los tres grupos de muestras. Para comprobar la agrupación mencionada, se graficó como control la expresión de *CTCF* de los grupos, como se observa en la figura 6A se encuentra una diferencia significativa en la expresión de dicho gen entre los tres grupos. Teniendo la expresión de *CTCF* como control se prosiguió a comparar la expresión de los genes participantes en la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2, marcados en círculos azules en la figura 4A, además se incluyó en este análisis a FN1

El primer gen que se evaluó fue *VEGFA* que como se ha mencionado anteriormente es el principal ligando de la vía VEGFA-VEGFR2, en la figura 6B observamos que la expresión de este gen aumenta de manera significativa en el grupo DOWN_BORIS comparado con el grupo control, este aumento es aún mayor en el grupo UP_BORIS al compararlo con el grupo CONTROL_SANO, es importante resaltar que también se observa un incremento en la expresión de *VEGFA* en el

grupo UP_BORIS comparado con DOWN_BORIS, lo que nos indica que la expresión de *VEGFA* se ve afectada por el aumento de la expresión de *CTCFL* (BORIS) en las muestras de ovario.

El mismo patrón de expresión lo encontramos en el gen *FN1* perteneciente al igual que *VEGFA* a la cascada de señalización de VEGFA-VEGFR2, este gen es un diana en CaOv ya conocido de BORIS, reportado con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Salgado-Albarrán et al., 2019).

En contraste a los genes *VEGFA* y *FN1*, no encontramos este mismo patrón en los genes *TXNIP*, *TMOD1*, *INPP4B*, que de acuerdo con los resultados de análisis de ontología génica también participan en la misma vía.

De manera particular, encontramos que *TMOD1* tiene una diferencia significativa a la alta al comparar los grupos DOWN_BORIS vs CONTROL_SANO al igual que al comparar la expresión de UP_BORIS vs CONTROL_SANO, al observar este comportamiento se comparó la expresión *TMOD1* de 419 muestras totales de CaOv contra las 88 muestras del grupo CONTROL_SANO encontrando también un aumento significativo, como podemos observar en la figura suplementaria 2B.

Estos resultados demuestran que únicamente los genes *VEGFA* y *FN1* de la vía de VEGFA-VEGFR2 están positivamente regulados por BORIS, mientras que *TMOD1* es un gen con expresión diferencial en CaOv comparado con tejido sano, sin embargo, esta diferencia en su expresión no está relacionada con la expresión de *CTCFL*, respecto a los genes *TXNIP* e *INPP4B* se observó que a pesar de tener una DE en OVCAR3 este comportamiento no se encuentra en muestras de pacientes con CaOv.

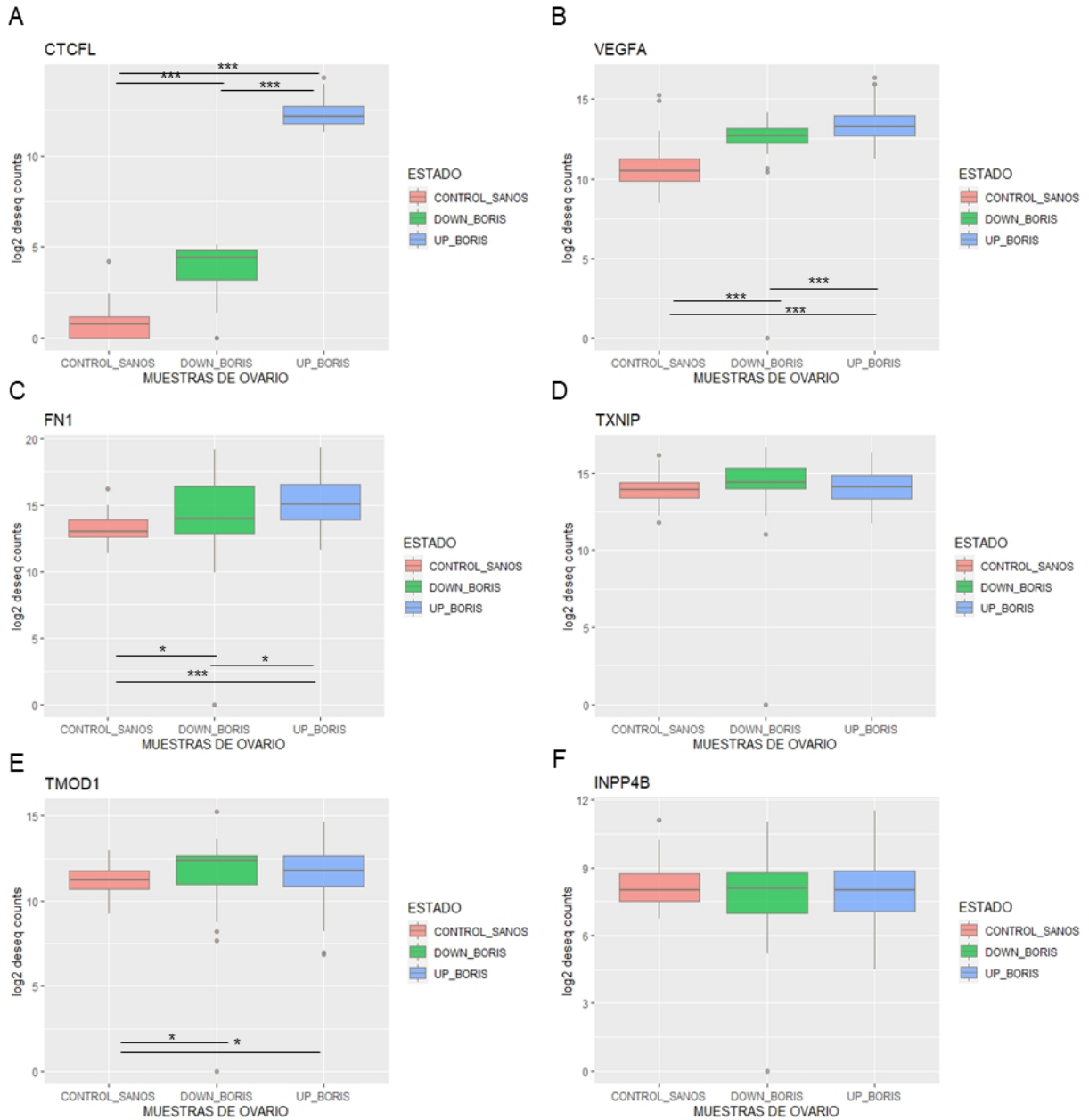


Figura 6. Expresión génica de los genes de la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2 en muestras de CaOv y de ovario normal. Análisis de la expresión génica de cada uno de los genes en los grupos de muestras de ovario, CONTROL_SANO (n=88), DOWN_BORIS (n=39) y UP_BORIS (n=126). Prueba de Tukey con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

9.4. El análisis de la región promotora de *VEGFA* y su regulación por BORIS y CTCF

Los resultados obtenidos en los puntos anteriores demuestran que el aumento en la expresión de *CTCF* está relacionado con el alza en la expresión de *VEGFA* tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes, conociendo, además, la importancia de esta proteína en CaOv al ser el principal ligando en la vía de señalización de VEGFA-VEGFR2 se decidió analizar la posible regulación de este gen por BORIS.

Previamente Salgado-Albarrán y colaboradores, reportaron que *VEGFA* tiene un sitio de unión (BS) a BORIS dentro de los 2 Kbp antes del sitio de inicio de la transcripción (TSS), tanto en la línea celular OVCAR3 como en OVCAR8 (Salgado-Albarrán et al., 2022). Este análisis se realizó *in silico* mediante la búsqueda de la secuencia consenso reportada en las plataformas Factorbook (Wang et al., 2012) y Jaspar (Fornes et al., 2020), los motivos de unión que arrojan dichas plataformas se muestran en la figura 7.

Utilizando estos datos reportados por nuestro grupo de investigación y sabiendo que BORIS es una proteína con capacidad de unirse al ADN, que se ha encontrado principalmente en potenciadores y promotores activos (Pugacheva et al., 2015), se prosiguió con la identificación de la región promotora de *VEGFA* con el fin de determinar si el BS reportado se encontraba dentro de esta región.

Los estados de cromatina se han utilizado ampliamente para identificar y anotar regiones reguladoras en los genoma (Ernst and Kellis, 2010; Jiang and Mortazavi, 2018), se ha demostrado que la presencia de la modificación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3), la presencia de Factores de Transcripción (FT) y la unión de la polimerasa II (pol II) son marcas epigenéticas características de promotores activos (Jiang and Mortazavi, 2018), además de estar asociados a islas CpG (Deaton and Bird, 2011; Jiang and Mortazavi, 2018).

Se utilizaron los datos de ChIP-seq disponibles en ENCODE para células K562 (ENCODE Project Consortium, 2012) y los obtenidos por Pugacheva y

colaboradores en células OVCAR8 (Pugacheva et al., 2015), con ayuda de IGV se visualizó la región de 2 kpb previas al inicio de la transcripción de *VEGFA*, región donde se reportó el BS a BORIS, se identificó al promotor con base en las marcas epigenéticas reportadas para promotores mencionadas anteriormente. Para validar esta posible región promotora se utilizaron los datos disponibles en “*Eukaryotik Promoters Database*” (EPD) (Périer et al., 2000) una colección de bases de datos de promotores obtenidos del mapeo de TSS provenientes de experimentos de alto rendimiento como Oligocapping y de “Cap analysis of gene expression” (CAGE), estos últimos experimentos de CAGE están disponibles en ENCODE (Takahashi et al., 2012), con el fin de contrastar mediante diferentes análisis la ubicación del promotor se visualizaron también datos de CAGE obtenidos de diferentes líneas celulares.

Como se ha mencionado los promotores también se caracterizan por la unión de diversos FT por lo cual en la figura 7 podemos observar la presencia de estos FT gracias a los datos almacenados en Open Regulatory Annotation (ORegAnno), un recurso que contiene información sobre regiones reguladoras, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de ARN, variantes reguladoras, haplotipos y otros elementos reguladores (Lesurf et al., 2016)

En conjunto estas herramientas nos permitieron identificar la posible región promotora, que coincide con los promotores propuestos por EDP marcados como VEGFA_1 y VEGFA_2,

Sin embargo, las señales de CAGE, de H3K4me3, de la Pol II y de FT sugieren la presencia de un posible tercer promotor resaltado en una franja roja, en esta misma región podemos observar el BS de BORIS y los picos de CTCF y BORIS obtenidos de ensayos de CHIP-seq en las líneas celulares K562 y OVCAR8, observamos que dichos picos de ambas proteínas se traslapan, al igual que los motivos de unión reportados en Jaspar y Factorbook. Esto sugeriría una posible competencia de ambas proteínas por el mismo sitio de unión ocasionada por el aumento de BORIS característico de CaOv.

En la figura suplementaria 3 visualizamos con IGV a los genes *XIST* (Chao et al., 2002; Kim, 2008) y *BAG1*, que sirven como controles positivos de los análisis de

ChIP-seq, ya que en previas publicaciones han demostrado la unión de las proteínas de interés a esas regiones. En *XIST* (Chao et al., 2002; Kim, 2008) se ha evidenciado la unión de CTCF y en *BAG1* (Sun et al., 2008) se ha reportado previamente la unión de las proteínas CTCF y BORIS en la región promotora (27,63). Nuestros datos proponen que la desregulación de *CTCF* (BORIS) podría participar en cambios de vías de señalización que previamente han sido reportadas desreguladas en cáncer como la vía de VEGFA-VEGFR2. Por ello, estos datos apuntan a que BORIS podría estar estrechamente ligado en parte a las firmas moleculares del cáncer previamente reportadas (Hanahan and Weinberg, 2011).

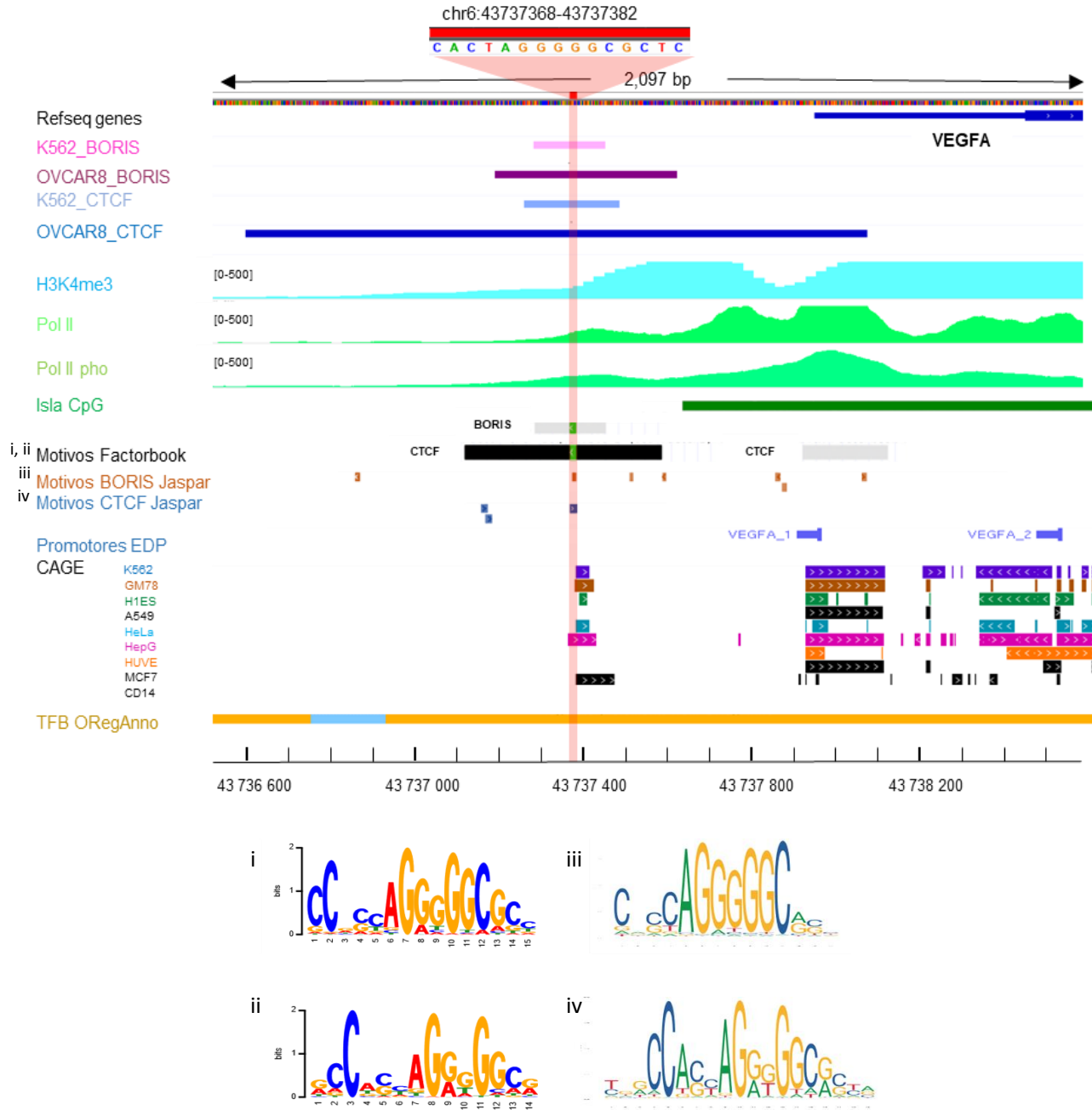


Figura 7. Análisis de la región promotora de VEGFA y sus sitios de unión a BORIS Y CTCF. BS de BORIS (chr6:43737368-43737382) señalado con franja roja. Picos obtenidos por CHIP-seq de CTCF y BORIS en las líneas celulares K562 y CAOVR8, señal de H3K4me3, de ARN polimerasa (Pol II) y fosforilada (Pol II pho) isla CPG, motivos reportados en Factorbook (i, ii) y Jaspar (iii, iv) de BORIS y CTCF, promotores reportados en EDP y CAGE de diferentes líneas celulares, señal de factores de transcripción almacenados en ORegAnno.

10. DISCUSIÓN

El CaOv sigue siendo el tumor ginecológico más letal, esto se debe en gran medida a que no existen estrategias efectivas para la detección temprana del CaOv, por lo cual, es de vital importancia la búsqueda de nuevos biomarcadores pronósticos y alternativas terapéuticas. BORIS (*CTCF*L) ha surgido como un prometedor blanco terapéutico, el NCI (National Cancer Institute, USA) lo catalogo como uno de los 75 antígenos con prioridad en la investigación para el desarrollo de vacunas dirigidas (Cheever et al., 2009).

*CTCF*L es el único gen parálogo de *CTCF*, pertenece a la familia de genes TCA, un grupo de genes expresados en testículos normales y expresados anormalmente en tumores malignos (de Necochea-Campion et al., 2011). El gen *CTCF*L se ha encontrado sobreexpresado en una gran variedad de tipos de cáncer entre los que destaca el CaOv, esta sobreexpresión se ha relacionado con un pronóstico desfavorable para los pacientes (Woloszynska-Read et al., 2011). Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares que se ven alterados por este aumento de BORIS en CaOv. En el presente trabajo se analizaron DEG derivados de la sobreexpresión y el abatimiento de *CTCF*L en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario, obtenidos en nuestro grupo de investigación, con el fin de esclarecer los mecanismos que se ven regulados por el efecto de este gen en CaOv (Salgado-Albarrán et al., 2022).

Algunos de los DEG ya se habían reportado con anterioridad regulados por BORIS, como es el caso de *H19*, al cual lo encontramos dentro del grupo de DEG con expresión opuesta en ambas condiciones, siendo regulado al alta por la sobreexpresión de *CTCF*L, anteriormente se ha demostrado que el locus *IGF2/H19* se encuentra regulado por BORIS mediante la promoción de la metilación en el ICR de *H19* paterno (65,66). Otro de los DEG reportados con anterioridad es *ITGB1*, el cual se encuentra regulado por BORIS mediante su unión previa a la región promotora de este gen, además se encontró que BORIS promueve el fenotipo de invasión y migración en células de melanoma (Janssen et al., 2020). *FN1* es un gen

que, en análisis de microarreglos obtenidos anteriormente en nuestro grupo en el mismo tipo celular, se encontró diferencialmente expresados al abatir la expresión de *CTCFL* (Salgado-Albarrán et al., 2019).

Utilizando estos DEG reportados se obtuvo una red de interacciones asociada al abatimiento y la sobreexpresión de *CTCFL*, empleando KPM, el cual nos permitió extraer una red enriquecida de DEG integrada con datos biológicos de interacciones proteína-proteína contenidos en la base de datos de BioGRID (List et al., 2016). A partir de esta red realizamos un análisis de enriquecimiento funcional con el fin de localizar genes con importancia clínica en el CaOv. Encontramos que algunos de los genes representados en la red pertenecían a las vías PI3k-AKT, la cual ya se había encontrado desregulada por Salgado-Albarrán y colaboradores (Salgado-Albarrán et al., 2022), nuestros resultados además sugieren que la vía VEGFA-VEGFR2 (*VEGFA*, *TMOD1*, *INPP4B*, *FN1*, *TXNIP*), también se ve afectada por cambios en la expresión de *CTCFL*, se sabe que las alteraciones en los componentes de la vía de señalización PI3K / AKT / mTOR son comunes en los cánceres humanos, incluyendo el CaOv. Esta vía es muy importante en cáncer ya que se ha demostrado que está relacionada con la tumorigénesis, proliferación y progresión en distintos cánceres incluido el CaOv. Dada su importancia se han hecho pruebas clínicas de los inhibidores de los componentes de esta vía, sin embargo, no han pasado de las fases I y II, algunas de las causas es la resistencia y la toxicidad de los fármacos (Ediriweera et al., 2019).

Por su parte, en CaOv VEGFA-VEGFR2 es una vía de señalización de gran importancia ya que induce la proliferación y permeabilidad de las células endoteliales, migración, angiogénesis, supervivencia y el crecimiento tumoral (Abu-Jawdeh et al., 1996; Ferrara, 2004). En líneas celulares derivadas de cáncer de ovario se demostró que esta misma vía es la responsable de que las células sean capaces de evadir la anoikis (Sher et al., 2009). Además, se ha propuesto que en COE, en las células endoteliales la activación de VEGFR2 consecuente de la unión de VEGFA puede estimular la vía PI3k-AKT-mTOR que lleva a la supervivencia de células endoteliales y la permeabilidad vascular (Ferrara, 2004; Trinh et al., 2009).

Nuestros resultados proponen que BORIS participa en la regulación de genes que pertenecen a la vía VEGFA-VEGFR2, que a su vez regula la vía PI3k-AKT-mTOR. Por lo cual nuestro siguiente objetivo fue averiguar, si al igual que en líneas celulares de cáncer de ovario, BORIS está regulando esta vía en muestras de pacientes con CaOv, nuestros resultados demuestran que únicamente la expresión de los genes *VEGFA* y *FN1*, involucrados en las vías mencionadas anteriormente, son reguladas de manera positiva por la expresión de *CTCF* tanto en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario como en muestras de CaOv. Sin embargo, parte de las limitaciones del presente es el análisis basado en datos de expresión génica, es necesario comprobar que la expresión diferencial se traduce en cambios en la abundancia de proteínas, para poder validar nuestros resultados.

Además de los análisis de expresión diferencial Salgado-Albarrán y colaboradores, también determinaron *in silico* posibles dianas directas de BORIS mediante la búsqueda de BS 2kbp previos al TSS, proponiendo por primera vez a *VEGFA* como un posible diana de BORIS (Salgado-Albarrán et al., 2022). Nuestros análisis de esta región en *VEGFA* revela que el BS a BORIS coincide con marcas epigenéticas características de promotores, por lo cual esta región podría ser un promotor no reportado previamente. Cabe resaltar que nuestro análisis reveló que BORIS y CTCF comparten el mismo BS en la región promotora de *VEGFA*, la presencia de ambas proteínas se ha comprobado experimentalmente por ChIP-seq en las líneas CAOVR8 y K562. Esto supondría una competencia por el mismo BS que podría llevar a la formación de homodímeros de BORIS o heterodímeros con CTCF, estos resultados coinciden con los reportados en los que se observó que BORIS es capaz de reconocer los mismos sitios que CTCF principalmente en promotores y potenciadores, como lo propuesto por Pugacheva y col. (Pugacheva et al., 2015).

El producto del gen *VEGFA* además de ser el ligando de la vía VEGFA-VEGFR2 y su implicación con otras vías de señalización implicadas en cáncer mencionadas anteriormente, también se ha observado que en CaOv se correlaciona con aumento de ascitis, un estadio avanzado y menor supervivencia en pacientes (Elgaaen et al., 2012; Rudlowski et al., 2006). Dada su importancia se ha usado como biomarcador

y como blanco terapéutico, especialmente en pacientes con CaOv recurrente mediante la administración del anticuerpo monoclonal bevacizumab, esta estrategia terapéutica ha mostrado su eficacia clínica al extender la supervivencia libre de progresión (SSP) y la supervivencia general (SG) en pacientes en estadio avanzado y en CaOv resistente a tratamiento con platino. Sin embargo, a pesar de que bevacizumab ha demostrado una mejoría en la SSP, esta es de apenas 2-4 meses, además de asociarse a un mayor grado de efectos secundarios (Cortez et al., 2018; Wang et al., 2020).

Esto deja entrever que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para CaOv, dada la importancia de BORIS en diferentes neoplasias, investigadores se han centrado en el desarrollo de una vacuna basada en BORIS, se obtuvieron resultados prometedores de la vacunación en ratones, observaron que su administración contribuyó a la inhibición del crecimiento de carcinoma mamario y a una reducción en la metástasis (Mkrtichyan et al., 2011).

11. CONCLUSIÓN

En conjunto nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *CTCFL*, es característica en CaOv, lo cual promueve un aumento en la expresión de *VEGFA*. Por ello, proponemos que este pudiese ser un mecanismo mediante el cual BORIS regula a la expresión de *VEGFA* mediante su unión a su región promotora, derivando en cambios en la expresión génica de múltiples genes y vías de señalización con importancia en CaOv. Por ello, proponemos que el factor transcripcional BORIS estaría implicado en la activación de las vías de señalización que promueven la angiogénesis y proliferación, con una posible repercusión en la resistencia a quimioterapia y en un mal pronóstico para los pacientes con CaOv que sobreexpresen a *CTCFL*.

Dada la importancia de *VEGFA* en CaOv se han aprobado terapias basadas en anticuerpos, como Bevacizumab, que está aprobado por la FDA, sin embargo, se ha observado poco beneficio terapéutico (Lim et al., 2020).

Por lo tanto, nuestros estudios abren una nueva ventana donde BORIS podría ser un blanco terapéutico, en pacientes con CaOv, donde la inmunoterapia anti-*CTCFL* podría ser un enfoque terapéutico prometedor para esta neoplasia (Loukinov et al., 2002).

12. PERSPECTIVAS

Nuestros datos sugieren que BORIS desempeña un papel de factor transcripcional sobre *VEGFA* al unirse a su promotor, para probar esta hipótesis, se podría emplear genes reporteros que contengan al promotor de *VEGFA* y determinar el efecto de la sobreexpresión de BORIS. Un posible flujo de trabajo podría ser el esquematizado en la figura 8, en el cual proponemos obtener la secuencia de la región con los sitios de unión a BORIS en el promotor mínimo de *VEGFA*, lo cual podría contribuir al conocimiento de la regulación de este promotor en un contexto de cáncer y podría servir para la búsqueda de inhibidores específicos en tumores que sobreexpresen a BORIS. Esta secuencia se obtendría a partir de ADN de leucocitos y se amplificaría utilizando cebadores con secuencias de corte específicas que nos permitan la ligación y la digestión para la construcción de vectores. Se emplearía al vector pEGFP-1, que contiene a la secuencia de EGFP, como gen reportero.

La sobreexpresión de *CTCF* se realizaría mediante el vector pCpGfree-vitroHBORIS utilizado en ensayos anteriores (Salgado-Albarrán et al., 2022). Nuestra hipótesis principal sería que la sobreexpresión derivaría en un aumento en la proteína EGFP, lo que nos indicaría que estaría actuando como un factor de transcripción de activación del promotor de *VEGFA*.

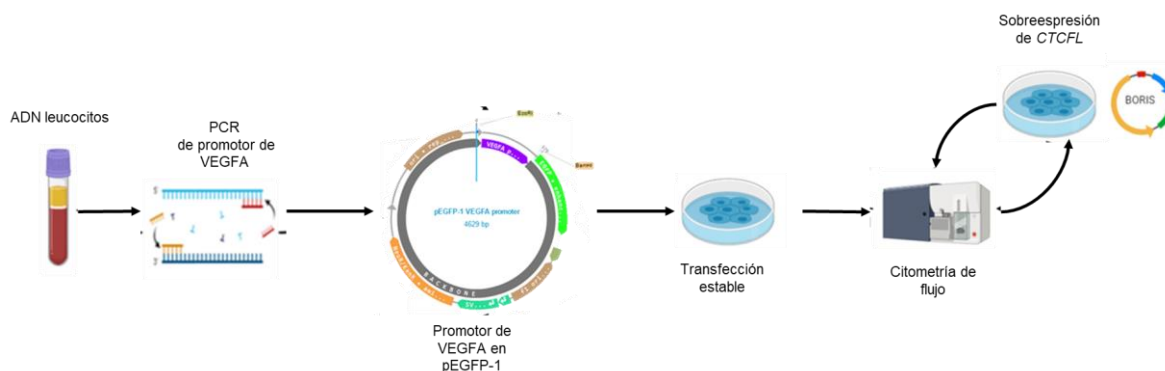


Figura 8. Diagrama del diseño experimental para ensayos de gen reportero EGFP. Obtención de ADN de leucocitos para amplificación del promotor de *VEGFA* por PCR, construcción de vector pEGFP-1 con promotor de *VEGFA*, transfección estable, medición de proteína EGFP por citometría de flujo, sobreexpresión de *CTCF* y cuantificación de aumento en la proteína EGFP.

13. MÉTODOS

13.1. Los análisis de enriquecimiento de vías *de novo*.

Se tomaron los resultados de análisis de expresiones diferenciales obtenidos en nuestro grupo de investigación mediante RNA-seq de células con sobreexpresión de *CTCF*L (transfección del plásmido pCpGfree-vitroHBORIS) y con KD de *CTCF*L (mediante el uso de RNAs interferentes). El análisis de expresión diferencial se realizó con DESeq2 v1.22.2, los genes seleccionados presentaron $|\text{Fold Change}| > 2$ y $\text{FDR } p\text{-adj} < 0.1$ (para *CTCF*L-OE frente a Control) y $\text{FDR } p\text{-adj} < 0.05$ (para *CTCF*L-KD frente a Control) los datos de estos análisis están disponibles en la base de datos GEO (acceso a GEO GSE166767). Se reportaron 149 DEG compartidos en ambas condiciones (Salgado-Albarrán et al., 2022).

Utilizando estos DEG se construyó una matriz identificatoria personalizada usando los DEG en *CTCF*L-OE y *CTCF*L-KD como genes activos, esta matriz se usó como entrada para el enriquecimiento de la vía *de novo* con KeyPathwayMiner (KPM) (List et al., 2016), además de una red de interacciones físicas proteína-proteína de *Homo sapiens* obtenida de BioGrid, se empleó el algoritmo de búsqueda Greedy y la estrategia de búsqueda INES con parámetros $K = 2$, $L = 0$. Las redes se visualizaron empleando Cytoscape (Shannon et al., 2003).

13.2. El análisis de enriquecimiento funcional

Utilizando los genes obtenidos en la red resultante de interacciones de proteínas, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando gProfiles con un límite de $p < 0.05$

13.3. La determinación de la expresión génica en muestra de ovario neoplásicas y sanas

Se utilizaron los RSEM expected_count normalizados con DESeq2 de las bases de datos TCGA, TARGET y GTEx disponibles en la plataforma Xena Browser (78), se obtuvo información de un total de 419 muestras neoplásicas (TCGA) y 88 muestras de tejido normal (GTEx), representadas en el grupo CONTROL_SANO. Las 419 muestras de tumor se ordenaron de manera ascendente y se dividieron en cuartiles utilizando cut2 del paquete Hmisc en RStudio, las muestras pertenecientes al cuartil superior se categorizaron en UP_BORIS, este grupo está conformado por un total de 39 muestras neoplásicas, por su parte, el cuartil inferior se denominó DOWN_BORIS conteniendo un total de 129 muestras como se observa en la figura complementaria 2.

Los RSEM expected_count normalizados de los genes *TMOD1*, *VEGFA*, *FN1*, *NTRK1*, *INPP4B*, *CTCF*, *TXNIP*, *ELAVL1* de los grupos CONTROL_SANO, UP_BORIS y DOWN_BORIS se graficaron, posteriormente se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) mediante la prueba de Tukey con un 95% de confianza a los datos graficados.

13.4. El análisis de la región promotora de *VEGFA*

Los datos de ChIP-seq con formato WIG para BORIS y CTCF en líneas celulares OVCAR8 se obtuvieron de Pugacheva y col. (Pugacheva et al., 2015) disponible en la base de datos GEO (acceso a GEO GSE70764). Las coordenadas se convirtieron al ensamblaje del genoma GRCh38/hg38 usando la herramienta liftOver de UCSC Genome Browser (Kuhn et al., 2013). Los datos de ChIP-seq para K562 se obtuvieron de ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012). La visualización de las señales y los picos de ChIP-seq de ambas líneas celulares se realizó con el software IGV (Robinson et al., 2011) .

Se empleó UCSC Genome Browser (Kuhn et al., 2013), para la visualización de los motivos de unión a BORIS y CTCF reportados en JASPAR (Fornes et al., 2020) y Factorbook (Wang et al., 2012), promotores reportados en EDP (Périer et al., 2000), la señal de CAGE de diferentes líneas celulares (Takahashi et al., 2012) y de factores de transcripción almacenados en ORegAnno (Lesurf et al., 2016).

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Jawdeh, G.M., Faix, J.D., Niloff, J., Tognazzi, K., Manseau, E., Dvorak, H.F., Brown, L.F., 1996. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 74, 1105–1115.
- American Cancer Society, 2021. Cancer Facts & Figures 2021 [WWW Document]. Cancer Facts Fig. 2021. URL <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html> (accessed 2.1.21).
- American Cancer Society, 2018. Targeted Therapy for Ovarian Cancer [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/treating/targeted-therapy.html> (accessed 2.21.21).
- American Cancer Society, n.d. Ovarian Cancer Surgery | Debulking Surgery | Omentum Removal [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/treating/surgery.html> (accessed 2.20.21).
- Arzate-Mejía, R.G., Recillas-Targa, F., Corces, V.G., 2018. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development* 145, dev137729. <https://doi.org/10.1242/dev.137729>
- Atallah, G.A., Abd. Aziz, N.H., Teik, C.K., Shafiee, M.N., Kampan, N.C., 2021. New Predictive Biomarkers for Ovarian Cancer. *Diagnostics* 11, 465. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030465>
- Bergmaier, P., Weth, O., Dienstbach, S., Boettger, T., Galjart, N., Mernberger, M., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., 2018. Choice of binding sites for CTCFL compared to CTCF is driven by chromatin and by sequence preference. *Nucleic Acids Res.* 46, 7097–7107. <https://doi.org/10.1093/nar/gky483>
- Bridges, E.M., Harris, A.L., 2011. The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1183–1191. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.016>
- Chao, W., Huynh, K.D., Spencer, R.J., Davidow, L.S., Lee, J.T., 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 295, 345–347. <https://doi.org/10.1126/science.1065982>
- Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Steinman, R.M., Viner, J.L., Weiner, L.M., Matrisian, L.M., 2009. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5323–5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
- Chen, K., Huang, W., Huang, B., Wei, Y., Li, B., Ge, Y., Qin, Y., 2013. BORIS, Brother of the Regulator of Imprinted Sites, Is Aberrantly Expressed in Hepatocellular Carcinoma. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 17, 160–165. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0242>
- Cho, K.R., Shih, I.-M., 2009. OVARIAN CANCER. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>

- Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A., Lisowska, K.M., 2018. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 81, 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D.E., Roh, T.-Y., Cui, K., Zhao, K., 2009. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res.* 19, 24–32. <https://doi.org/10.1101/gr.082800.108>
- de Necochea-Campion, R., Ghochikyan, A., Josephs, S.F., Zacharias, S., Woods, E., Karimi-Busheri, F., Alexandrescu, D.T., Chen, C.-S., Agadjanyan, M.G., Carrier, E., 2011. Expression of the Epigenetic factor BORIS (CTCF-L) in the Human Genome. *J. Transl. Med.* 9, 213. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-213>
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Dobbin, Z.C., Landen, C.N., 2013. The Importance of the PI3K/AKT/MTOR Pathway in the Progression of Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8213–8227. <https://doi.org/10.3390/ijms14048213>
- Ediriweera, M.K., Tennekoon, K.H., Samarakoon, S.R., 2019. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin. Cancer Biol.* 59, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.012>
- Elgaaen, B.V., Olstad, O.K., Sandvik, L., Ødegaard, E., Sauer, T., Staff, A.C., Gautvik, K.M., 2012. ZNF385B and VEGFA Are Strongly Differentially Expressed in Serous Ovarian Carcinomas and Correlate with Survival. *PLOS ONE* 7, e46317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046317>
- ENCODE Project Consortium, 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Ernst, J., Kellis, M., 2010. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat. Biotechnol.* 28, 817–825. <https://doi.org/10.1038/nbt.1662>
- Ferrara, N., 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.* 25, 581–611. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0027>
- Ferrara, N., Kerbel, R.S., 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967–974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>
- Fornes, O., Castro-Mondragon, J.A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P.A., Modi, B.P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W.W., Mathelier, A., 2020. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 48, D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
- Ghoneum, A., Said, N., 2019. PI3K-AKT-mTOR and NFκB Pathways in Ovarian Cancer: Implications for Targeted Therapeutics. *Cancers* 11, 949. <https://doi.org/10.3390/cancers11070949>
- Grunewald, T., Ledermann, J.A., 2017. Targeted Therapies for Ovarian Cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 41, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.12.001>

- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., Tilghman, S.M., 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486–489. <https://doi.org/10.1038/35013106>
- Hore, T.A., Deakin, J.E., Graves, J.A.M., 2008. The Evolution of Epigenetic Regulators CTCF and BORIS/CTCF in Amniotes. *PLOS Genet.* 4, e1000169. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000169>
- Janssen, S.M., Moscona, R., Elchebly, M., Papadakis, A.I., Redpath, M., Wang, H., Rubin, E., van Kempen, L.C., Spatz, A., 2020. BORIS/CTCF promotes a switch from a proliferative towards an invasive phenotype in melanoma cells. *Cell Death Discov.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0235-x>
- Jiang, S., Mortazavi, A., 2018. Integrating ChIP-seq with other functional genomics data. *Brief. Funct. Genomics* 17, 104–115. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely002>
- Jones, M.R., Kamara, D., Karlan, B.Y., Pharoah, P.D.P., Gayther, S.A., 2017. Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. *Gynecol. Oncol.* 147, 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.10.001>
- Kalejks, M., Erenpreisa, J., 2005. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and “brain-storming” session. *Cancer Cell Int.* 5, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-4>
- Kim, J., 2008. Multiple YY1 and CTCF binding sites in imprinting control regions. *Epigenetics* 3, 115–118. <https://doi.org/10.4161/epi.3.3.6176>
- Kim, S., Yu, N.-K., Kaang, B.-K., 2015. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Exp. Mol. Med.* 47, e166–e166. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.33>
- Kim, T.H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanenkova, V.V., Ren, B., 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF binding sites in the human genome. *Cell* 128, 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.048>
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E., Lobanenkova, V.V., 1993. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7612–7624.
- Koti, M., Gooding, R.J., Nuin, P., Haslehurst, A., Crane, C., Weberpals, J., Childs, T., Bryson, P., Dharsee, M., Evans, K., Feilotter, H.E., Park, P.C., Squire, J.A., 2013. Identification of the IGF1/PI3K/NF κ B/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 13, 549. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-549>
- Kuhn, R.M., Haussler, D., Kent, W.J., 2013. The UCSC genome browser and associated tools. *Brief. Bioinform.* 14, 144–161. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs038>

- Kumaran, G.C., Jayson, G.C., Clamp, A.R., 2009. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604767>
- Lesurf, R., Cotto, K.C., Wang, G., Griffith, M., Kasaian, K., Jones, S.J.M., Montgomery, S.B., Griffith, O.L., 2016. ORegAnno 3.0: a community-driven resource for curated regulatory annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D126–D132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1203>
- Lim, D., Do, Y., Kwon, B.S., Chang, W., Lee, M.-S., Kim, J., Cho, J.G., 2020. Angiogenesis and vasculogenic mimicry as therapeutic targets in ovarian cancer. *BMB Rep.* 53, 291–298. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.6.060>
- Link, P.A., Zhang, W., Odunsi, K., Karpf, A.R., 2013. BORIS/CTCF mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun.* 13.
- List, M., Alcaraz, N., Dissing-Hansen, M., Ditzel, H.J., Mollenhauer, J., Baumbach, J., 2016. KeyPathwayMinerWeb: online multi-omics network enrichment. *Nucleic Acids Res.* 44, W98–W104. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw373>
- Lobanekov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V., Goodwin, G.H., 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5, 1743–1753.
- Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S.D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A.A., Cui, H., Niemitz, E.L., Rasko, J.E.J., Docquier, F.M., Kistler, M., Breen, J.J., Zhuang, Z., Quitschke, W.W., Renkawitz, R., Klenova, E.M., Feinberg, A.P., Ohlsson, R., Morse, H.C., Lobanekov, V.V., 2002. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6806–6811. <https://doi.org/10.1073/pnas.092123699>
- Marshall, A.D., Bailey, C.G., Rasko, J.E., 2014. CTCF and BORIS in genome regulation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 24, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.10.011>
- Martinez, S.R., Miranda, J.L., 2010. CTCF terminal segments are unstructured. *Protein Sci.* 19, 1110–1116. <https://doi.org/10.1002/pro.367>
- Martin-Kleiner, I., 2012. BORIS in human cancers – A review. *Eur. J. Cancer* 48, 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.09.009>
- Mkrtichyan, M., Ghochikyan, A., Davtyan, H., Movsesyan, N., Loukinov, D., Lobanekov, V., Cribbs, D.H., Laust, A.K., Nelson, E.L., Agadjanyan, M.G., 2011. Cancer-testis antigen, BORIS based vaccine delivered by dendritic cells is extremely effective against a very aggressive and highly metastatic mouse mammary carcinoma. *Cell. Immunol.* 270, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.007>
- National Cancer Institute, 2021. Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version - [WWW Document]. URL <https://www.cancer.gov/types/ovarian/hp/ovarian-epithelial-treatment-pdq> (accessed 2.18.21).

- Nguyen, P., Cui, H., Bisht, K.S., Sun, L., Patel, K., Lee, R.S., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Gius, D., 2008. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.* 68, 5546–5551. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1005>
- Nilsson, M., Heymach, J.V., 2006. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *J. Thorac. Oncol.* 1, 768–770. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)30404-4](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)30404-4)
- Norquist, B.M., Harrell, M.I., Brady, M.F., Walsh, T., Lee, M.K., Gulsuner, S., Bernards, S.S., Casadei, S., Yi, Q., Burger, R.A., Chan, J.K., Davidson, S.A., Mannel, R.S., DiSilvestro, P.A., Lankes, H.A., Ramirez, N.C., King, M.C., Swisher, E.M., Birrer, M.J., 2016. Inherited Mutations in Women with Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2, 482–490. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5495>
- Périer, R.C., Praz, V., Junier, T., Bonnard, C., Bucher, P., 2000. The Eukaryotic Promoter Database (EPD). *Nucleic Acids Res.* 28, 302–303.
- Phillips, J.E., Corces, V.G., 2009. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* 137, 1194–1211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001>
- Prat, J., Belhadj, H., Berek, J., Bermudez, A., Bhatla, N., Cain, J., Denny, L., Fujiwara, K., Hacker, N., Avall-Lundqvist, E., Mutch, D., Odicino, F., Pecorelli, S., Quinn, M., Seoud, M. a.-F., Shrivastava, S.K., FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015. Abridged republication of FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 36, 367–369.
- Prat, J., FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2014. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* 124, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>
- Pugacheva, E.M., Rivero-Hinojosa, S., Espinoza, C.A., Méndez-Catalá, C.F., Kang, S., Suzuki, T., Kosaka-Suzuki, N., Robinson, S., Nagarajan, V., Ye, Z., Boukaba, A., Rasko, J.E.J., Strunnikov, A.V., Loukinov, D., Ren, B., Lobanenkova, V.V., 2015. Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions. *Genome Biol.* 16, 161. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0736-8>
- Pugacheva, E.M., Suzuki, T., Pack, S.D., Kosaka-Suzuki, N., Yoon, J., Vostrov, A.A., Barsov, E., Strunnikov, A.V., Iii, H.C.M., Loukinov, D., Lobanenkova, V., 2010. The Structural Complexity of the Human BORIS Gene in Gametogenesis and Cancer. *PLOS ONE* 5, e13872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013872>
- Ren, G., Zhao, K., 2019. CTCF and cellular heterogeneity. *Cell Biosci.* 9. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0347-2>
- Renaud, S., Pugacheva, E.M., Delgado, M.D., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., Benhattar, J., Lobanenkova, V., 2007. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 35, 7372–7388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm896>

- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rojas, V., Hirshfield, K.M., Ganesan, S., Rodriguez-Rodriguez, L., 2016. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2113. <https://doi.org/10.3390/ijms17122113>
- Rudlowski, C., Pickart, A.-K., Fuhljahn, C., Friepoertner, T., Schlehe, B., Biesterfeld, S., Schroeder, W., 2006. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 16 Suppl 1, 183–189. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00307.x>
- Salgado-Albarrán, M., González-Barrios, R., Guerra-Calderas, L., Alcaraz, N., Sánchez-Correa, T.E., Castro-Hernández, C., Sánchez-Pérez, Y., Aréchaga-Ocampo, E., García-Carrancá, A., León, D.C. de, Herrera, L.A., Baumbach, J., Soto-Reyes, E., 2019. The epigenetic factor BORIS (CTCF-L) controls the androgen receptor regulatory network in ovarian cancer. *Oncogenesis* 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0150-2>
- Salgado-Albarrán, M., Späth, J., González-Barrios, R., Baumbach, J., Soto-Reyes, E., 2022. CTCFL regulates the PI3K-Akt pathway and it is a target for personalized ovarian cancer therapy. *Npj Syst. Biol. Appl.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41540-022-00214-z>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shek, D., Read, S.A., Ahlenstiel, G., Piatkov, I., 2019. Pharmacogenetics of anticancer monoclonal antibodies. *Cancer Drug Resist.* 2, 69–81. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.20>
- Sher, I., Adham, S.A., Petrik, J., Coomber, B.L., 2009. Autocrine VEGF-A/KDR loop protects epithelial ovarian carcinoma cells from anoikis. *Int. J. Cancer* 124, 553–561. <https://doi.org/10.1002/ijc.23963>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2022. Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* 72, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Sleutels, F., Soochit, W., Bartkuhn, M., Heath, H., Dienstbach, S., Bergmaier, P., Franke, V., Rosa-Garrido, M., van de Nobelen, S., Caesar, L., van der Reijden, M., Bryne, J.C., van IJcken, W., Grootegoed, J.A., Delgado, M.D., Lenhard, B., Renkawitz, R., Grosveld, F., Galjart, N., 2012. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner. *Epigenetics Chromatin* 5, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-8>
- Soltanian, S., Dehghani, H., 2018. BORIS: a key regulator of cancer stemness. *Cancer Cell Int.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0650-8>
- Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S., 2019. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* 35, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Sun, L., Huang, L., Nguyen, P., Bisht, K.S., Bar-Sela, G., Ho, A.S., Bradbury, C.M., Yu, W., Cui, H., Lee, S., Trepel, J.B., Feinberg, A.P., Gius, D., 2008. DNA

- Methyltransferase 1 and 3B Activate BAG-1 Expression via Recruitment of CTCFL/BORIS and Modulation of Promoter Histone Methylation. *Cancer Res.* 68, 2726–2735. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6654>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takahashi, H., Kato, S., Murata, M., Carninci, P., 2012. CAGE- Cap Analysis Gene Expression: a protocol for the detection of promoter and transcriptional networks. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 786, 181–200. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-292-2_11
- Trinh, X.B., Tjalma, W.A.A., Vermeulen, P.B., Van den Eynden, G., Van der Auwera, I., Van Laere, S.J., Helleman, J., Berns, E.M.J.J., Dirix, L.Y., van Dam, P.A., 2009. The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 100, 971–978. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604921>
- Vostrov, A.A., Quitschke, W.W., 1997. The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 272, 33353–33359. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.33353>
- Wang, J., Zhuang, J., Iyer, S., Lin, X., Whitfield, T.W., Greven, M.C., Pierce, B.G., Dong, X., Kundaje, A., Cheng, Y., Rando, O.J., Birney, E., Myers, R.M., Noble, W.S., Snyder, M., Weng, Z., 2012. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res.* 22, 1798–1812. <https://doi.org/10.1101/gr.139105.112>
- Wang, Q., Peng, H., Qi, X., Wu, M., Zhao, X., 2020. Targeted therapies in gynecological cancers: a comprehensive review of clinical evidence. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 1–34. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0199-6>
- Woloszynska-Read, A., James, S.R., Link, P.A., Yu, J., Odunsi, K., Karpf, A.R., 2007. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer. *Cancer Immun.* 7, 21.
- Woloszynska-Read, A., Zhang, W., Yu, J., Link, P.A., Mhawech-Fauceglia, P., Collamat, G., Akers, S.N., Ostler, K.R., Godley, L.A., Odunsi, K., Karpf, A.R., 2011. Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 2170–2180. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2315>
- Zyl, B. van, Tang, D., Bowden, N.A., 2018. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocr. Relat. Cancer* 25, R303–R318. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0336>

15. SUPLEMENTARIAS

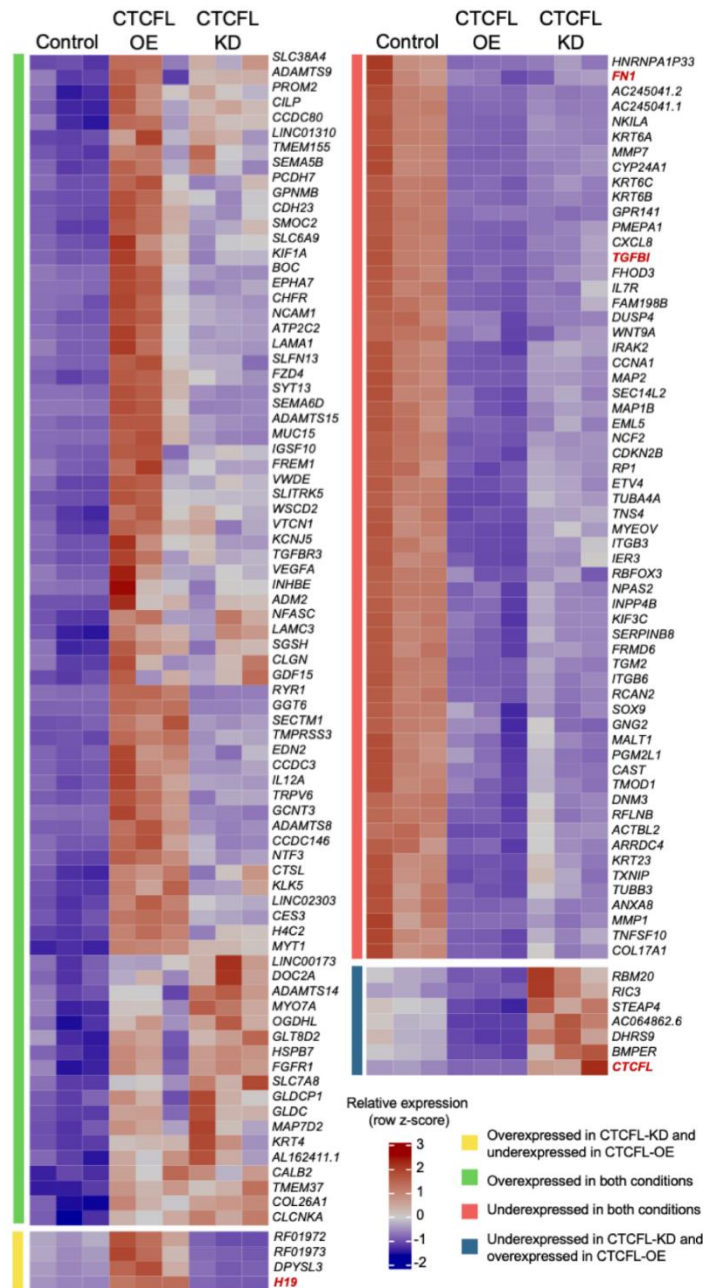
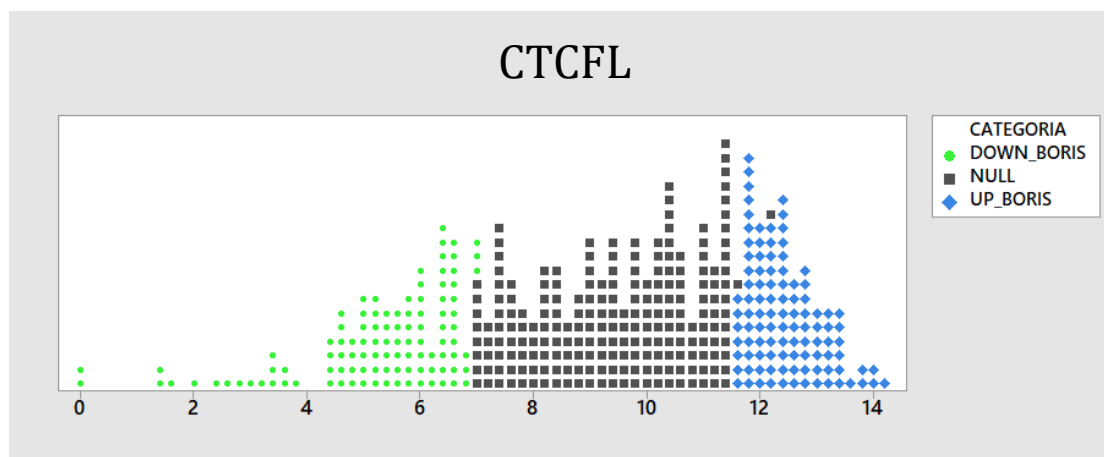


Figura suplementaria 1. Expresión génica relativa (puntuación z de lecturas normalizadas) de los 149 DEG encontrados en las condiciones experimentales **CTCFL-OE** y **CTCFL-KD**, clasificadas por el cambio de expresión génica. Los nombres de genes en rojo indican objetivos transcripcionales de BORIS informados anteriormente. Tomado de (Salgado-Albarrán et al., 2022)

A



B

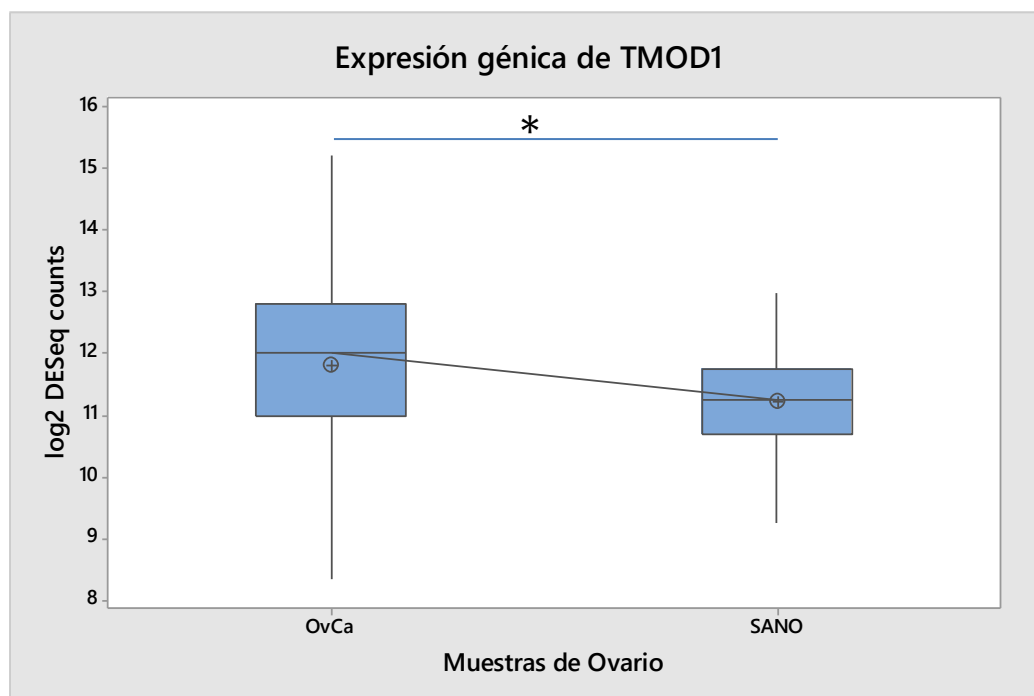


Figura suplementaria 2. Niveles de expresión en Muestras de Ovario. A. Segmentación en cuartiles de muestras neoplásicas (n=419) de acuerdo con base a los niveles de expresión de *CTCFL*. B. Expresión de *TMOD1* en muestras de pacientes con CaOv (n=419) vs muestras de ovario sano (n=88). *p<0.05

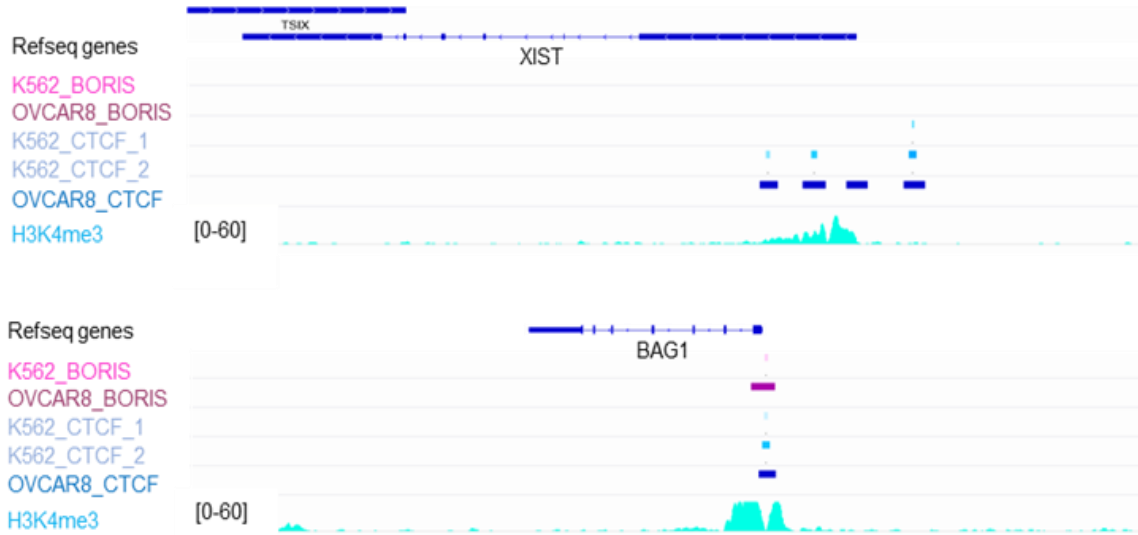


Figura suplementaria 3. Región promotora de los genes *XIST* y *BAG1*. Picos de CTCF y BORIS de ChiP-seq en las líneas celulares K562 y OVCAR8, señal de la marca característica de promotores H3K4me3 ChIP-seq obtenida de las líneas celulares disponibles en ENCODE ChIP-seq. Imagen obtenida con visualizador IGV.

16. PUBLICACIONES GENERADAS



The Regulatory Roles of Non-coding RNAs in Angiogenesis and Neovascularization From an Epigenetic Perspective

Itzel Alejandra Hernández-Romero[†], Lissania Guerra-Calderas[†],
Marisol Salgado-Albarrán, Tatiana Maldonado-Huerta and Ernesto Soto-Reyes*

Natural Sciences Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Erika Ruiz-García,
National Institute of Cancerology
(INCan), Mexico

Reviewed by:

Fahd Al-Mulla,
Genatak, Kuwait
Shao-Chun Wang,
China Medical University, Taiwan

*Correspondence:

Ernesto Soto-Reyes
esotoreyes@correo.cua.uam.mx

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 20 June 2019

Accepted: 03 October 2019

Published: 24 October 2019

Citation:

Hernández-Romero IA,
Guerra-Calderas L,
Salgado-Albarrán M,
Maldonado-Huerta T and
Soto-Reyes E (2019) The Regulatory
Roles of Non-coding RNAs in
Angiogenesis and Neovascularization
From an Epigenetic Perspective.
Front. Oncol. 9:1091.
doi: 10.3389/fonc.2019.01091

Angiogenesis is a crucial process for organ morphogenesis and growth during development, and it is especially relevant during the repair of wounded tissue in adults. It is coordinated by an equilibrium of pro- and anti-angiogenic factors; nevertheless, when affected, it promotes several diseases. Lately, a growing body of evidence is indicating that non-coding RNAs (ncRNAs), such as miRNAs, circRNAs, and lncRNAs, play critical roles in angiogenesis. These ncRNAs can act *in cis* or *trans* and alter gene transcription by several mechanisms including epigenetic processes. In the following pages, we will discuss the functions of ncRNAs in the regulation of angiogenesis and neovascularization, both in normal and disease contexts, from an epigenetic perspective. Additionally, we will describe the contribution of Next-Generation Sequencing (NGS) techniques to the discovery and understanding of the role of ncRNAs in angiogenesis.

Keywords: angiogenesis, non-coding RNA, epigenetics, neovascularization, next generation sequencing, miRNAs, lncRNAs, circRNA

INTRODUCTION

In the vascular network, blood vessels act as channels for nutrients, oxygen delivery, and metabolic waste evacuation. The growth of new capillary vessels, known as angiogenesis, plays key roles in embryonic development and in tissue homeostasis and remodeling in adults, as well as in cancer initiation and progression (1, 2). The balance between pro- and anti-angiogenic factors (such as VEGF, PDGF, and TSP-1/2) coordinates angiogenesis and other neovascularization mechanisms such as intussusceptive angiogenesis, vasculogenesis, lymphangiogenesis, vessel co-option, and vasculogenic mimicry (3–5).

Over the last few decades, the study of angiogenesis has helped researchers to understand vascular physiology and its implications for several diseases. For instance, in atherosclerosis, ischemia, and retinopathy, excessive or insufficient vascular growth can affect the behavior of endothelial and smooth muscle cells (6, 7). Studies of the neovascularization processes have also provided molecular targets for the development of therapies to delay cancer progression, since it is well-known that angiogenesis is an essential process that is altered in tumors (8).

Nowadays, the study of the molecular mechanisms involved in angiogenesis is being built on different experimental approaches, such as cell migration, proliferation, and metabolic assays or histological and tri-dimensional models, that approach specific stages of angiogenesis; however, only pieces of the puzzle have been elucidated (9). With advances in high-throughput genomic

technologies such as microarrays, next-generation sequencing (NGS), and bioinformatic analyses, a genome-wide perspective of the elements involved in the angiogenic process is now being taken. Some of the newest players revealed by these approaches are non-coding RNAs (ncRNAs), which have gained relevance in the field of epigenetics (10–12). Therefore, in this review, we will describe the epigenetic regulatory functions of ncRNAs in physiological angiogenesis and vascular diseases, as well as the contribution of NGS technologies to the discovery of new roles for ncRNAs that are associated with angiogenesis.

AN OVERVIEW OF EPIGENETICS

In 1939, the term “epigenetics” was coined by Conrad Hal Waddington (13). Today, one of the most accepted definitions of the term explains that “epigenetics is the study of the heritable changes in gene expression that cannot be explained by alterations in the DNA sequence” (14). Among the epigenetic components that coordinate nucleus organization and gene transcription are DNA methylation, histone post-translational modifications (PTMs), and histone positioning, but recently, ncRNAs have been incorporated as epigenetic modifiers, because many of these can function as scaffolding elements to transport proteins with epigenetic functions (15). Each of these processes is stimulated by the signals derived from a dynamic epigenetic code that is established on the chromatin depending on the physiological and extracellular context. The writers, readers, and erasers of this code are proteins that place, recognize, or remove chemical modifications of DNA nucleotides and within the amino-terminal regions of histones. Most chromatin “writers” are methyltransferases that catalyze the transfer of methyl groups. DNA methylation occurs predominantly in regions enriched in CpG sites. The occurrence of methylation at the promoter regions of genes is associated with gene silencing. PTMs alter the regulation of gene transcription by changing the structure of chromatin depending on the particular residue that is modified (16, 17). The “readers” are proteins that recognize and associate with the epigenetic modifications, interpret them, and, in many cases, promote the assembly of protein complexes. The erasers remove the modifications and, therefore, alter signaling

Abbreviations: BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; BRG1, Brahma related gene-1; CAD, Coronary Artery Disease; circRNA, circular RNAs; DEGs, Differentially Expressed Genes; DNMT, DNA methyltransferase; EIcRNAs, Exon-intron circular RNAs; EPCs, Endothelial Progenitor Cells; EZH2, Enhancer of Zeste Homolog 2; GRO-Seq, Global run-on sequencing; HDAC, Histone deacetylase; HDL, High-density lipoprotein; HF, Heart Failure; HIF1, Hypoxia Inducible Factors 1; HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells; IH, Infantile hemangioma; lincRNAs, intergenic lncRNAs; lncRNAs, long non-coding RNAs; LOXL2, Lysyl oxidase-like 2; MeCP2, Methyl-CpG-binding protein 2; miRNAs, microRNAs; MMP, Matrix metalloproteinase; mRNA, messenger RNA; ncRNAs, non-coding RNAs; NGS, Next-Generation Sequencing; PB-EPCs, Peripheral Blood EPCs; PRC, Polycomb Repressive Complex; pre-miRNA, precursor hairpin miRNA; REST, Repressor Element-1 Silencing Transcription; RNA-seq, RNA sequencing; SIRT1, NAD-dependent deacetylase sirtuin1; smRNA-seq, small RNA-seq; SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms; SUZ12, Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog 2; TF, Transcription Factor; TGF- β , Transforming Growth Factor; TSS, Transcription Start Sites; UC-EPCs, Umbilical Cord EPCs; UHRF1, E3 ubiquitin ligase with PHD and RING finger domain 1; VASH1, Angiogenesis inhibitor vasohibin 1; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

components that contribute to the regulation of gene expression. Recently, it has been reported that ncRNAs can mediate the binding of epigenetic proteins to their target sequences. Though they do not function alone as “classic” epigenetic modifiers, they play a vital role in both the recruitment and transcriptional regulation of epigenetic modifiers (18). In fact, multiple chromatin-remodeling enzymes have been shown to directly contact ncRNAs, including Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) and Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog (SUZ12) (writer and eraser within the Polycomb repressive complex 2/PRC2, respectively), and nuclear architectural proteins like Yin Yang 1 and CTCF, among others (19–22). The incorporation of ncRNAs as epigenetic elements has opened up new fields of study in which they have been shown to regulate gene expression. In the following pages, we will provide an overview of the ncRNAs involved in angiogenesis, focusing on those involved in epigenetic processes.

MiRNAs AND THEIR EPIGENETIC TARGETS IN NEOVASCULARIZATION AND ANGIOGENIC PROCESSES

MicroRNAs (miRNAs) are short ncRNAs with a length of 19–23 nucleotides that are conserved in animals, plants, and some viruses (23–25). MiRNAs are transcribed as long pri-microRNAs (pri-miRNA) and are subsequently processed to ~70-nucleotide precursor hairpins (pre-miRNA) by the RNase Drosha (26). Pre-miRNAs are then exported to the cytoplasm and recognized by the RNase DICER, which removes the loop linking the 3' and 5' ends of the hairpin, producing a ~20-nucleotide miRNA duplex (27). Later, one of these strands is fused into the RNA Induced Silencing Complex (RISC), where both the miRNA and its messenger RNA (mRNA) target interact (28).

MiRNAs have two main functions: post-transcriptional gene regulation and RNA silencing. They act by pairing bases with a complementary sequence located in the 3'UTR region of target mRNA (29, 30). Consequently, these mRNAs are regulated by one or more mechanisms that include the inhibition of mRNA translation to proteins by ribosomes and by mRNA strand cleavage into two fragments and poly(A) tail shortening that results in mRNA disruption (29, 31). In the last 10 years, the field of miRNA biology has ignited, revealing amazing functions in angiogenesis. These miRNAs have been termed angiomiRs, and they target key angiogenesis molecular drivers, such as metalloproteinases, hypoxia inducible factor 1 (HIF1), cytokines, and growth factors, such as EGFL7, FGF11, PDGFRB, and the vascular endothelial growth factor (VEGF) family (32–34).

MiRNAs are not considered epigenetic components, but some of them are modulated by epigenetic mechanisms. This mainly affects their regulatory region through the incorporation of DNA methylation, repressive histone marks, or the loss of transcriptional factors, as has been reported for *miR-125b1* and *miR-124* (35, 36). Others, known as Epi-miRNAs, can also regulate the gene expression of epigenetic elements, DNA methyltransferases (DNMTs) (such as *miR-152*, *miR-30*, and *miR-148a/b*), histone deacetylases (HDACs) (such as *miR-140*,

miR-1, and *miR-449a*), and the Polycomb Group of genes (such as *miR-101* and *miR-26a*) (37–44), and some of them have been considered angiomiRs (39, 40). MiRNAs and their identified epigenetic targets in angiogenesis are listed in **Table 1**.

MiR-30a-3p

Transforming Growth Factor (TGF- β) is a relevant cytokine that functions in the process of vascular homeostasis and is involved in the vascular development of endothelial cells. It has been reported that the administration of TGF- β to endothelial cells leads to decreased *miR-30a-3p* expression. The absence of this microRNA results in increased levels of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), a protein associated with silencing of *SIRT1* (45). *SIRT1* is necessary for the migration of endothelial cells to occur throughout sprouting angiogenesis, and the loss of this enzyme induces abnormal angiogenesis *in vivo* (52). Conversely, increased levels of *miR-30a-3p* expression lead to the activation of *SIRT1* expression (**Figure 1A**). Further experiments revealed that MeCP2 enhanced the methylation status of the *SIRT1* promoter, probably by DNMT1 recruitment, leading to a reduction in *SIRT1* expression and endothelial angiogenic defects (53).

MiR-101

The microRNA *miR-101* acts as a tumor suppressor, promoting apoptosis and inhibiting cell proliferation, angiogenesis, invasion, and metastasis. *MiR-101* performs its regulatory functions by targeting an abundant range of epigenetic molecular effectors, such as *DNMT3A*, *EZH2*, and *HDAC9* (54, 55). In endothelial cells, high levels of VEGF are associated with the downregulation of *miR-101*, allowing an increase in *EZH2* (46). *EZH2* is associated with the formation of heterochromatin and can affect multiple target genes such as Vasohibin 1 (*VASH1*), which functions as a negative feedback modulator of angiogenesis in vascular endothelial cells (56, 57) (**Figure 1B**). The overexpression *miR-101* leads to *EZH2* repression and the activation of *VASH1* transcription. This evidence, taken together, suggests that *miR-101* is involved in multiple processes such as cellular growth attenuation, migration, and invasion mechanisms and the ability of endothelial cells to form capillary-like structures in glioblastomas (47).

MiR-20a

MiR-20a belongs to the *miR-17-92* cluster and has been linked to breast cancer cells with a high angiogenic profile. High levels of *miR-20a* are correlated with complex vascular structures and larger vessels, suggesting that *miR-20a* could be used as a potential new angiogenic target (58). Additionally, overexpression of *miR-20a* affects the mRNA stability of the lysine acetyltransferase, p300. In mouse myocardium cells, p300 is a key factor that regulates angiogenic and hypertrophic programs, influencing the expression of many related genes, such as *Hif1*, *Vegfc*, *Vegfa*, *Angpt1*, and *Egln3*. Interestingly, high p300 levels induce an increase in the expression of *miR-20a*, providing a feedback inhibition loop for p300 that prevents its pro-angiogenic effects (48).

MiR-137

MiR-137 has a tumor suppressor gene function that has been reported for several neoplasms (49, 59, 60). It was also reported that this miRNA can inhibit angiogenesis and cell proliferation by *EZH2* downregulation in glioblastomas. Overexpression of *miR-137* reduces the mRNA and protein levels of *EZH2*, while downregulation of *miR-137* is associated with poor prognosis in affected patients (49).

MiR-124

The miRNA *miR-124* is highly conserved, from nematodes to humans. Three human genes encoding *miR-124* have previously been characterized (*miR124a-1*, *miR-124a-2*, and *miR-124a-3*) and the majority have been shown to be deregulated in neoplasms (61). Also, it has been shown that expression of *miR-124* is elevated after treatment with certain drugs such as niclosamide. In this case, it is associated with the inhibition of vasculogenic mimicry formation, particularly by reducing levels of phosphorylated STAT3 (62).

Some reports propose that *miR-124* suppresses the E3 ubiquitin ligase with PHD and RING finger domain 1 (*UHRF1*) expression, a factor involved in the recruitment of epigenetic components in bladder cancer tissues. Also, *UHRF1* is known to enhance malignancy, inducing cellular proliferation, migration, and angiogenesis (63). *MiR-124* overexpression resulted in *UHRF1* suppression through the competitive binding of its 3'-UTR region. In addition, *miR-124* overexpression attenuated tumor growth and cell proliferation *in vivo* and invasion, migration, and vasculogenic mimicry *in vitro*. Further, it reduced VEGF protein levels and levels of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. A matrigel assay in a three-dimensional culture revealed reductions in tubular channel formation when *miR-124* was over-expressed in bladder cancer cell lines compared to the control group, suggesting that *miR-124* indirectly regulates vasculogenic mimicry in bladder cancer (44).

MiR-214

Originating from intron 14 of the *Dynamina-3* gene (*DNM3*), the primary transcript of *miR-214* produces four different miRNAs (*miR-199-3p*, *miR-199-5p*, *miR214-3p*, and *miR-214-5p*) (64). During the endothelial differentiation of embryonic stem cells, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) promotes angiogenesis, *in vitro* and *in vivo*, by increasing levels of *miR-214*. The *miR-214* inhibits *EZH2* at the post-transcriptional level, leading to reductions in *EZH2* occupancy at the *NOS3* promoter (50). Also, *miR-214* controls the BDNF-mediated upregulation of neuropilin 1, VEGF-R, and Crk-associated substrate kinase (50, 65). Thus, *miR-214* is a downstream player within the BDNF signaling pathway that regulates important angiogenic targets.

MiR-200b

miR-200b is part of the miR-200 family, which is organized into two main groups according to seed sequence. The miRNAs of group A are *miR-141* and *miR-200a*, while the miRNAs in group B are *miR-200b*, *miR-200c*, and *miR-429* (66). Particularly, *miR-200b* has been indicated to have a role in the process of angiogenesis. Studies of malignant neoplasms demonstrated that

TABLE 1 | Summary of MicroRNAs and their epigenetic targets in angiogenesis and vascular disease.

Common name	Function	Mechanism	Model or disease	References
MiR-30a-3p	Required for endothelial cell migration during sprouting angiogenesis	Base-pairing with matching sequences within <i>MeCP2</i> mRNA	Human umbilical vein endothelial cells	(45)
MiR-101	Inhibits cellular proliferation, migration, invasion and attenuates formation of capillary-like structures	Base-pairing with matching sequences within <i>EZH2</i> mRNA	Human brain microvascular endothelial cells and glioblastoma	(46, 47)
MiR20-a	Inhibits angiogenic and hypertrophic programs	Base-pairing with matching sequences within <i>p300</i> mRNA	Mouse myocardium	(48)
MiR-137	Inhibits cellular proliferation and angiogenesis	Base-pairing with matching sequences within <i>EZH2</i> mRNA	Glioblastoma and xenografts of severe combined immunodeficiency mice	(49)
MiR-124	Inhibits cellular proliferation, migration, invasion and formation of capillary-like structures	Base-pairing with matching sequences within <i>UHRF1</i> mRNA	Bladder cancer	(44)
MiR-214	Promote angiogenesis and endothelial differentiation	Base-pairing with matching sequences within <i>EZH2</i> mRNA	Embryonic stem cells	(50)
MiR-200b	Inhibits the formation of capillary-like structures	Posibly base-pairing with matching sequences within <i>p300</i> mRNA	Diabetic retinopathy	(51)

miR-200b controls the epithelial to mesenchymal transition by downregulating *p300* (67–70). In addition, *p300* activates *HIF1*, which is a transcriptional regulator of *VEGF-A*, and triggers the development of abundant blood vessels (71–73). Since *miR-200b* negatively regulates *p300*, this miRNA has antiangiogenic properties (51).

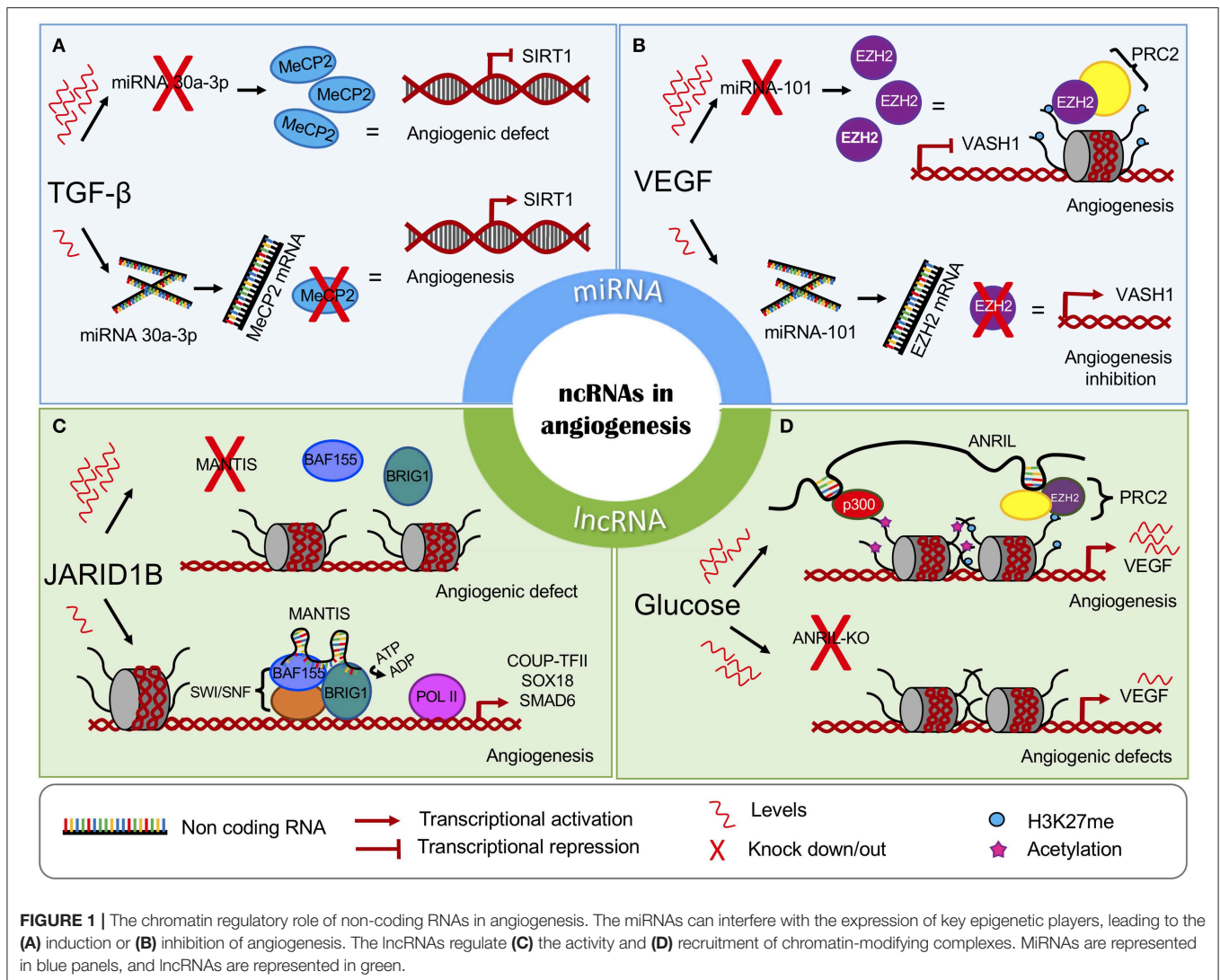
In sum, these studies suggest that miRNAs have the capacity to indirectly affect epigenetic pathways in endothelial cells and influence the angiogenic response. This opens up the possibility of considering miRNAs as therapeutic targets or biomarkers, an exciting prospect since therapies for both vascular diseases and cancer are needed. In several diseases, miRNAs have proven to be excellent biomarkers as a result of their high circulating levels. Indeed, analysis of oncogenic and suppressor miRNAs that are found in primary tumors against non-neoplastic cells revealed exosome-mediated sorting mechanisms related to cancer progression (74, 75). It is unknown whether similar mechanisms could be utilized by Epi-miRNAs during the evolution of vascular diseases. Recently, the attention of the scientific community has been focused on other, widely-studied ncRNAs known as long non-coding RNAs (lncRNAs), which have master regulatory functions in angiogenesis.

LONG NON-CODING RNAs AS SCAFFOLDS FOR EPIGENETIC PARTNERS IN NEOVASCULARIZATION

lncRNAs are all ncRNAs larger than 200 nucleotides and are classified according to their proximity to protein-coding genes as intergenic, intronic, bidirectional, sense, and antisense lncRNAs. Massive analyses have revealed that lncRNAs are originated using the same mechanisms as protein-coding genes; however, contrary to protein-coding genes, lncRNAs show a preference for having

two-exon transcripts, and most of them lack any protein coding-potential. Also, lncRNAs show tissue-specific expression patterns and are predominantly located in the nucleus rather than the cytoplasm. In fact, there are several lines of evidence that suggest that lncRNAs are significantly more enriched in chromatin than miRNAs (76).

lncRNAs can indirectly modulate DNA methylation at CpG sites, which in turn regulates gene transcription. For example, *Tsix* recruits DNMT3a to methylate and silence the *XIST* promoter. *XIST* is an important effector involved in the inactivation of the X chromosome (77). Likewise, the lncRNA *Kcnq1ot1* recruits the *de novo* DNA demethylase DNMT1 to control the methylation status of ubiquitously imprinted genes during mouse development (78). lncRNAs can act as guides or scaffolds, facilitating interaction between several proteins, such as those that are part of chromatin-modifying complexes, causing gene activation or repression, depending on the interaction partners involved (79, 80). The polycomb repressive complexes PRC1 and PRC2, the transcriptional repressor element-1 silencing transcription factor REST, its cofactor (REST/CoREST), other epigenetic components like the mixed lineage leukemia protein and the H3K9 methyltransferase G9a, physically interact with lncRNAs (78, 80, 81). In addition, many lncRNAs such as *HOTAIR*, *Xist*, *Kcnq1ot1*, and *Breaveheart* interact with PRC2, implying that these ncRNAs play a role in recruiting this complex through its subunits (*EZH2*, *SUZ12*, *EED*, *RBBP4*, and *AEBP2*) or through a bridging protein (such as *JARID2*) to their target genes (82, 83). Likewise, the expression of many angiogenesis-related genes involved in the VEGF signaling pathway is regulated through lncRNAs (such as *H19*, *MEG3*, and *HOTAIR*), and recently, researchers discovered that some of them perform their regulatory function by influencing the expression and activity of several epigenetic modulators (20, 22). lncRNAs and their identified epigenetic targets in angiogenesis are listed in **Table 2**.



MANTIS

MANTIS is a recently discovered lncRNA required for endothelial cell function and proper angiogenesis. MANTIS is induced in the endothelium of glioblastoma tumors and is overexpressed during vascular regeneration in atherosclerosis regression. It alters angiogenic sprouting, tube formation, and epithelial cell migration. Loss of *MANTIS* expression is reported during pulmonary arterial hypertension, and its downregulation also led to the reduced expression of many angiogenesis-related mRNAs (80).

In endothelial cells, *MANTIS* is upregulated following the knockdown of the histone demethylase JARID1B. JARID1B loss triggers increased H3K4me3 levels at transcription start sites (TSS) of the *MANTIS* gene, facilitating gene expression. Interestingly, in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension, a disease characterized by endothelial dysfunction, *MANTIS* expression is downregulated, while JARID1B is upregulated (80).

Novel studies have revealed that MANTIS functions as a scaffold and regulates the activity of Brahma related gene-1 (BRG1), the catalytic subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. The MANTIS-BRG1 interaction allows for increased binding of BAF155, which is a core component of the SWI/SNF complex, enhancing BRG1 ATPase activity and chromatin relaxation at the TSS of the transcription factor *COUP-TFII*, which, in turn, recruits RNA Pol II binding and transcription of the pro-angiogenic genes *SOX18* and *SMAD6*. The knockdown of MANTIS reduces BRG1 ATPase activity (80) (Figure 1C).

ANRIL

ANRIL is an antisense lncRNA from the *INK4* locus. It encodes two cyclin-dependent kinase inhibitors, p15 (INK4b) and p16 (INK4a), and a protein known as ARF. All of the genes cooperate in tumor suppressor networks. When these genes are silenced, proatherosclerotic cellular mechanisms are enhanced,

TABLE 2 | Summary of lncRNAs and their epigenetic targets in angiogenesis and vascular disease.

Common name	Function	Mechanism	Model or disease	References
MANTIS	Promotes angiogenic sprouting and proper endothelial function	Interplay with BRG1 and favors ATPase activity in chromatin remodeling	Human umbilical vein endothelial cells, glioblastoma, atherosclerosis, and idiopathic pulmonary, arterial hypertension	(80)
ANRIL	Induces the formation of capillary-like structures	Recruitment of EZH2 and p300 to the VEGF promoter	Diabetic retinopathy	(84)
GATA6-AS	Promotes angiogenic sprouting	Binds to LOXL2 and regulates H3K4 trimethylation of angiogenesis- and hypoxia-related genes	Human endothelial cell-based xenograft model	(85)

such as increased adhesion and diminished apoptosis (86). In fact, ANRIL expression is correlated with the risk of some vascular diseases such as coronary atherosclerosis and carotid arteriosclerosis (87).

It has been shown that ANRIL recruits PRC2 or PRC1 to different target genes by directly interacting with their subunits EZH2, SUZ12, and CBX7 (86, 88, 89). In a diabetic retinopathy cellular model, high glucose levels upregulated ANRIL and VEGF expression. In turn, ANRIL positively regulated EZH2, EED, and p300 levels. Furthermore, ANRIL recruits EZH2 and histone acetyl-transferase p300 to the *VEGF* promoter, enhancing its expression and angiogenic effects. It was shown that ANRIL silencing prevented the formation of capillary-like structures in spite of the angiogenic influence of high glucose levels (84) (**Figure 1D**). Moreover, ANRIL silencing also promoted *miR-200b* expression, a previously described miRNA that has been shown to be involved in regulating VEGF (90).

GATA6-AS

GATA6-AS is the hypoxia-regulated long non-coding antisense transcript of *GATA6* and promotes angiogenesis by negatively regulating lysyl oxidase-like 2 (*LOXL2*). *LOXL2* catalyzes the oxidative deamination of lysines and hydroxylysines, which results in the generation of non-methylated H3K4 and gene silencing. Thus, GATA6-AS silencing leads to increased *LOXL2* activity and transcriptional repression. In the nucleus, the physical interaction between GATA6-AS and *LOXL2* positively regulates the expression of several angiogenesis- and hypoxia-related genes, such as periostin and cyclooxygenase-2. It has been shown that GATA6-AS silencing in epithelial cells significantly prevented TGF- β 2-induced endothelial to mesenchymal transition and augmented angiogenic sprouting in xenograft models *in vivo* (85).

Like epi-miRNAs, the epi-lncRNAs are excellent candidates biomarkers due to their easy collection and tissue specificity. Although there are few examples of epi-lncRNAs in angiogenesis, the implications behind these interactions provide an interesting view of the mechanisms in which lncRNAs regulate not only the recruitment but also the activity of chromatin modifiers. Another layer of complexity is added if we consider that lncRNAs have many alternative splice forms, including the non-linear, circular RNAs (circRNAs).

CIRCULAR RNAs IN NEOVASCULARIZATION

Circular RNAs (circRNA) are single-stranded RNAs that are widely conserved in all life domains and form a covalent closed loop (91). The discovery of this type of RNA has occurred fairly recently, and before their discovery, the RNAs were considered the result of errors within the process of gene transcription. These circRNAs are produced by a back-splicing process of pre-mRNA, in which a downstream splice donor is linked to an upstream acceptor (92, 93). The splice forms can circularize from exonic, intronic, or a combination of both regions (EiCiRNAs) (94).

In cancer-derived cell lines, it has been reported that changes in DNMTs and the hypermethylation of the CpG islands of some genes that host circRNA can induce gene silencing of both linear RNA and circRNA, suggesting an epigenetic mechanism that produces two molecular “hits” (95). Because circRNA lack 5' and 3' ends, these cannot be degraded by exoribonucleases. Instead, circRNA levels may be regulated by endonucleases and exosomal deportation (96). These molecules are stable, abundant and specific to certain cell types, having distinct transcriptional patterns for specific tissues and multiple isoforms in eukaryotic cells (97). CircRNAs have been linked to different biological processes, including cell proliferation, senescence, and apoptosis, among others. The study of circRNA has increased in recent years, since they have been shown to be related to both physiological and pathological processes (98). In fact, circRNAs have been proposed as potential biomarkers for neurological disorders, infectious diseases, cancer, and preeclampsia as a result of their availability in circulating body fluids (99–102).

The circRNAs have transcriptional and post-transcriptional regulatory functions. EiCiRNAs such as EIF3J associate with ribonucleoproteins like U1 and the Pol II at the promoters of their parental genes to enhance their own expression (94). Similar to EiCiRNAs, some circRNAs (such as ciANKRD52) can positively regulate their own expression through interaction with the Pol II complex (103). Other circRNAs regulate alternative splicing or serve as sponges to bind, store, or sequester miRNAs and other protein complexes containing transcription factors and RNA binding proteins (94, 104, 105). Due to the ability of circRNA to bind to miRNAs, they have been referred to as miRNA sponges (106). Despite their recent discovery, some evidence suggests that circRNAs are implicated in angiogenesis (e.g., circRNA-MYLK)

and many cardiovascular diseases, such as atherosclerosis (e.g., circR-284), myocardial infarction (e.g., ciRS-7), and coronary artery disease (CAD) (e.g., circ_0124644), among others (107, 108). However, to our knowledge, no study has shown that circRNAs have an epigenetic regulatory role in angiogenesis. Similar to the lncRNA ANRIL, a circularized and anti-sense splice variant of the INK4/ARF locus (cANRIL) has been associated with atherosclerotic vascular disease (109). Moreover, in the cytoplasm, the binding of circANRIL to the rRNA-processing machinery impairs its function and causes nucleolar fragmentation and stress signaling (110). These findings suggest that, just like their longer-sized isoform, the variant cANRIL may have a role in the epigenetic regulation of vascular disease.

The study of ncRNA has opened up a new research field, and this has been extended to the genome scale. This type of experimental approach has become common practice in both the research laboratory and at the clinical level. Therefore, along with a growing array of genomic analysis machinery, bioinformatics platforms have also been developed, thus generating a new set of tools for the study and analysis of ncRNA.

CONTRIBUTION OF NGS TECHNOLOGIES TO THE DISCOVERY OF NEW ncRNAs

In recent years, increasing quantities of data have been obtained from NGS technologies such as mass RNA sequencing (RNA-seq), small RNA-seq (smRNA-seq), and single-cell RNA-seq, among others. These technologies have revealed that the human genome encodes for more than 90,000 non-coding RNAs and that these play an important role in several diseases (111). Using publicly available genomic information, it is now possible to discover and characterize novel disease-associated ncRNAs. In the next section, we will describe some of the key discoveries that have been made thanks to NGS data, in which ncRNAs are shown to have roles in angiogenesis and neovascularization processes.

The study of the ncRNAs involved in molecular processes associated with neovascularization and angiogenesis in several diseases can be carried out by using RNA-seq approaches, especially where angiogenesis or neovascularization is one of the causes, risk factors, or consequences of the disorders. Some of the diseases studied in this manner have been ischemia stroke, CAD, hemangioma, and heart failure (HF). Furthermore, angiogenesis and neovascularization are strongly related to endothelial functioning and the transcriptional programming of endothelial progenitor cells (EPCs). Thus, the study of the molecular mechanisms involved in the regulation of EPCs is of great interest. Nevertheless, only a few studies have been conducted on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) or other endothelial models to understand the role of ncRNAs using NGS technologies. In this section, we will provide a compilation of some studies aiming to identify or characterize ncRNAs involved in vascular processes.

First, in 2012 Cheng et al. performed smRNA-seq on umbilical cord blood EPCs (UC-EPCs), which was known for its enrichment in EPCs, and compared the expression profiles

against EPCs derived from peripheral blood in adults (PB-EPCs) to understand the underlying mechanisms involved the functional differences between these two models. They identified specific patterns of miRNAs (miRNome) in UC-EPCs and PB-EPCs in which 54 miRNAs were overexpressed in UC-EPC and 50 miRNAs were overexpressed in PB-EPCs. For instance, UC-EPCs expressed miRNAs involved in angiogenesis such as *miR-31* and *mir-18a*, while PB-EPCs are enriched in tumor-suppressive miRNA expression such as that of *miR-10a* and *mir-26a* (112).

A study performed by Wang and colleagues in 2014 revealed that there was cooperation between VEGF and miRNAs in CAD progression. They performed smRNA-seq and identified EPC-specific miRNome that was related to angiogenic processes, which suggests that miRNAs in EPCs with a poor capacity to enhance angiogenesis might have higher levels of miRNAs targeting VEGF. Indeed, they identified anti-VEGF miRNAs such as *miR-361-5p* that were enriched in EPCs and in the plasma of patients with CAD (113).

Also, atherosclerosis appears to be one of the factors leading to CAD. In 2018, Mao and colleagues conducted a study to identify miRNAs linked with carotid atherosclerosis. They performed a differential expression analysis to identify genes that were specifically associated with either primary or advanced atherosclerotic plaque tissues. Using public databases, they predicted 23 miRNAs that targeted the differentially expressed genes, such as *miR-126*, *miR-155*, *miR-19A*, and *miR-19B*, which can play a regulating role in neovascularization and angiogenesis (114).

Furthermore, a study from Liu et al. (115) identified differentially expressed ncRNAs that were predicted to be involved in the regulation of high-density lipoprotein (HDL) metabolism, the deregulation of which is believed to be one of the main causes of CAD. To this end, they treated HUVEC cells with HDL from healthy subjects and patients with CAD and hypercholesterolemia. After RNA-seq analysis, 41 ncRNAs were identified, and researchers were able to show that the ncRNAs, along with protein-coding genes such as *DGKA* and *UBE2V1*, have critical functions in vascular cells (115).

Additionally, it is well-known that endothelial cell metabolism is sensitive to hypoxia, which is an adverse effect of atherosclerotic lesions in humans. In 2018, Moreau et al. investigated the lncRNA profiles of HUVEC cells using global run-on sequencing (GRO-Seq). GRO-seq is a sequencing method that measures active transcription, identifying newly synthesized RNA, and providing sufficient resolution to map the position and orientation of transcripts detected. This group aimed to discover changes in the expression patterns of lncRNAs in HUVEC cells exposed to hypoxia and demonstrated that hypoxia affects the transcription of ~1,800 lncRNAs. Among the most relevant lncRNAs identified were *MALAT1*, *HYMAI*, *LOC730101*, *KIAA1656*, and *LOC339803*, which were differentially expressed in human atherosclerotic lesions compared to normal vascular tissue (116).

In contrast, heart and circulatory system diseases often involve changes in vascular smooth muscle or cardiac cells. In 2018, Cheng et al. used RNA-seq to identify circRNAs in human aortic valves. They recognized 1,412 specific circRNAs, most of which

originated from exons of their host genes. Furthermore, after performing a gene ontology enrichment analysis, they found that the host genes were associated with pathways regulating aortic valve function (ECM-receptor interaction pathway, ErbB signaling pathway, and vascular smooth muscle contraction pathway) (117). In addition, Bell et al. identified novel lncRNAs in human vascular smooth muscle cells in 2014. This work expanded our knowledge of the relevance of lncRNAs in the control of smooth muscle cells. The researchers performed an RNA-seq experiment examining expression patterns in human coronary artery smooth muscle cells. Their analysis revealed 31 novel lncRNAs. They discovered and characterized a novel vascular cell-enriched lncRNA that they named *SENCR*. They performed RNA-seq after knockdown of *SENCR* and observed that expression of Myocardin and genes involved in the contraction of smooth muscle were reduced, while expression of other promigratory genes was enhanced (118). These results have enhanced our understanding of vascular cells and should be further studied in order to discern lncRNAs in vascular diseases. Finally, in 2015, Di Salvo et al. analyzed the expression profiles of cells derived from 22 human hearts from patients with Heart Failure (HF) vs. non-HF donor hearts. Initially, they discovered 2,085 lncRNAs, and subsequent analyses revealed 48 differentially expressed lncRNAs in HF patients. Among these, AP000783.2, RP11-403B2.6, and RP11-60A24.3 were identified (119).

Angiogenesis and neovascularization processes affect the prognosis of patients who have suffered from brain stroke ischemia. Thus, the identification of ncRNAs involved in these processes might be useful for their further use as drug targets or biomarkers for the disease. Therefore, Zhang et al. (120) aimed to uncover which ncRNAs have altered expression profiles after cerebrovascular dysfunction in ischemic stroke. Using bulk RNA-seq, they profiled lncRNA signatures in primary brain microvascular endothelial cells after oxygen-glucose deficiency. This approach allowed for the identification of 362 differentially expressed lncRNAs. The top three lncRNAs that were upregulated were *Snhg12*, *Malat1*, and *lnc-OGD 1006*, while the top three down-regulated lncRNAs were *281008D09Rik*, *Peg13*, and *lnc-OGD 3916* (120).

Another disease model that has been studied in order to identify ncRNAs involved in angiogenesis and neovascularization is infantile hemangioma (IH), which is a type of vascular tumor in infants. Li et al. investigated whether ncRNAs have a role in IH pathogenesis in 2018. The researchers used a bulk RNA-seq approach to examine global ncRNAs expression profiles in IH patients compared to their matched, normal-skin controls. In this study, researchers identified 256 lncRNAs and 142 miRNAs that were differentially expressed. They also found more than a thousand sponge modulators involved in miRNA-, lncRNA-, and mRNA-mediated interactions. These findings suggest the presence of an endogenous ncRNA regulatory network associated with the development of IH and other vascular diseases (121).

Overall, the studies described above have shown that NGS technologies can be very effective in identifying and

characterizing ncRNAs. This type of technology has helped researchers to understand the regulatory role of ncRNAs in angiogenic and neovascularization processes. However, studies in this field are just emerging, and additional research will be required to expand our knowledge and translated into clinical use.

CURRENT APPROACHES USED TO DISCOVER NEW ncRNAs

After the development of NGS technologies, ncRNAs have been discovered, and multiple efforts have been made to organize, collect, provide, and unify all available information regarding ncRNAs so that it can be accessed by the research community. Furthermore, new methods have developed to predict and identify novel ncRNAs. Here we present some of the cutting-edge bioinformatics approaches currently being used to study ncRNAs and give some examples of how they are used in the study of neovascularization processes (Figure 2). For a detailed explanation, see the following reference (122).

Transcriptome-wide association studies can be performed to identify expression-trait associations where ncRNAs might be involved. This method can identify single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in transcribed regions of ncRNA genes that can be related to a specific phenotype. A second bioinformatic approach is the use of tools for the prediction of primary, secondary, and tertiary ncRNA structures to obtain information about their potential function. This method has been used for circRNAs, smRNAs, and lncRNAs. The third approach to studying ncRNAs is the use of biological networks. These types of analyses enhance our understanding of the function of ncRNAs by integrating expression, regulatory, and protein-protein interaction networks. ncRNAs are highly connected in these networks and can influence more than one target gene in order to produce a specific phenotype. These approaches can identify disease-specific regulatory modules where ncRNAs play an important role (122).

Though the effective methods described above can be used to discover and understand the biological functions of ncRNAs, they have not been adequately exploited to reveal the roles of ncRNAs in angiogenesis or neovascularization. So far, only a few studies have used advanced bioinformatics tools for this purpose. For example, in 2018, Li et al. detected novel circRNAs related with IH using RNA-seq data. The best experimental approach for the detection of circRNAs is the use of deep sequencing of RNA treated with RNase R (which leaves a circRNA-enriched sample). The availability of tools to predict novel circRNAs from RNA-seq data is of great value, given that RNA-seq data are much more highly available (122). Thus, Li et al. used circRNAfinder, a tool able to predict circRNAs from bulk RNA-seq experiments, and identified 249 circRNA candidates differentially expressed between IH and matched normal skin samples. The circRNAs *hsa_circRNA001885* and *hsa_circRNA006612* were further investigated by this group, providing novel insights about the disease (123).

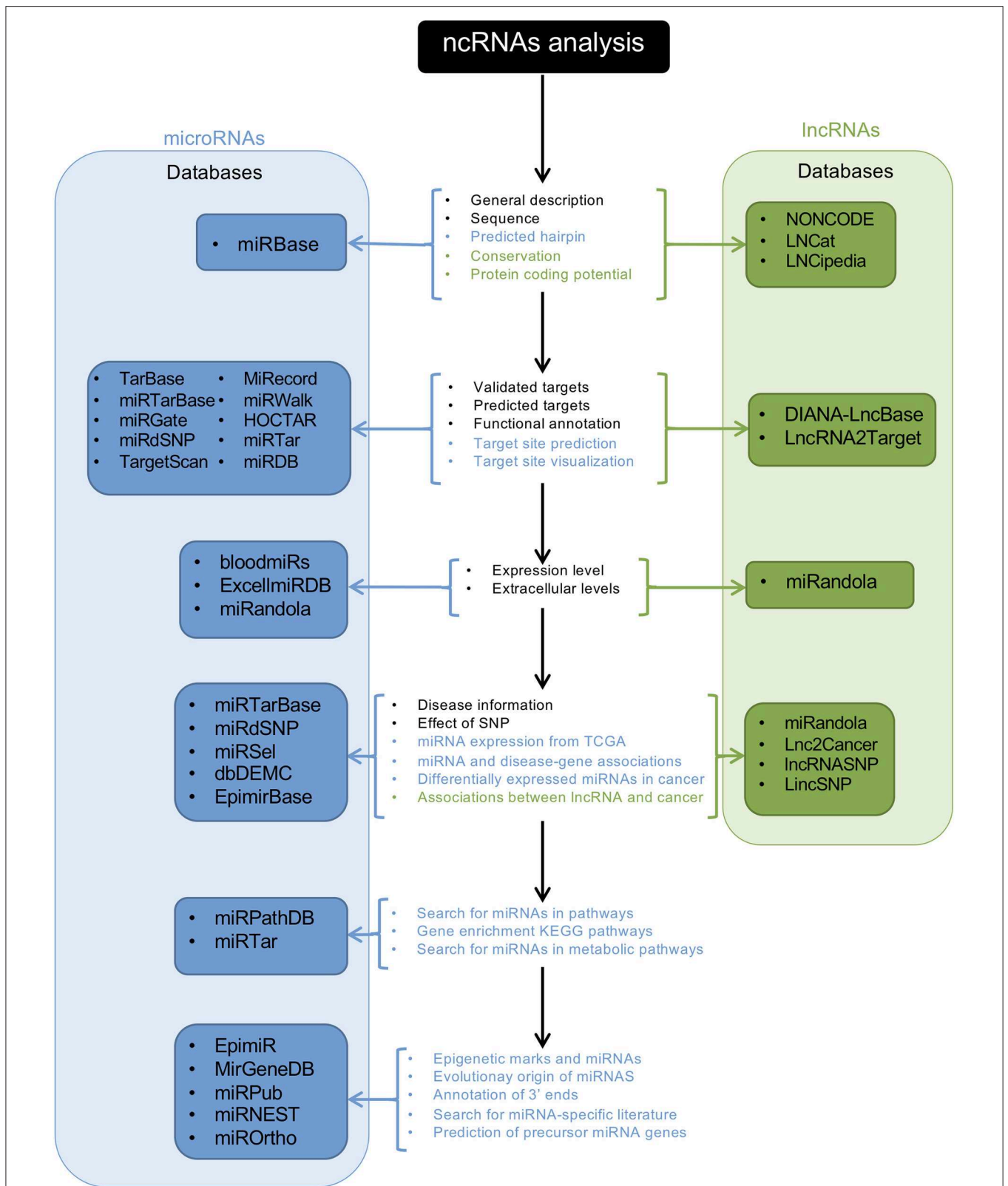


FIGURE 2 | Schematic representation of an ncRNA analysis workflow using databases. The central panel shows the available analyses provided by the databases; letters in black indicate the available analyses for miRNAs and lncRNAs; blue letters indicate analysis for miRNAs, and green letters the analyses for lncRNAs. Blue and green panels show the names of the available databases for miRNAs and lncRNAs, respectively.

As shown previously, the development of tools used to predict and identify novel ncRNAs is invaluable. The increasing number of RNA-seq experiments and access to databases will increasingly facilitate the discovery of novel ncRNAs, and the characterization of ncRNAs will become increasingly straightforward. For instance, ANGIOGENES is a database that has been created to store information related to angiogenic processes. It depicts experimental data obtained from RNA-seq

experiments in endothelial cells. This allows for the *in-silico* detection of genes expressed in several endothelial cell types from different tissues. ANGIOGENES uses publicly-available RNA-seq experiments and identifies endothelial cell-specific ncRNAs in human, mouse, and zebrafish. The database facilitates further analyses using GO enrichment terms and is available online (124). In addition to ANGIOGENES, EndoDB is another database that retrieves information about endothelial cells from

TABLE 3 | Databases and tools for the ncRNAs study.

Database	ncRNAs	Website	Species	References
ANNOTATION RESOURCES				
miRbase	microRNAs	http://www.mirbase.org/	All	(126, 127)
NONCODE	lncRNAs	http://www.noncode.org/	All	(111)
LNCipedia	lncRNAs	https://lncipedia.org/	Human	(128)
LNCact	lncRNAs	http://biocc.hrbmu.edu.cn/LNCat/	Human	(129)
TARGET RESOURCES				
TarBase	microRNAs	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/	Human/mouse, fruit fly, worm, and zebrafish	(130)
miRTarBase	microRNAs	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw	Human, mouse, virus	(131)
miRGate	microRNAs	http://mirgate.bioinfo.cnio.es	Human, rat, mouse	(132)
miRdSNP	microRNAs	http://mirdsnp.ccr.buffalo.edu	Human	(133)
TargetScan	microRNAs	http://www.targetscan.org/vert_72/	Human	(134)
CSmiRTar	microRNAs	http://cosbi.ee.ncku.edu.tw/CSmiRTar/	Human, mouse	(135)
MiRecords	microRNAs	http://c1.accurascience.com/miRecords/	Human, rat, mouse, fly, worm, chicken	(136)
miRSel	microRNAs	https://services.bio.ifi.lmu.de/mirsel/	Human, mouse	(137)
miRWalk	microRNAs	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/	Human, mouse	(138)
miRPathDB	microRNAs	https://mpd.bioinf.uni-sb.de/	Human, mouse	(139)
HOCTARdb	microRNAs	http://hoctar.tigem.it/	Human	(140)
miRTar	microRNAs	http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/	Human	(141)
miRDB	microRNAs	http://www.mirdb.org/	Human, rat, mouse, dog, chicken	(142)
DIANA-LncBase	microRNAs lncRNAs	www.microrna.gr/LncBase	Human, mouse	(143)
LncRNA2Target	lncRNAs	http://123.59.132.21/lncrna2target	Human, mouse	(144)
CELL TYPE SPECIFIC RESOURCES				
bloodmiRs	microRNAs	http://134.245.63.235/ikmb-tools/bloodmiRs/	Human	(145)
ExcellmiRDB	microRNAs	http://www.excellmirdb.brfjaisalmer.com/%27%	Human	(146)
miRandola	microRNAs	http://mirandola.iit.cnr.it/	Human	(147)
miREnvironment	microRNAs	http://www.cuilab.cn/miren	Human	(148)
HMED	microRNAs	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/smallRNA/	Human	(149)
DISEASE-RELATED RESOURCES				
dbDEMC	microRNAs	http://www.picb.ac.cn/dbDEMC/	Human	(150)
EpimiRBase	microRNAs	https://www.epimibase.eu/	Human	(151)
HMDD	microRNAs	http://www.cuilab.cn/hmdd	Human	(152)
OncomiRDB	microRNAs	http://lifeome.net/database/oncomirdb/	Human	(153)
LncRNADisease	lncRNAs	http://www.cuilab.cn/lncrnadisease	Human	(154)
Lnc2Cancer	lncRNAs	http://www.bio-bigdata.com/lnc2cancer/	Human	(155)
lncRNASNP	lncRNAs	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP/	Human	(156)
LincSNP	lncRNAs	http://bioinfo.hrbmu.edu.cn/LincSNP/	Human	(157)
OTHER RESOURCES				
EpimiR	microRNAs	http://210.46.85.180:8080/EpimiR/	Human	(158)
MirGeneDB	microRNAs	http://mirgenedb.org/	All	(25)
miRBaseTracker	microRNAs	http://mirbasetracker.org/	All	(127)
mirPub	microRNAs	http://www.microrna.gr/mirpub/	All	(159)
miRNEST	microRNAs	http://rhesus.amu.edu.pl/mirnest/copy/	All	(160)
miROrtho	microRNAs	http://cegg.unige.ch/mirortho	All	(161)

different platforms for several species (125). Other databases are available for the study of ncRNAs; nevertheless, these are not specialized in angiogenesis or neovascular processes. Databases and tools used for the study of ncRNAs are listed in **Table 3**.

We know that endothelial cells are heterogeneous; for instance, they function differently depending on vessel type (162). To uncover the molecular mechanisms controlling this heterogeneity, single-cell RNA sequencing analyses (scRNA-seq) have the potential to enhance our understanding of vascular biology. ScRNA-seq is currently being used to study and assess cellular heterogeneity. Particularly with respect to cancer research, this approach has proved to be valuable (163–165); nevertheless, its use in vascular research is just beginning. Recently published studies have mostly focused on protein-coding genes (166, 167). The participation of ncRNAs, along with epigenetic factors, in regulating the metabolic activities of endothelial cells from a single-cell perspective in vascular development and diseases is not yet clear.

CONCLUDING REMARKS

ncRNAs comprise a new frontier in genetic regulation that has impacts on several research areas. Undoubtedly, the study of angiogenesis and neovascularization has been enhanced through the integration of the study of ncRNAs and epigenetics. Further, ncRNAs are involved in the regulation of several angiogenic targets through epigenetic mechanisms. On the basis of this relationship, a new field of opportunity has emerged in which biomarkers and specific therapies may be identified that can improve the treatment of different vascular diseases and cancers. NGS platforms allow for the global analysis of ncRNA expression and can be used to compare different

physiological and pathological processes. Most of the pathways and mechanisms controlling the ncRNA-mediated regulation of angiogenesis remain unexplored. It is likely that new research strategies implementing an epigenetic perspective will facilitate future discoveries.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IH-R, LG-C, MS-A, TM-H, and ES-R wrote the manuscript. MS-A and IH-R did the artwork. TM-H and LG-C combined their information to make the tables. All authors contributed to manuscript revision and read and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through the Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS, Grant No. 0261181), Fondo CB-SEP-CONACyT (284748), and UAM-PTC-704. ES-R was supported by the Natural Science Department at UAM Cuajimalpa Unit.

ACKNOWLEDGMENTS

IH-R and TM-H are masters students and LG-C and MS-A are doctoral students from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM and received a fellowship from CONACyT (IH-R: CVU 886138, TM-H: CVU 924685, LG-C: CVU 588391, and MS-A: CVU 659273). MS-A was also a beneficiary of the German Academic Exchange Service (DAAD Grant No. 91693321).

REFERENCES

- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. (2011) 473:298–307. doi: 10.1038/nature10144
- Song X, Shan D, Chen J, Jing Q. miRNAs and lncRNAs in vascular injury and remodeling. *Sci China Life Sci*. (2014) 57:826–35. doi: 10.1007/s11427-014-4698-y
- Helkin A, Maier KG, Gahtan V. Thrombospondin-1,–2 and–5 have differential effects on vascular smooth muscle cell physiology. *Biochem Biophys Res Commun*. (2015) 464:1022–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.044
- Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nat Med*. (2014) 20:1270–8. doi: 10.1038/nm.3668
- Xu X, Zong Y, Gao Y, Sun X, Zhao H, Luo W, Jia S. VEGF induce vasculogenic mimicry of choroidal melanoma through the PI3k Signal Pathway. *Biomed Res Int*. (2019) 2019:3909102. doi: 10.1155/2019/3909102
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. (2000) 407:249–57. doi: 10.1038/35025220
- Tímár J, Döme B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res*. (2001) 7:85–94. doi: 10.1007/BF03032573
- Bieniasz-Krzywiec P, Martín-Pérez R, Ehling M, García-Caballero M, Pinioti S, Pretto S, et al. Podoplanin-expressing macrophages promote lymphangiogenesis and lymphoinvasion in breast cancer. *Cell Metab*. (2019) 30:1–20. doi: 10.1016/j.cmet.2019.07.015
- Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. (2018) 21:425–532. doi: 10.1007/s10456-018-9613-x
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. (2001) 7:425–9. doi: 10.1038/86490
- Li M, Liu C, Bin J, Wang Y, Chen J, Xiu J, et al. Mutant hypoxia inducible factor-1 α improves angiogenesis and tissue perfusion in ischemic rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res*. (2011) 81:26–33. doi: 10.1016/j.mvr.2010.09.008
- Xue K, Zhao X, Zhang Z, Qiu B, Tan QSW, Ong KH, et al. Sustained delivery of anti-VEGFs from thermogel depots inhibits angiogenesis without the need for multiple injections. *Biomater Sci*. (2019). doi: 10.1039/C9BM01049A. [Epub ahead of print].
- Nicoglou A. Waddington's epigenetics or the pictorial meetings of development and genetics. *Hist Philos Life Sci*. (2018) 40:61. doi: 10.1007/s40656-018-0228-8
- Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. (2014) 6:a018200. doi: 10.1101/cshperspect.a018200
- Richard JLC, Eichhorn PJA. Deciphering the roles of lncRNAs in breast development and disease. *Oncotarget*. (2018) 9:20179–212. doi: 10.18632/oncotarget.24591
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. (2003) 421:448–53. doi: 10.1038/nature01411
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. (2001) 293:1074–80. doi: 10.1126/science.1063127

18. Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools. (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* (2018) 837:8–24. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.021
19. Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytaichou C, Hirsch HA, Tschichl PN, Struhl K. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell.* (2010) 39:761–72. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.013
20. Song Y, Wang R, Li L-W, Liu X, Wang Y-F, Wang Q-X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR mediates the switching of histone H3 lysine 27 acetylation to methylation to promote epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int J Oncol.* (2019) 54:77–86. doi: 10.3892/ijo.2018.4625
21. Tang W, Zhou W, Xiang L, Wu X, Zhang P, Wang J, et al. The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer. *Nat Commun.* (2019) 10:663. doi: 10.1038/s41467-018-08225-3
22. Wang F, Tang Z, Shao H, Guo J, Tan T, Dong Y, et al. Long noncoding RNA HOTTIP cooperates with CCCTC-binding factor to coordinate HOXA gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) 500:852–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.173
23. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* (2004) 116:281–97. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
24. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* (2011) 12:861–74. doi: 10.1038/nrg3074
25. Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, et al. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annu Rev Genet.* (2015) 49:213–42. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092023
26. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* (2010) 11:597–610. doi: 10.1038/nrg2843
27. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* (2006) 71:59–66. doi: 10.1101/sqb.2006.71.050
28. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci.* (2016) 17:1712. doi: 10.3390/ijms17101712
29. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* (2009) 136:215–33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
30. Wang X-J, Reyes JL, Chua N-H, Gaasterland T. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* (2004) 5:R65. doi: 10.1186/gb-2004-5-9-r65
31. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* (2010) 79:351–79. doi: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103
32. Chen H-X, Xu X-X, Tan B-Z, Zhang Z, Zhou X-D. MicroRNA-29b inhibits angiogenesis by targeting VEGFA through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways in endometrial carcinoma. *Cell Physiol Biochem.* (2017) 41:933–46. doi: 10.1159/000460510
33. Tzeng H-E, Chang A-C, Tsai C-H, Wang S-W, Tang C-H. Basic fibroblast growth factor promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis via inhibition of miR-381 in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget.* (2016) 7:38566–78. doi: 10.18632/oncotarget.9570
34. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong C-KA, Cai G, Gu D, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS ONE.* (2006) 1:e116. doi: 10.1371/journal.pone.0000116
35. Soto-Reyes E, González-Barríos R, Cisneros-Soberanis F, Herrera-Goepfert R, Pérez V, Cantú D, et al. Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers. *BMC Cancer.* (2012) 12:40. doi: 10.1186/1471-2407-12-40
36. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* (2007) 67:1424–29. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4218
37. Amodio N, Rossi M, Raimondi L, Pitari MR, Botta C, Tagliaferri P, et al. miR-29s: a family of epi-miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies. *Oncotarget.* (2015) 6:12837–61. doi: 10.18632/oncotarget.3805
38. Chen Z, Wang X, Liu R, Chen L, Yi J, Qi B, et al. KDM4B-mediated epigenetic silencing of miRNA-615-5p augments RAB24 to facilitate malignancy of hepatoma cells. *Oncotarget.* (2016) 8:17712–25. doi: 10.18632/oncotarget.10832
39. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CEA, Callegari E, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood.* (2009) 113:6411–8. doi: 10.1182/blood-2008-07-170589
40. Malumbres M. miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med.* (2013) 34:863–74. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.005
41. Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett.* (2006) 580:4214–7. doi: 10.1016/j.febslet.2006.06.080
42. Varambally S, Cao Q, Mani R-S, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science.* (2008) 322:1695–9. doi: 10.1126/science.1165395
43. Verrando P, Capovilla M, Rahmani R. Trans-nonachlor decreases miR-141-3p levels in human melanocytes *in vitro* promoting melanoma cell characteristics and shows a multigenerational impact on miR-8 levels in *Drosophila*. *Toxicology.* (2016) 368–369:129–41. doi: 10.1016/j.tox.2016.09.003
44. Wang X, Wu Q, Xu B, Wang P, Fan W, Cai Y, et al. MiR-124 exerts tumor suppressive functions on the cell proliferation, motility and angiogenesis of bladder cancer by fine-tuning UHRF1. *FEBS J.* (2015) 282:4376–88. doi: 10.1111/febs.13502
45. Volkmann I, Regalla K, Nils P, Jan F, Seema D, Angelika H, et al. MicroRNA-mediated epigenetic silencing of sirtuin1 contributes to impaired angiogenic responses. *Circulation Res.* (2013) 113:997–1003. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301702
46. Smits M, Mir SE, Nilsson RJA, van der Stoop PM, Niers JM, Marquez VE, et al. Down-regulation of miR-101 in endothelial cells promotes blood vessel formation through reduced repression of EZH2. *PLoS ONE.* (2011) 6:e16282. doi: 10.1371/journal.pone.0016282
47. Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget.* (2010) 1:710–20. doi: 10.18632/oncotarget.205
48. Shehadeh LA, Sharma S, Pessanha M, Wei JQ, Liu J, Yuan H, et al. MicroRNA-20a constrains p300-driven myocardial angiogenic transcription by direct targeting of p300. *PLoS ONE.* (2013) 8:e79133. doi: 10.1371/journal.pone.0079133
49. Sun J, Zheng G, Gu Z, Guo Z. MiR-137 inhibits proliferation and angiogenesis of human glioblastoma cells by targeting EZH2. *J Neurooncol.* (2015) 122:481–9. doi: 10.1007/s11060-015-1753-x
50. Descamps B, Saif J, Benest AV, Biglino G, Bates DO, Chamorro-Jorganes A, et al. BDNF. (Brain-Derived Neurotrophic Factor) promotes embryonic stem cells differentiation to endothelial cells via a molecular pathway, including microRNA-214, EZH2. (Enhancer of Zeste Homolog 2), and eNOS. (Endothelial Nitric Oxide Synthase). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2018) 38:2117–25. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311400
51. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes.* (2011) 60:1314–23. doi: 10.2337/db10-1557
52. Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev.* (2007) 21:2644–58. doi: 10.1101/gad.435107
53. Wang C, Wang F, Li Z, Cao Q, Huang L, Chen S. MeCP2-mediated epigenetic regulation in senescent endothelial progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* (2018) 9:87. doi: 10.1186/s13287-018-0828-y
54. Jin Q, He W, Chen L, Yang Y, Shi K, You Z. MicroRNA-101-3p inhibits proliferation in retinoblastoma cells by targeting EZH2 and HDAC9. *Exp Ther Med.* (2018) 16:1663–70. doi: 10.3892/etm.2018.6405
55. Wei X, Xiang T, Ren G, Tan C, Liu R, Xu X, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal.* (2013) 25:439–46. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.10.013

56. Huang W, Ren Y, Liu H. Vasohibin 1 inhibits Adriamycin resistance in osteosarcoma cells via the protein kinase B signaling pathway. *Oncol Lett.* (2018) 15:5983–8. doi: 10.3892/ol.2018.8074
57. Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell.* (2010) 18:185–97. doi: 10.1016/j.ccr.2010.06.016
58. Luengo-Gil G, Gonzalez-Billalabeitia E, Perez-Henarejos SA, Navarro Manzano E, Chaves-Benito A, Garcia-Martinez E, et al. Angiogenic role of miR-20a in breast cancer. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0194638. doi: 10.1371/journal.pone.0194638
59. Zhang W, Chen J-H, Shan T, Aguilera-Barrantes I, Wang L-S, Huang TH-M, et al. miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation. *Lab Invest.* (2018) 98:1397–407. doi: 10.1038/s41374-018-0092-x
60. Ding F, Zhang S, Gao S, Shang J, Li Y, Cui N, et al. MiR-137 functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting MRGBP. *J Cell Biochem.* (2018) 119:4799–807. doi: 10.1002/jcb.26676
61. Ben Gacem R, Ben Abdelkrim O, Ziadi S, Ben Dhiab M, Trimeche M. Methylation of miR-124a-1, miR-124a-2, and miR-124a-3 genes correlates with aggressive and advanced breast cancer disease. *Tumour Biol.* (2014) 35:4047–56. doi: 10.1007/s13277-013-1530-4
62. Li X, Yang Z, Han Z, Wen Y, Ma Z, Wang Y. Niclosamide acts as a new inhibitor of vasculogenic mimicry in oral cancer through upregulation of miR-124 and downregulation of STAT3. *Oncol Rep.* (2018) 39:827–33. doi: 10.3892/or.2017.6146
63. Gao S-P, Sun H-F, Li L-D, Fu W-Y, Jin W. UHRF1 promotes breast cancer progression by suppressing KLF17 expression by hypermethylating its promoter. *Am J Cancer Res.* (2017) 7:1554–65. doi: 10.1158/1538-7445.SABCS16-PI-08-11
64. Stevens HC, Deng L, Grant JS, Pinel K, Thomas M, Morrell NW, et al. Regulation and function of miR-214 in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* (2016) 6:109–17. doi: 10.1086/685079
65. Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, et al. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation.* (2003) 108:2250–7. doi: 10.1161/01.CIR.0000093190.53478.78
66. Sinha M, Ghatak S, Roy S, Sen CK. microRNA–200b as a switch for inducible adult angiogenesis. *Antioxid Redox Signal.* (2015) 22:1257–72. doi: 10.1089/ars.2014.6065
67. Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:5060–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2245
68. Li Y, VandenBoom TG, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* (2009) 69:6704–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1298
69. Mees ST, Mardin WA, Wendel C, Baeumer N, Willscher E, Senninger N, et al. EP300—a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Cancer.* (2010) 126:114–24. doi: 10.1002/ijc.24695
70. Feng B, Cao Y, Chen S, Chu X, Chu Y, Chakrabarti S. miR-200b mediates epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* (2016) 65:768–79. doi: 10.2337/db15-1033
71. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) 93:12969–73. doi: 10.1073/pnas.93.23.12969
72. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol.* (1997) 108:263–8. doi: 10.1111/1523-1747.ep12286453
73. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* (1995) 77:638–43. doi: 10.1161/01.RES.77.3.638
74. Al-Mulla F. Vesicular control of metastasis: entrap the “virtuous” and free the “wicked” microRNA. *Transl Cancer Res.* (2017) 6:S999-S1002–S1002. doi: 10.21037/tcr.2017.06.49
75. Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun.* (2017) 8:14448. doi: 10.1038/ncomms14448
76. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* (2012) 22:1775–89. doi: 10.1101/gr.132159.111
77. Sun BK, Deaton AM, Lee JT. A Transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell.* (2006) 21:617–28. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.028
78. Mohammad F, Mondal T, Guseva N, Pandey GK, Kanduri C. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development.* (2010) 137:2493–9. doi: 10.1242/dev.048181
79. Ding X, Jia X, Wang C, Xu J, Gao S-J, Lu C. A DHX9-lncRNA-MDM2 interaction regulates cell invasion and angiogenesis of cervical cancer. *Cell Death Differ.* (2019) 26:1750–65. doi: 10.1038/s41418-018-0242-0
80. Leisegang MS, Fork C, Josipovic I, Richter FM, Preussner J, Hu J, et al. Long Noncoding RNA MANTIS facilitates endothelial angiogenic function. *Circulation.* (2017) 136:65–79. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026991
81. Miao H, Wang L, Zhan H, Dai J, Chang Y, Wu F, et al. A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation. *PLoS Genet.* (2019) 15:e1008144. doi: 10.1371/journal.pgen.1008144
82. Davidovich C, Cech TR. The recruitment of chromatin modifiers by long noncoding RNAs: lessons from PRC2. *RNA.* (2015) 21:2007–22. doi: 10.1261/rna.053918.115
83. Brockdorff N. Noncoding RNA and polycomb recruitment. *RNA.* (2013) 19:429–42. doi: 10.1261/rna.037598.112
84. Thomas AA, Feng B, Chakrabarti S. ANRIL: a regulator of VEGF in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2017) 58:470–80. doi: 10.1167/iovs.16-20569
85. Neumann P, Jaé N, Knau A, Glaser SF, Fouani Y, Rossbach O, et al. The lncRNA GATA6-AS epigenetically regulates endothelial gene expression via interaction with LOXL2. *Nat Commun.* (2018) 9:237. doi: 10.1038/s41467-017-02431-1
86. Nie F, Sun M, Yang J, Xie M, Xu T, Xia R, et al. Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Mol Cancer Ther.* (2015) 14:268–77. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0492
87. Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis.* (2012) 220:449–55. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.017
88. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene.* (2011) 30:1956–62. doi: 10.1038/onc.2010.568
89. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* (2010) 38:662–74. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.021
90. Ruiz MA, Feng B, Chakrabarti S. Polycomb repressive complex 2 regulates MiR-200b in retinal endothelial cells: potential relevance in diabetic retinopathy. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0123987. doi: 10.1371/journal.pone.0123987
91. Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res.* (2012) 40:3131–42. doi: 10.1093/nar/gkr1009
92. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development.* (2016) 143:1838–47. doi: 10.1242/dev.128074

93. Lei K, Bai H, Wei Z, Xie C, Wang J, Li J, Chen Q. The mechanism and function of circular RNAs in human diseases. *Exp Cell Res.* (2018) 368:147–58. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.002
94. Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol.* (2015) 22:256–64. doi: 10.1038/nsmb.2959
95. Ferreira HJ, Davalos V, de Moura MC, Soler M, Perez-Salvia M, Bueno-Costa A, et al. Circular RNA CpG island hypermethylation-associated silencing in human cancer. *Oncotarget.* (2018) 9:29208–19. doi: 10.18632/oncotarget.25673
96. Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, Higginbotham JN, Jeppesen DK, Weaver AM, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Sci Rep.* (2016) 6:37982. doi: 10.1038/srep37982
97. Li X, Yang L, Chen L-L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Mol Cell.* (2018) 71:428–42. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.034
98. Dang R-Y, Liu F-L, Li Y. Circular RNA hsa_circ_0010729 regulates vascular endothelial cell proliferation and apoptosis by targeting the miR-186/HIF-1 α axis. *Biochem Biophys Res Commun.* (2017) 490:104–110. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.164
99. Bai Y, Rao H, Chen W, Luo X, Tong C, Qi H. Profiles of circular RNAs in human placenta and their potential roles related to preeclampsia. *Biol Reprod.* (2018) 98:705–12. doi: 10.1093/biolre/iy034
100. Lü L, Sun J, Shi P, Kong W, Xu K, He B, et al. Identification of circular RNAs as a promising new class of diagnostic biomarkers for human breast cancer. *Oncotarget.* (2017) 8:44096–107. doi: 10.18632/oncotarget.17307
101. Qian Z, Liu H, Li M, Shi J, Li N, Zhang Y, et al. Potential diagnostic power of blood circular RNA expression in active pulmonary tuberculosis. *EBioMed.* (2018) 27:18–26. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.007
102. Yang P, Qiu Z, Jiang Y, Dong L, Yang W, Gu C, et al. Silencing of cZNF292 circular RNA suppresses human glioma tube formation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget.* (2016) 7:63449–55. doi: 10.18632/oncotarget.11523
103. Zhang Y, Zhang X-O, Chen T, Xiang J-F, Yin Q-F, Xing Y-H, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell.* (2013) 51:792–806. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.017
104. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell.* (2014) 56:55–66. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.019
105. Schneider T, Hung L-H, Schreiner S, Starke S, Eckhof H, Rossbach O, et al. CircRNA-protein complexes: IMP3 protein component defines subfamily of circRNPs. *Sci Rep.* (2016) 6:31313. doi: 10.1038/srep31313
106. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* (2013) 495:333–8. doi: 10.1038/nature11928
107. He R, Liu P, Xie X, Zhou Y, Liao Q, Xiong W, et al. circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a. *J Exp Clin Cancer Res.* (2017) 36:145. doi: 10.1186/s13046-017-0614-1
108. Zhong Z, Huang M, Lv M, He Y, Duan C, Zhang L, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway. *Cancer Lett.* (2017) 403:305–17. doi: 10.1016/j.canlet.2017.06.027
109. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet.* (2010) 6:e1001233. doi: 10.1371/journal.pgen.1001233
110. Holdt LM, Stahringer A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, Wilfert W, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun.* (2016) 7:12429. doi: 10.1038/ncomms12429
111. Fang S, Zhang L, Guo J, Niu Y, Wu Y, Li H, et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* (2018) 46:D308–14. doi: 10.1093/nar/gkx1107
112. Cheng C-C, Lo H-H, Huang T-S, Cheng Y-C, Chang S-T, Chang S-J, et al. Genetic module and miRNome trait analyses reflect the distinct biological features of endothelial progenitor cells from different anatomic locations. *BMC Genom.* (2012) 13:447. doi: 10.1186/1471-2164-13-447
113. Wang H-W, Lo H-H, Chiu Y-L, Chang S-J, Huang P-H, Liao K-H, et al. Dysregulated miR-361-5p/VEGF axis in the plasma and endothelial progenitor cells of patients with coronary artery disease. *PLOS ONE.* (2014) 9:e98070. doi: 10.1371/journal.pone.0098070
114. Mao Z, Wu F, Shan Y. Identification of key genes and miRNAs associated with carotid atherosclerosis based on mRNA-seq data. *Medicine.* (2018) 97:e9832. doi: 10.1097/MD.0000000000009832
115. Liu X, Wang TT, Li Y, Shi MM, Li HM, Yuan HX, et al. High density lipoprotein from coronary artery disease patients caused abnormal expression of long non-coding RNAs in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2017) 487:552–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.082
116. Moreau PR, Örd T, Downes NL, Niskanen H, Bouvy-Liivrand M, Aavik E, et al. Transcriptional profiling of hypoxia-regulated non-coding RNAs in human primary endothelial cells. *Front Cardiovasc Med.* (2018) 5:159. doi: 10.3389/fcvm.2018.00159
117. Chen J, Wang J, Jiang Y, Gu W, Ni B, Sun H, et al. Identification of circular RNAs in human aortic valves. *Gene.* (2018) 642:135–44. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.016
118. Bell RD, Long X, Lin M, Bergmann JH, Nanda V, Cowan SL, et al. Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2014) 34:1249–59. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303240
119. Di Salvo TG, Guo Y, Su YR, Clark T, Brittain E, Absi T, et al. Right ventricular long noncoding RNA expression in human heart failure. *Pulm Circ.* (2015) 5:135–61. doi: 10.1086/679721
120. Zhang J, Yuan L, Zhang X, Hamblin MH, Zhu T, Meng F, et al. Altered long non-coding RNA transcriptomic profiles in brain microvascular endothelium after cerebral ischemia. *Exp Neurol.* (2016) 277:162–70. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.12.014
121. Li J, Li Q, Chen L, Gao Y, Zhou B, Li J. Competitive endogenous RNA networks: integrated analysis of non-coding RNA and mRNA expression profiles in infantile hemangioma. *Oncotarget.* (2018) 9:11948–63. doi: 10.18632/oncotarget.23946
122. Wolfien M, Brauer DL, Bagnacani A, Wolkenhauer O. Workflow development for the functional characterization of ncRNAs. *Methods Mol Biol.* (2019) 1912:111–32. doi: 10.1007/978-1-4939-8982-9_5
123. Wang J, Liu K, Liu Y, Lv Q, Zhang F, Wang H. Evaluating the bias of circRNA predictions from total RNA-Seq data. *Oncotarget.* (2017) 8:110914–21. doi: 10.18632/oncotarget.22972
124. Müller R, Weirick T, John D, Militello G, Chen W, Dimmeler S, et al. ANGIOGENES: knowledge database for protein-coding and noncoding RNA genes in endothelial cells. *Sci Rep.* (2016) 6:32475. doi: 10.1038/srep32475
125. Khan S, Taverna F, Rohlenova K, Treps L, Geldhof V, de Rooij L, et al. EndoDB: a database of endothelial cell transcriptomics data. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D736–44. doi: 10.1093/nar/gky997
126. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D155–62. doi: 10.1093/nar/gky1141
127. Van Peer G, Lefever S, Anckaert J, Beckers A, Rihani A, Van Goethem A, et al. miRBase tracker: keeping track of microRNA annotation changes. *Database.* (2014) 2014:bau080. doi: 10.1093/database/bau080
128. Volders P-J, Anckaert J, Verheggen K, Nuytens J, Martens L, Mestdagh P, et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D135–9. doi: 10.1093/nar/gky1031
129. Xu J, Bai J, Zhang X, Lv Y, Gong Y, Liu L, et al. A comprehensive overview of lncRNA annotation resources. *Brief Bioinform.* (2017) 18:236–49. doi: 10.1093/bib/bbw015
130. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: a comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA.* (2006) 12:192–7. doi: 10.1261/rna.2239606
131. Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chang N-W, Lin Y-L, Liao K-W, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* (2018) 46:D296–302. doi: 10.1093/nar/gkx1067

132. Andrés-León E, González Peña D, Gómez-López G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database*. (2015) 2015:bav035. doi: 10.1093/database/bav035
133. Bruno AE, Li L, Kalabus JL, Pan Y, Yu A, Hu Z. miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3'UTRs of human genes. *BMC Genom.* (2012) 13:44. doi: 10.1186/1471-2164-13-44
134. Bonome T, Levine DA, Shih J, Randonovich M, Pise-Masison CA, Bogomolny F, et al. A gene signature predicting for survival in suboptimally debulked patients with ovarian cancer. *Cancer Res.* (2008) 68:5478–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6595
135. Wu W-S, Tu B-W, Chen T-T, Hou S-W, Tseng JT. CSmiRTar: Condition-specific microRNA targets database. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0181231. doi: 10.1371/journal.pone.0181231
136. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* (2009) 37:D105–110. doi: 10.1093/nar/gkn851
137. Naeem H, Küffner R, Csaba G, Zimmer R. miRSel: automated extraction of associations between microRNAs and genes from the biomedical literature. *BMC Bioinform.* (2010) 11:135. doi: 10.1186/1471-2105-11-135
138. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* (2015) 12:697. doi: 10.1038/nmeth.3485
139. Backes C, Kehl T, Stöckel D, Fehlmann T, Schneider L, Meese E, et al. miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:D90–6. doi: 10.1093/nar/gkw926
140. Gennarino VA, Sardiello M, Mutarelli M, Dharmalingam G, Maselli V, Lago G, et al. HOCTAR database: a unique resource for microRNA target prediction. *Gene.* (2011) 480:51–8. doi: 10.1016/j.gene.2011.03.005
141. Hsu JB-K, Chiu C-M, Hsu S-D, Huang W-Y, Chien C-H, Lee T-Y, et al. miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinform.* (2011) 12:300. doi: 10.1186/1471-2105-12-300
142. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 43:D146–52. doi: 10.1093/nar/gku1104
143. Paraskevopoulou MD, Vlachos IS, Karagkouni D, Georgakilas G, Kanellos I, Vergoulis T, et al. DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* (2016) 44:D231–8. doi: 10.1093/nar/gkv1270
144. Cheng L, Wang P, Tian R, Wang S, Guo Q, Luo M, et al. LncRNA2Target v2.0: a comprehensive database for target genes of lncRNAs in human and mouse. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D140–4. doi: 10.1093/nar/gky1051
145. Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoepfner MP, Du ZG, Paulsen M, et al. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:9290–301. doi: 10.1093/nar/gkx706
146. Barupal JK, Saini AK, Chand T, Meena A, Beniwal S, Suthar JR, et al. ExcellmiRDB for translational genomics: a curated online resource for extracellular microRNAs. *OMICS.* (2015) 19:24–30. doi: 10.1089/omi.2014.0106
147. Russo F, Bella SD, Nigita G, Macca V, Laganà A, Giugno R, et al. miRandola: extracellular circulating MicroRNAs database. *PLOS ONE.* (2012) 7:e47786. doi: 10.1371/journal.pone.0047786
148. Yang Q, Qiu C, Yang J, Wu Q, Cui Q. miREnvironment database: providing a bridge for microRNAs, environmental factors and phenotypes. *Bioinformatics.* (2011) 27:3329–30. doi: 10.1093/bioinformatics/btr556
149. Gong J, Wu Y, Zhang X, Liao Y, Sibanda VL, Liu W, et al. Comprehensive analysis of human small RNA sequencing data provides insights into expression profiles and miRNA editing. *RNA Biol.* (2014) 11:1375–85. doi: 10.1080/15476286.2014.996465
150. Yang Z, Wu L, Wang A, Tang W, Zhao Y, Zhao H, Teschendorff AE. dbDEM2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:D812–8. doi: 10.1093/nar/gkw1079
151. Mooney C, Becker BA, Raoof R, Henshall DC. EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics.* (2016) 32:1436–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw008
152. Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D1013–7. doi: 10.1093/nar/gky1010
153. Wang D, Gu J, Wang T, Ding Z. OncomiRDB: a database for the experimentally verified oncogenic and tumor-suppressive microRNAs. *Bioinformatics.* (2014) 30:2237–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btu155
154. Bao Z, Yang Z, Huang Z, Zhou Y, Cui Q, Dong D. LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D1034–7. doi: 10.1093/nar/gky905
155. Gao Y, Wang P, Wang Y, Ma X, Zhi H, Zhou D, et al. Lnc2Cancer v2.0: updated database of experimentally supported long non-coding RNAs in human cancers. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D1028–33. doi: 10.1093/nar/gky1096
156. Miao Y-R, Liu W, Zhang Q, Guo A-Y. lncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs. *Nucleic Acids Res.* (2018) 46:D276–80. doi: 10.1093/nar/gkx1004
157. Ning S, Yue M, Wang P, Liu Y, Zhi H, Zhang Y, et al. LincSNP 2.0: an updated database for linking disease-associated SNPs to human long non-coding RNAs and their TFBSs. *Nucleic Acids Res.* (2017) 45:D74–8. doi: 10.1093/nar/gkw945
158. Dai E, Yu X, Zhang Y, Meng F, Wang S, Liu X, et al. EpimiR: a database of curated mutual regulation between miRNAs and epigenetic modifications. *Database.* (2014) 2014:bau023. doi: 10.1093/database/bau023
159. Vergoulis T, Kanellos I, Kostoulas N, Georgakilas G, Sellis T, Hatzigeorgiou A, et al. mirPub: a database for searching microRNA publications. *Bioinformatics.* (2015) 31:1502–4. doi: 10.1093/bioinformatics/btu819
160. Szcześniak MW, Makołowska I. miRNEST 2.0: a database of plant and animal microRNAs. *Nucleic Acids Res.* (2014) 42:D74–7. doi: 10.1093/nar/gkt1156
161. Gerlach D, Kriventseva EV, Rahman N, Vejnar CE, Zdobnov EM. miOrtho: computational survey of microRNA genes. *Nucleic Acids Res.* (2009) 37:D111–7. doi: 10.1093/nar/gkn707
162. Potente M, Mäkinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2017) 18:477–94. doi: 10.1038/nrm.2017.36
163. Liu SJ, Nowakowski TJ, Pollen AA, Lui JH, Horlbeck MA, Attenello FJ, et al. Single-cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex. *Genome Biol.* (2016) 17:67. doi: 10.1186/s13059-016-0932-1
164. Wagner J, Rapsomaniki MA, Chevrier S, Anzeneder T, Langwieder C, Dykgers A, et al. A single-cell atlas of the tumor and immune ecosystem of human breast cancer. *Cell.* (2019) 177:1330–45.e18. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.005
165. Xiao Z, Dai Z, Locasale JW. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat Commun.* (2019) 10:3763. doi: 10.1038/s41467-019-11738-0
166. Lukowski SW, Patel J, Andersen SB, Sim S-L, Wong HY, Tay J, et al. Single-cell transcriptional profiling of aortic endothelium identifies a hierarchy from endovascular progenitors to differentiated cells. *Cell Rep.* (2019) 27:2748–58.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.102
167. Zhao Q, Eichten A, Parveen AA, Adler C, Huang Y, Wang W, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal endothelial cell heterogeneity in tumors and changes following anti-angiogenic treatment. *Cancer Res.* (2018) 78:2370–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2728

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Hernández-Romero, Guerra-Calderas, Salgado-Albarrán, Maldonado-Huerta and Soto-Reyes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.