

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD
EN LA EXPRESION DE LOS ARN-MENSAJEROS
DE ADN-METIL-TRANSFERASAS EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. En C. Victor M. del Castillo Falconi

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis A. Herrera Montalvo
[Instituto Mexicano de Medicina Genómica](#)

COMITÉ TUTOR

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
Dr. Fabio Salamanca Gómez
[Instituto Mexicano del Seguro Social](#)

México CDMX, 2023



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.

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

DEDICATORIA:

a mi hija,

Sarah Samantha Del castillo Barba.

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD
EN LA EXPRESION DE LOS ARN-MENSAJEROS
DE ADN-METIL-TRANSFERASAS EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. En C. Victor M. del Castillo Falconi

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis A. Herrera Montalvo
[Instituto Mexicano de Medicina Genómica](#)

COMITÉ TUTOR

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
Dr. Fabio Salamanca Gómez
[Instituto Mexicano del Seguro Social](#)

México CDMX, 2023

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

**“Estudio de la variabilidad de los RNAm de las ADN metil-transferasas
de los carcinomas de ovario”**

Por: Victor M. Del Castillo Falconi.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación del laboratorio de inestabilidad cromosómica de la carcinogénesis, en la unidad de investigación biomédica básica (UNAM), subdirección de investigación básica, Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) Avenida San Fernando No. 22, Col. Sección XXI, CDMX, México.

A la M. en C. Clementina Castro Hernández, por el apoyo técnico en todas las técnicas, uso de equipo, material de laboratorio, y experimentos. A la M. en C. Julieta Domínguez Ortiz, por el apoyo en el manejo, uso y cuidados de las líneas celulares derivadas del cáncer. A la M. en C. Karla M. Torres-Arciga, por el apoyo en la validación experimental de líneas celulares. Al Biol. Fernando Luna-Maldonado, por el apoyo con la clonación de plásmidos. A la M. en C. Laura Contreras-Espinosa, por su apoyo en el escrito. A la cito- genetista, Adriana Areli Gudiño Gómez, por su apoyo en la extracción, y conteo de cromosomas. Al Dr. Abraham Pedroza-Torres, por su apoyo en el cultivo de líneas celulares derivadas del carcinoma de ovario de alto grado. Al Dr. Alejandro López de Saavedra, por su apoyo en la unidad de microscopía (ADMIRA). Al Dr. David Cantú de León por su apoyo en la recolección de muestras del carcinoma de ovario. Al Dr. Luis A. Herrera Montalvo por su apoyo en la realización de este trabajo, dentro de su laboratorio.

FINANCIAMIENTO

Los estudios de Maestría y Doctorado fueron apoyados por beca CONACYT (CVU_446841).

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| • La metilación del ADN y las DNMTs | 5 |
| • La biología de las DNMT's | 7 |
| • La variabilidad de las DNMTs en el desarrollo embrionario | 12 |
| • Las isoformas de DNMT3B | 15 |
| MODELO DE ESTUDIO: | 19 |
| • El carcinoma de ovario | 19 |
| • La metilación del carcinoma de ovario | 20 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 26 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 26 |
| HIPÓTESIS | 25 |
| OBJETIVO GENERAL | 25 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 25 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 27 |
| • Muestra de tejidos | 27 |
| • Transcripción reversa | 28 |
| • Cuantificación de RNAm de isoformas de DNMT3B | 28 |
| • Validación de expresión de RNAm | 29 |
| • Líneas celulares de carcinoma de ovario | 29 |
| • Transfección de DNMT3B3 en la línea celular OVCAR3 | 29 |
| • Conteo de metafases | 30 |
| • Ensayo de inmunoprecipitación de 5´metil citosina (meDIP) | 30 |
| • Análisis estadísticos | 31 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 31 |
| • Caracterización de la expresión de las metil-transferasas de ADN en el carcinoma de ovario | 32 |
| • Asociación de la sobre-expresión de DNMT3B3 con un peor pronóstico de las pacientes en el carcinoma de ovario | 36 |
| • La sobre-expresión del RNAm de la DNMT3B3 en líneas celulares de estadios avanzados de carcinoma seroso de alto grado causa hipometilación del DNA. | 42 |
| DISCUSIÓN | 44 |
| CONCLUSIÓN | 47 |
| PERSPECTIVAS | 48 |
| REFERENCIAS | 45 |
| ANEXOS (ARTÍCULOS PUBLICADOS) | 58 |

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

RESUMEN

La metilación del ADN es esencial en la carcinogénesis, de manera importante en el carcinoma de ovario. DNMT3B, es una ADN metiltransferasa (DNMT) *de novo* de las que hay quince isoformas producto del corte y empalme alternativo. Las isoformas de DNMT3B pierden exones del dominio catalítico. La expresión variable de las isoformas de DNMT3B se ha observado frecuentemente en varios tipos de cáncer como mama, pulmón, estómago e hígado. Sin embargo, no se sabe ¿Cuál es la expresión de las isoformas de DNMT3B en los carcinomas de ovario?. En este estudio, nosotros analizamos la expresión del ARNm por qRT-PCR, usamos oligonucleótidos específicos para medir la expresión de las isoformas de DNMTs en 63 muestras de carcinoma de ovario y determinamos el efecto de la expresión en supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG); así como en la progresión de los tumores. Las pacientes con carcinoma de ovario incluyen los principales sub-tipos histológicos, pacientes en todos los estadios clínicos de la enfermedad (FIGO) y la mayoría de las pacientes tuvieron citorreducción óptima. En este trabajo, nosotros encontramos la sobre-expresión de las DNMTs en carcinomas de ovario de alto grado (valor- $p < 0.05$) y específicamente la sobre-expresión de las isoformas de DNMT3B en estadios avanzados del carcinoma (valor- $p < 0.05$). Notablemente, encontramos la sobre-expresión de DNMT3B3 en carcinoma seroso de ovario, en carcinomas de alto grado y en estadios avanzados. Finalmente, observamos que la sobre-expresión de las isoformas de DNMT3B se asocia con SLE y SG en las pacientes con carcinoma seroso. Además, demostramos que la sobre-expresión de DNMT3B3 lleva a la hipometilación del ADN en líneas celulares derivadas de estadios avanzados del carcinoma de ovario seroso de alto grado. Sugiriendo que la sobre-expresión de DNMT3B3 puede ser usado como un bio-marcador del carcinoma seroso de ovario de alto grado.

ABSTRACT

DNA methylation is essential in carcinogenesis, importantly, in ovarian carcinoma. DNMT3B is a DNA methyltransferase that as product of alternative splicing has fifteen isoforms probed. DNMT3B isoforms lost catalytic domain. The variable expression of DNMT3B isoforms has been observed in several cancer types, such as: breast cancer, lung cancer, and stomach and liver cancer. However, it is not know how is the expression of DNMT3B into the ovarian carcinoma? In this work, we analyzed the expression of mRNA by qRT- PCR, and we used specific oligonucleotides to size the expression of every DNMT and DNMT3B isoforms in 63 ovarian carcinoma samples, and to determine the effect of expression in disease free survival (DFS), and overall survival (OS); and tumor progression. The ovarian carcinoma sample include the most common histological subtypes, are samples of every clinical stages (FIGO), and higher in optimal cytorreduction. In this work, we found the overexpression of DNMT3B isoforms in ovarian carcinomas (valor- $p < 0.05$), and specifically the overexpression of high-grade ovarian carcinoma (valor- $p < 0.05$). Importantly, we found the overexpression of DNMT3B3 isoform in high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC). Finally, we observed that overexpression of DNMT3B isoforms associates with DFS and OS in HGSOC patients. Also, we demonstrate that overexpression of DNMT3B3 drives to hipomethylation of DNA in ovarian carcinoma cell lines derived from HGSOC tumors. Suggesting, that overexpression of DNMT3B3 could be used as biomarker in HGSOC.

INTRODUCCIÓN

Para comenzar a hablar de la variabilidad en la vida, habría que darle un alto valor a su importancia en los seres vivos. Ya que, ha sido una de las preguntas más importantes de la evolución biológica. La variabilidad de la vida: son los caracteres en los seres vivos, en esencia; el concepto de variabilidad biológica es: los caracteres ó las partes en común que tiene la vida. Y, cada variabilidad de cada carácter, tiene un rango de cambio determinado. Porque filogenéticamente, cada punto en una línea recta podría variar en su dirección y esto podría causar una rama diferente en el árbol de la vida. En este estudio, nos centramos en tratar de explicar como es que la variabilidad de los seres vivos se observa, no solo en su forma externa; sino que la variabilidad de la vida también se observa en la forma interna, dentro de los núcleos celulares de las células, en el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Por una parte, la estructura del ADN está formada por 4 bases nitrogenadas y complementarias: citosina, adenina, timina y guanina. Sabemos que en esencia, dentro de esta secuencia complementaria de bases nitrogenadas; la citosina es la base nitrogenada más variable del ADN. En mamíferos, la citosina puede encontrarse en una de sus principales formas: citosina, ó 5`metil-citosina (5mC) (1–3). Nosotros, nos hemos interesado en estudiar a la clase de enzimas, que son proteínas que aceleran la velocidad de la metilación de los ácidos nucleicos; precisamente, es en la familia de enzimas metil-transferasas de ADN, ó MTasas de ADN de los seres vivos: donde se lleva a cabo la reacción química de citosina a 5mC.

Se han encontrado homologías de las MTasas en cada uno de los *taxa* de los cinco reinos. Desde los virus con ARN metil-transferasas, los procariontes, hasta los hongos, plantas y animales, tanto vertebrados como invertebrados (4–6). Además, las MTasas han sido duplicadas en los diferentes *taxones*, mostrando diversidad de secuencias de genes parálogas con un origen en común. Esto quiere decir que aunque las MTasas hayan recibido distintos nombres, tienen el

mismo ancestro en común. Esto es cierto, con unas pocas excepciones de taxones que no tienen ni metilación del ADN, ni metil-transferasa de ADN, pero aún así llevan acabo su desarrollo de vida (7,8).

Por una parte, durante el desarrollo; la metilación del ADN muestra variación entre cada uno de los *taxones*. Y por la otra parte, los transcritos de ARN también muestran variabilidad en la expresión diferencial de cada uno de los tejidos de los seres vivos. El mejor ejemplo hasta ahora para explicar esto es un trabajo comparativo que se hizo en géneros de *taxones* de pez: *Danio rerio* (pez cebra) comparado con el *Medaka sp.* (pez payaso); durante las transiciones de los estados de cigoto hasta gástrula temprana; la metilación del ADN es realizada por DNMT3BB. Sin embargo, la metilación del ADN tiene diferente comportamiento: en pez cebra la metilación va aumentando de manera gradual, mientras que en el pez *Medaka* la metilación del ADN aumenta de manera radical (9).

Además, se ha sabe que en humano (*Homo sapiens*) han sido identificadas 15 isoformas de DNMT3B sobre-expresadas en distintos tipos de cáncer: como cáncer de mama, cáncer colorrectal y carcinoma de ovario (9). En el carcinoma de ovario, la metilación del ADN es heterogénea, así como los carcinomas de ovario son heterogéneos. Los patrones de metilación del ADN son parte de la clasificación del carcinoma de ovario, diagnóstico, progresión y las respuestas a la terapia. En este trabajo, se identificó que las DNMTs son diferencialmente expresadas en los diferentes sub-tipos del carcinoma de ovario comparadas con tejido de ovario sin cáncer. Posteriormente, la sobre-expresión de las isoformas de DNMTs se asociaron con el diagnóstico y pronóstico de las pacientes con carcinoma de ovario, validando la sobre-expresión diferencial de DNMT3B3 en el subtipo del carcinoma seroso de ovario. Además, se midió en líneas celulares para demostrar la variabilidad en la expresión de las DNMTs en los subtipos de carcinoma seroso de alto grado y su asociación con la inestabilidad cromosómica (CIN).

LA METILACIÓN DEL ADN Y LAS METIL-TRANSFERASAS DE ADN

Para comenzar a hablar de las metil-transferasas, describiremos la química general de estas enzimas; la estructura primaria de las MTAsas en general, cuenta con tres dominios proteicos: el dominio de unión adomet, que interacciona con adomet para obtener el grupo metilo, un dominio de reconocimiento de blanco (DRB) que identifica secuencias cortas de ADN que son blancos de metilación y el dominio catalítico, que transfiere el grupo metilo de adomet al nucleótido blanco (10). Ahora bien, el mecanismo de reacción por el que las MTAsas metilan el ADN, en general es: en primer lugar, interaccionan con el co-factor s-adenosil metionina (AdoMet) para; en segundo lugar, transferir un grupo metilo; y por último, produce S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy) y ADN metilado (5mC) (Figura 1).

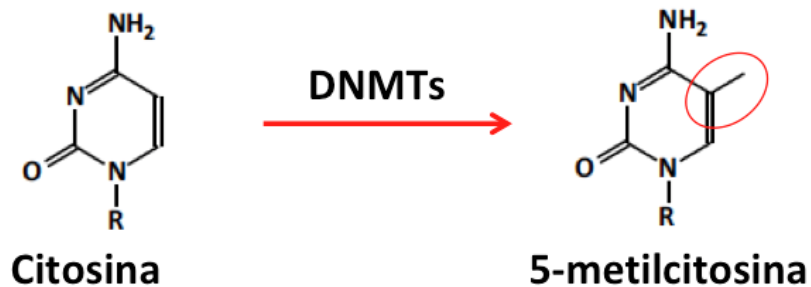


Figura 1. Metilación del ADN. Las DNMTs interaccionan con el co-factor S-adenosil metionina (AdoMet) para transferir un grupo metilo y producir S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy) y ADN metilado (5mC).

Posteriormente, desde el tiempo en el que ha habido vida en el planeta, la familia de las enzimas metil-transferasas de ADN (MTAsas) ha sido conservada y diversificada en los 5 reinos de la vida (5). Las metil-transferasas de ADN tienen diversidad de proteínas ortólogas que son proteínas homólogas de los diferentes *taxa* de seres vivos. Y, además, tiene diferentes proteínas parálogas que son duplicaciones de MTAsas en cada *taxón* del árbol filogenético de la vida. Un estudio de bioinformática ha encontrado que DNMT2 es la MTasa más ampliamente conservada en los seres vivos. Y, que DNMT2 tiene el dominio de

metiltransferasa de ARN (11). Sugiriendo, que el origen de las MTasas de ADN, fue por variaciones a partir de las MTasas de ARN presentes en los virus (11). En distintos estudios se ha observado el aumento de la metilación del ADN en la presencia de los virus, como por ejemplo; el virus de la Hepatitis B, el virus de Epstein Barr, el virus herpes humano 8 (variedad de virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi) y el virus de la inmunodeficiencia humana (12–21).

LA BIOLOGÍA DE LAS METIL-TRANSFERASAS DE ADN

Dentro de la biología de las MTasas, encontramos que tienen una filogenia del tipo mono-filético (un ancestro en común y sus derivados) y que la variabilidad de las secuencias se agrupan en un *taxa* (conjunto de *taxones* que incluye a un *taxón* ancestral y a sus descendientes). Por ejemplo, en la MTasa de 5mC de procariontes únicamente está formada por una pequeña secuencia de apenas 300 pares de bases donde se encuentra el dominio de interacción con dinucleótidos CpG y el dominio catalítico de metil-transferasa (22–26). Posteriormente, en eucariontes, se encuentra una inserción en el extremo amino-terminal y el sitio catalítico se conserva en el extremo carboxilo-terminal, en un transcrito de ARN de cinco mil bases de la metil-transferasa de ADN 1 (DNMT1) en *Homo sapiens*; y haciendo énfasis en que la MTasa del *taxón* ancestral es la de procariontes (27).

Además, los taxones de metil-transferasas de ADN presentan similitudes (homologías en sus secuencias de ADN) y diferencias si comparamos a cada uno de las MTasas de los 5 reinos (5). Dentro de los tipos de homología entre los diferentes *taxa* encontramos a las secuencias ortólogas que son: 1) secuencias similares (homologías) que se encuentran en cada uno de los *taxa*, por ejemplo; Las algas tienen a la MTasa ortóloga, metil-transferasa de ADN 1 (*MET1*); y las plantas también tienen *MET1* (28). Por lo tanto, *MET1* es una secuencia ortóloga en algas y plantae (29). 2) secuencias parálogas de ADN que son: secuencias similares (homólogas) originadas por duplicación del ADN y tienen un ancestro en común; por ejemplo, en plantas se encuentran a los parálogos *MET1* y Cromometil-transferasa 1, 2 y 3 (*CMT1/2/3*); donde *CMT1*, *CMT2* y *CMT3* son secuencias parálogas del ADN de plantas (30–34). De manera interesante, un buen ejemplo que engloba ambos conceptos lo encontramos en los animales, porque tanto en invertebrados como en vertebrados, se han caracterizado a las secuencias ortólogas de metil-transferasas 1, 2 y 3 (*DNMT1/2/3*) de ADN (27). Aunque, con sus variaciones en las secuencias de ADN. DNMT1, es una secuencia paróloga de DNMT2 y paróloga a DNMT3 tanto en invertebrados como en vertebrados (35–39) (Figura 2). Los eventos más interesantes de secuencias

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

parálogas los encontramos en el pez cebra, donde DNMT3 se ha duplicado hasta 8 veces, por lo tanto presenta 8 secuencias parálogas de DNMT3 (40). También en los modelos de animales radiados, equinodermos (erizos y estrellas de mar) que no tienen sitio de unión a PCNA en DNMT1 y aun así llevan a cabo su ciclo de vida normal como otros animales (41).

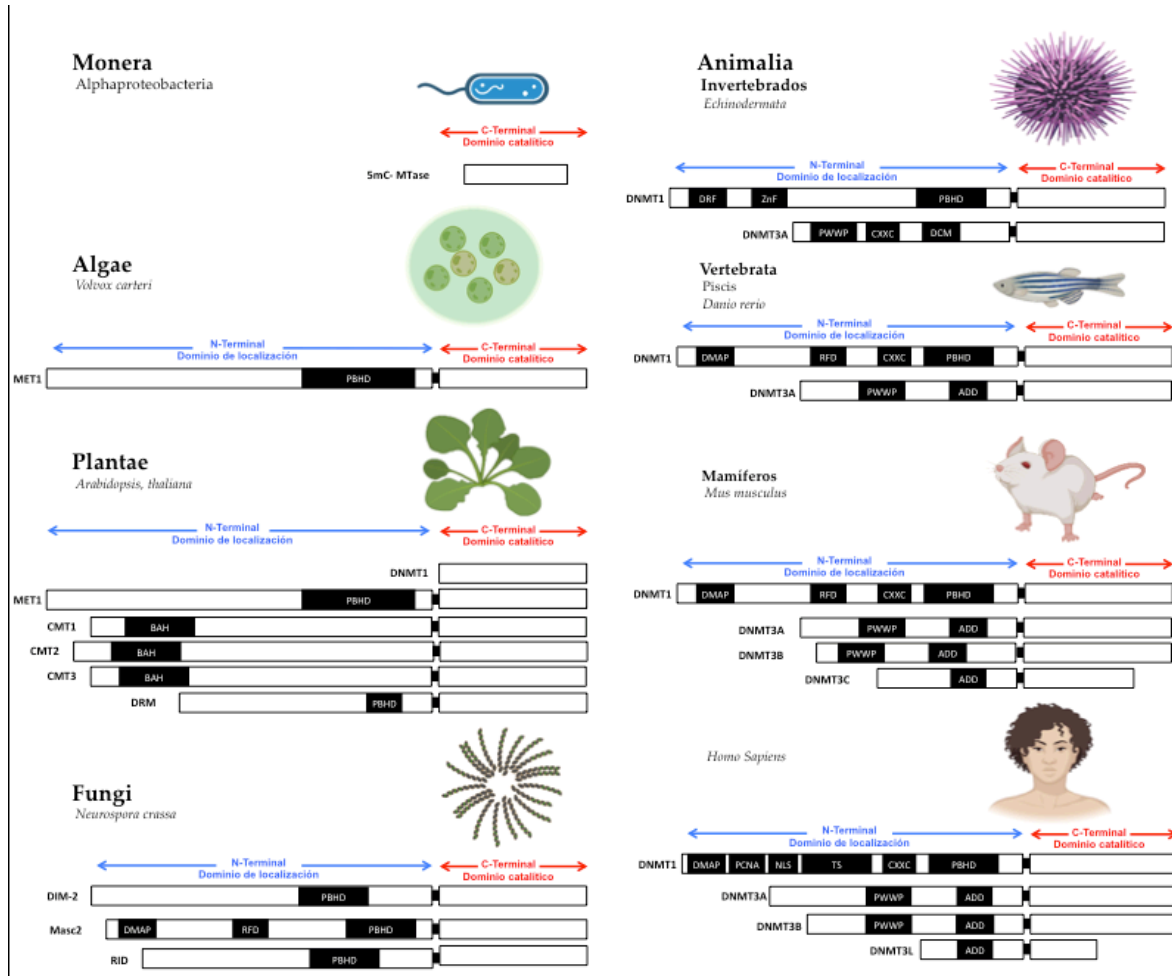


Figura 2. La estructura de las metil-transferasas de ADN. La familia de las DNMTs está presente en todos los seres vivos. Las DNMTs tienen dos dominios: el dominio catalítico en el extremo carboxi-terminal, con los motivos conservados y el dominio amino-terminal, que contiene los motivos de reconocimiento de locus en el ADN. Monera contiene únicamente el dominio metil-transferasa de 5mC, ejemplo: *Alphaproteobacterias*. Protistas y algas están compuestos por las proteínas parálogas: MET1, CMT3 y DRM2; MET1 se encuentra en *Volvox carteri*. Fungi tiene las proteínas parálogas DIM-2, Masc1 y 2 y RID, por ejemplo, en *Neurospora crassa*. En animales; Invertebrados, las proteínas parálogas son DNMT1 y DNMT3, ejemplo, Equinodermata; Vertebrados, peces, las proteínas parálogas son DNMT1 y DNMT3, el pez cebra tiene 8 duplicaciones de DNMT3 y las proteínas parálogas de mamíferos son: DNMT1 y DNMT3A/B/C en *Mus musculus* y DNMT1, 3A/B/L en *Homo sapiens*. **Abreviaturas:** CD, chromo dominio; DMAP, motivo de unión a proteína DMAP-1; DPCDNA, motivo de interacción con PCNA; NLS, señal de

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

localización nuclear; TS, sitio blanco ; CXXC, motivo de interacción con los aminoácidos Cys-X-X-Cys; PBHD, proteína de unión a homeodominio; PWWP, motivo de interacción con pro-trp-trp-pro; ADD dominio de interacción ATRX, DNMT3, DNMT3, DNMT3L. Imagen creada en Biorender.com, acceso: 21 de Julio del 2022.

Además, en algunos ejemplos de *taxones*: de Fungi; *Saccharomyces cerevisiae*; e invertebrados, nematodos (*Caenorhabditis elegans*), y artrópodos (*Drosophila melanogaster*), que llevan acabo su desarrollo completo, pero no tienen: ni metilación del ADN, ni DNMT1/2/3, con excepción de *Drosophila melanogaster* que tiene a DNMT2 (Tabla 1).

Tabla 1. Taxones sin metilación del ADN detectada, ni presencia de MTasa.

| Taxones sin metilación del ADN detectada. | MTasa reportada en el taxón | Referencias |
|---|-----------------------------|-------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , | - | (8) |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | - | (8,42,43) |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | DNMT2 | (7,44) |

La función esencial de las MTasas en los seres vivos es metilar y proporcionarle estabilidad al ADN. Secundario a esto, las MTasas han ganado otras funciones biológicas en los diferentes *taxa*, que se enlistan en la tabla 2. Por ejemplo, la función de las MTasas en procariontes es la de metilar su propio ADN, sin metilar el ADN extranjero y así, los procariontes identifican su propia molécula de ADN (45). Esto se conoce como el sistema de reconocimiento de ADN metilado, ó sistema por modificación y restricción. O sea que, las bacterias reconocen su propio ADN y evitan que el ADN que podría tener consecuencias letales sea transcrito o replicado (46–48). Otro buen ejemplo, de una función conservada de las metil-transferasas de ADN es que evitan la endo-reduplicación del ADN. ADN adenina metil-transferasa (DAM) transfiere un grupo metilo a las adeninas de las secuencias consenso GATC que han sido duplicadas (2). Con esto, la molécula evita que se realicen nuevos inicios de duplicación del ADN, evitando de esta manera la poliploidía del material genético.

“La variabilidad de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

Tabla 2. Las funciones de las metil-transferasas de ADN en los cinco reinos.

| Ortólogos | grupo taxonómico con metil-transferasas de ADN conocidas | Parálogos de metil-transferasas de ADN | Funciones asociadas en cada grupo taxonómico | Referencias |
|------------------------|---|---|--|--------------------|
| Monera | <i>Alphaproteobacteria</i> | 5mC-MTase. | Restricción por modificación Silenciamiento de secuencias de bacteriófagos. | (25) |
| Protistas | <i>Diatomeas and Choanoflagellates.</i> <i>Chlorella, spp.</i> , <i>Clamydomonas; Volvox carteri.</i> | MET1, CMT3 y DRM2. MET1, CMT1 y 3 y DMR. | No probado experimentalmente. Ciclo de vida, impronta génica y desarrollo. | (34) |
| Algas | <i>Humicola grisea; budding yeast; Neurospora sp; Aspergillus clavatus.</i> | DIM-2, Masc1 y 2 y RID. | Represión genómica. | (49,50) |
| Fungi | <i>Arabidopsis thaliana</i> | MET1, CMT, DMR DNMT1, 2 y 3. | Reproducción impronta génica, y desarrollo. | (51,52) |
| Plantae | <i>Nematoda, Equinodermata, Paracentrotus, lividus, Solea, seleganensis, Gadus, morhua, Arthropoda,</i> | DNMT1 y 3 | Represión de secuencias repetidas, desarrollo, regulación génica y memoria génica. | (43,53) |
| Animales invertebrados | | | Represión de secuencias repetidas, desarrollo, regulación génica, memoria epigenética y progresión del cáncer. | (6,54) |
| Animales vertebrados | Peces and mamíferos | DNMT1, 2 y 3 | | |

Además de la identificación de su propia molécula de ADN por metilación, las MTasas tienen expresión diferencial en las diferentes fases del ciclo de vida en los seres vivos. En las algas del género *Boecheira, sp*, se ha observado que las MTasas se sobre-expresan únicamente durante la fase de reproducción tanto sexual como asexual (29). Y, en plantas con flor las MTasas también se sobre-expresan diferencialmente durante el desarrollo (28,30–32,55–57).

En mamíferos, DNMT1 es esencial para el mantenimiento de los patrones de metilación del ADN a través del ciclo celular. DNMT1 fue la primera MTasa humana en ser identificada con actividad metil-transferasa de ADN mantiene los patrones de metilación del ADN a través del ciclo celular en células maduras (58–60). DNMT3 ha sido duplicado varias veces en mamíferos: DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C y DNMT3L. Además, las DNMT3s pueden interactuar entre sí, como módulo de un complejo de DNMT3s. De hecho, DNMT3L es la proteína andamiaje para DNMT3A y DNMT3B que aumenta su actividad catalítica. DNMT3A y DNMT3B establecen los patrones de metilación *de novo* del ADN y DNMT1 los mantiene en células maduras (61). Recientemente se encontró a DNMT3C, un nuevo parólogo que ha sido estudiado en modelos de ratón y se sabe que su función es la metilación de retro-transposones y otros elementos de secuencias repetidas del genoma y la fertilidad en machos ratones de *mus musculus* (62,63). Las distintas funciones de las DNMTs que se han asociado con los seres vivos se enlistan en la tabla 2.

LA VARIABILIDAD DE LAS DNMTs EN LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

La variación de las MTasas en el desarrollo tiene ventanas de cambio durante la vida de los *taxones*. Esta afirmación para las MTasas puede observarse en distintos niveles biológicos, tanto en las moléculas, como en las células de los *taxones*. O sea, que las variaciones dentro del núcleo de la célula (en el ADN, en los transcritos de ARN y en las proteínas) corresponden a las variaciones de las células del *taxón*. Y, ambos cumplen con los criterios de: un valor mínimo y un valor máximo, en un rango de los valores del carácter en el *taxón*. Además, los caracteres de interés; ya sea dentro del núcleo celular, como en las células, tienen un rango de variación en cada uno de los estadios del desarrollo. Y, en la transición de cambio del estadio del desarrollo, sucede el cambio de rango en la variación del *taxón*. En el caso de los pocos *taxones* que se desarrollan sin MTasas, la variación de MTasa es cero en cada uno de los estados del desarrollo.

Las *MTasas* tienen variación en el ADN y consecuencias en el fenotipo de los *taxones*. Sabemos que, en el mamífero *Mus musculus* (el ratón) la mutación puntual de la delección de *DNMT3A/B* es letal. Esta variante de ADN llega hasta el estadio de blástula: transita por la fertilización, pasa por la estadio de cigoto y muere en la blástula. De manera interesante, dentro de los estadios por los que transita, se observó inestabilidad cromosómica (64). Otro buen ejemplo de las consecuencias de una mutación puntual en la secuencia de ADN de las *MTasas* lo encontramos en *Homo sapiens* (humano). Donde, una mutación puntual en el sitio catalítico de *DNMT3B*, es la causa del síndrome de inestabilidad cromosómica, inmunodeficiencia y anomalías faciales (ICF1). Esta variación de *Homo sapiens*,, únicamente vive 12 años y tiene un fenotipo carente de sistema inmune, dismorfia facial e inestabilidad cromosómica (65,66). De nuevo, en este *taxón*, el periodo de vida está limitado por la variación de *DNMT3B* en el *taxón*. Y, las células de la variante presentan inestabilidad cromosómica. Las variantes de ADN en ambos ejemplos de *taxón* muestran inestabilidad cromosómica y un periodo de vida menor al del *taxón* sin la variante de *DNMT3B*.

Por otro lado, se sabe que la metilación del ADN tiene una correspondencia con la cantidad de transcritos de ARNs de las *MTasas* en los diferentes estadios del desarrollo. Y, que tanto la metilación del ADN, como la cantidad de transcritos de ARN de las *MTasas* es diferencial en los tejidos de los cada *taxón* (27). Esta variación tan pronunciada desde los primeros estadios del desarrollo embrionario, llama la atención en la biología de las *MTasas*, ya que la correspondencia entre los caracteres del núcleo celular se observan también en el fenotipo de las células de los *taxones*. En modelos de plantas y animales; ha sido demostrado que la variabilidad en la metilación del ADN y la expresión de las DNMTs están involucradas en el desarrollo de los diferentes tejidos de los *taxones*. Sugiriendo que la metilación del ADN denota la identidad de los tipos celulares.

Tanto en algas, como en plantas se ha encontrado que las *MTasas* tienen expresión diferencial en las fases del ciclo de vida (28,30–32,55–57). Uno de los mejores ejemplos de la correspondencia entre la metilación del ADN y los transcritos de ARN en el desarrollo embrionario lo encontramos en un estudio reciente que se hizo en *Oryzias latipes* (el pez japonés) tiene un proceso de desmetilación en la célula espermática durante su maduración. Posteriormente, después de la fertilización se lleva a cabo una gradual metilación del ADN, hasta el estadio de gástrula. En el mismo trabajo, se demostró que los ARNs de DNMT1 disminuyen, mientras que DNMT3BB.1 aumenta, y se asocia al aumento gradual de la metilación del ADN. Por su parte, en *Danio rerio* (pez cebra) sucede el mismo fenómeno, sin embargo el aumento del ARN de DNMT3B y la metilación en el ADN se lleva a cabo de manera radical entre el estadio de mórula a gástrula (27,67). Estos trabajos enfocados a las DNMTs durante los primeros estadios del desarrollo embrionario muestran que la metilación del ADN y la cantidad de ARN de las DNMTs son eventos ligados e importantes en la diversidad de los *taxones* de la vida. De manera interesante, en invertebrados, también se han realizado observaciones en los cambios de los rangos de los transcritos de ARN. En artrópodos; *Solenopsis invicta* (la hormiga roja) se ha observado que los

transcritos de las DNMTs se expresan diferente tanto en hormigas hembras como en hormigas machos; así como en embriones comparados con juveniles y comparados con adultas. La cantidad de ARN de las DNMTs puede llegar a disminuir hasta ocho veces cuando comparamos a los embriones con las adultas. Resultados similares fueron encontrados al comparar los transcritos de ARN de las DNMTs de *Apis mellifera* (la abeja europea) donde compararon trabajadoras juveniles, trabajadoras adultas; y trabajadoras con la abeja reina. De manera esperada, encontraron cantidades diferenciales de ARN en cada uno de los estadios, como en los diferentes grupos sociales del *taxón* (53,68).

En el caso de *Homo sapiens*, se ha descrito que la metilación del ADN tiene un papel esencial en la expresión génica, en la diferenciación de los tejidos, en la impronta génica y en el silenciamiento del cromosoma X [6]. Las Metiltransferasas de ADN en *homo sapiens* son: DNMT1, llamada como la hemimetilasa ya que mantiene los patrones de metilación del ADN en células diferenciadas; y DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, llamadas metilasas *de novo*, ya que establecen los patrones de metilación en el ADN en las células de los primeros estadios del desarrollo embrionario [5]. Hasta ahora como resumen, hemos visto que las MTasas tanto en la filogenia de los seres vivos, como en las diferentes etapas del desarrollo de los *taxa* presentan variabilidad en las MTasas. La variación tanto en el ADN, como en los transcritos de ARN en el núcleo celular son posiblemente un biomarcador pronóstico de inestabilidad cromosómica, y muerte de las pacientes con cáncer. Y podríamos reconocer los rangos de la variabilidad de los ácidos nucleicos en los tipos celulares del cáncer. Estudios recientes han mostrado que además de los ARNs originados a partir de los parálogos de *MTasas*, se originan diferentes transcritos de ARN a partir de un mismo *locus* de ADN. En los modelos de mamíferos: *Mus musculus* y *Homo sapiens* se han descrito las isoformas de ARN mensajeros del *locus de DNMT3B*. Estas son isoformas de ARN mensajeros de *DNMT3B* que se expresan diferencialmente en los tejidos y tipos de cáncer (38,61,69).

ISOFORMAS DE DNMTs

Un posible mecanismo de auto-regulación de la transcripción de las DNMTs durante el desarrollo de los tejidos y del cáncer, es mediante la expresión de isoformas de DNMT producto del splicing alternativo. DNMT3B se ha observado sobre-expresado en cáncer y en líneas celulares derivadas de cáncer; por ejemplo, en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y cáncer de ovario (70,71). Hasta ahora, de las 40 isoformas de ARN estimadas de *DNMT3B*, se ha demostrado la existencia de 15 (Figura 3).

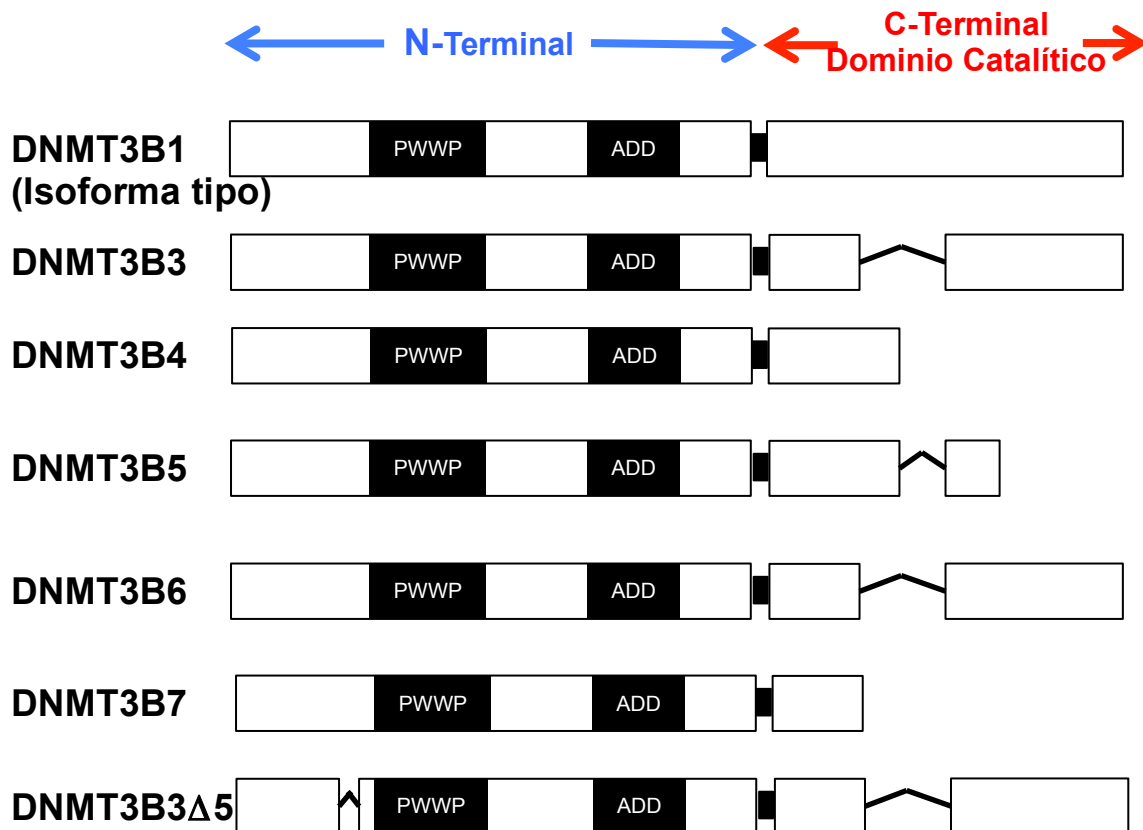


Figura 3. Isoformas de DNMT3B. Las isoformas de DNMT3B tienen diferentes caracteres. Varían en la presencia de exones en el extremo amino terminal y varían en su localización nuclear durante las fases del desarrollo embrionario. Además se ha visto que varían en su expresión según el tipo de cáncer. **Abreviaturas:** PWWP, motivo de interacción pro-trp-trp-pro y ADD, dominio ATRX, DNMT3, DNMT3L.

Las isoformas de RNA mensajero de *DNMT3B* ya se ha clasificado en 3 familias:

- La familia de ARNs mensajeros de *DNMT3B*;

Consta de 7 miembros que pierden exones en el extremo carboxilo:

DNMT3B1 y DNMT3B2 poseen todos los exones del sitio activo y por lo tanto son las isoformas catalíticamente activas. Aunque DNMT3B2 no posee los exones 1 y 2. Se sobre-expresa en células embrionarias.

DNMT3B3 – no tiene los exones 10, 21 y 22; pero posee los motivos I, IV, VI, IX y X del TRD y nueve aminoácidos del motivo XI en el dominio catalítico. DNMT3B3 no hace metilación de ADN in vitro, pero regula a DNMT3B1 disminuyendo la metilación del ADN en células embrionarias de *homo sapiens* y *mus musculus*. Se encuentra expresada ubicuamente en los tejidos del cuerpo (72,73) y se ha encontrado sobre-expresada en cáncer de hígado, cirrosis y hepatitis crónica (74).

DNMT3B4 no tiene los motivos IX y X que son importantes en la actividad catalítica. DNMT3B4 es la isoforma que tiene la menor actividad catalítica y por lo tanto, es considerado un inhibidor de la metilación porque se cree que compite con otras DNMTs (74,75). La función de DNMT3B4 es el arresto celular (76) y la hipometilación de la región pericentromérica del cromosoma (73,74). Se ha encontrado sobre-expresada en la infección de *Helicobacter pylori* y en el cáncer de estómago (77). Además DNMT3B4 se sobre-expresa en tejidos pre-cancerosos como hepatitis, cirrosis y cáncer de hígado (74).

DNMT3B5 y DNMT3B6 no han sido estudiadas en células; sin embargo, se cree que tienen una función de inhibición de DNMT3B. DNMT3B6 pierde el exón 10 y cuando se compara con DNMT3B1 gana doce aminoácidos en el dominio amino terminal. DNMT3B6 ha sido poco estudiada y se infiere que participa en la metilación del ADN (78).

DNMT3B7 disminuye la proliferación celular e incrementa los niveles de la proteína p21 (76,79). Se ha encontrado la expresión alterada de DNMT3B7 en cáncer de mama (80) y tiene función en la inducción de diferenciación de las células de la mama (79,81).

-La familia de isoformas de ARNs mensajeros de $\Delta 5DNMT3B$;

Consta de 7 miembros que pierden los primeros 5 exones y tienen un sitio de inicio de la transcripción en el exón 6:

$\Delta DNMT3B$ ha sido observada por PCR y electroforesis en cáncer de pulmón (78). Cada miembro de la familia de RNA mensajeros de $\Delta 5DNMT3B$ corresponde a cada una de las isoformas de RNA mensajeros de la familia de las DNMT3B, pero sin el exón 6. Posiblemente, son las mismas secuencias de ARN mensajeros, pero presentan un sitio de inicio de la transcripción alternativo, en el exón 6 y únicamente no contienen al motivo PWWP del exón 5. Ha sido reportado que estas isoformas se sobre-expresan desde las lesiones precursoras del cáncer de pulmón, en células no pequeñas de cáncer de pulmón y se sugiere que $\Delta DNMT3B$ predispone al cáncer .

-y la familia de isoformas de ARNs mensajeros $DNMT3B\Delta 5$;

Únicamente hay un miembro descrito en esta familia y únicamente pierde el exón 5:

El único miembro descrito de RNA mensajero de $DNMT3B\Delta 5$ pierde los mismos exones que DNMT3B3: los exones 21, 23 y 5. Se cree que al perder el dominio catalítico de la enzima y el dominio PWWP tiene consecuencias funcionales. Sin embargo, se ha encontrado sobre-expresada en líneas celulares de células pluripotentes, cáncer y tienen una función en la proliferación y formación de colonias (86).

“Expresión de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

En la tabla 3 se muestra un listado de patologías en donde se ha encontrado a las distintas isoformas de DNMT3B sobre-expresadas en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades.

Una posible hipótesis es que al aumentar las isoformas que tienen el sitio catalítico incompleto, entonces disminuya la actividad de las isoformas que tienen el sitio catalítico completo. Por ejemplo, la sobre-expresión de Δ DNMT3B4 en cáncer de pulmón contribuye a los patrones aberrantes de metilación en el ADN (87). También se ha asociado la expresión de Δ DNMT3B4 con la metilación del promotor del oncogén RASSF1A (88). Por esto, se puede hacer la hipótesis de que las isoformas de DNMT3B se asocian a la metilación del ADN de diferentes *loci* del genoma y tipos de cáncer. En otro estudio, Zeimet, *et al.*, 2011 analizaron la relación entre la hipometilación del ADN, el área nuclear, aneuploidía y proliferación en EOC; y encontraron que se asocia con la hipometilación de elementos repetidos largos nucleares (LINE1) y satélite 2 (Sat2) y contribuyen a la inestabilidad cromosómica del carcinoma de ovario (81). Estas regiones representan buenos indicadores para estimar la hipometilación global del ADN (90). Por último, los patrones de metilación aberrantes son un evento temprano de la carcinogénesis y una explicación podría ser la sobre-expresión de isoformas inactivas de DNMT3B que compiten con las isoformas activas y producen cambios en los patrones de metilación del ADN (91–93,93–96).

Tabla 3. ARN mensajeros de DNMT3B como biomarcadores de enfermedad.

| Isoforma de DNMT3B | Tipo de biomarcador | Tipo de patología | Referencias |
|--------------------|--------------------------|--|-----------------|
| DNMT3B3 | Diagnostico | Cirrhosis Hepatitis | (97–99) |
| DNMT3B4 | Diagnostico | Infección de <i>Helicobacter pylori</i> Cáncer gástrico Cáncer renal | (100–103) |
| DNMT3B7 | Diagnostico y Pronóstico | Cáncer de mama | (91–94,103,104) |
| Δ DNMT3B4 | Diagnostico | Hiperplasia de pulmón Cáncer de pulmón | (88) |

MODELO DE ESTUDIO EL CARCINOMA DE OVARIO

A nivel poblacional, el cáncer de ovario (CO) es considerado la enfermedad más letal entre los cánceres ginecológicos en el mundo. En estados unidos de américa aproximadamente, 22,280 nuevos casos y 14,240 muertes son reportados anualmente (105). Las pacientes con carcinomas de ovario son típicamente diagnosticadas en estadios avanzados (75%): diseminado a otros tejidos abdominales o metástasis. La mayoría de los pacientes en esta situación no responden a quimioterapias (70%) (105).

A nivel microscópico, el CO es un cáncer heterogéneo que tiene tumores germinales, del estroma y epiteliales. Los tumores epiteliales son el 90% de los casos. Los subtipos del cáncer epitelial de ovario (CEO) son: carcinoma seroso de ovario de alto grado (CSOAG) (68%), carcinoma seroso de ovario de bajo grado (CSOBG) (3%), carcinoma endometriode (CE) (11%), carcinoma mucinoso (CM) (3%), carcinoma de células claras (CCC) (12%) y carcinoma mixto (1%) (106–108).

A nivel molecular, el cáncer hereditario de CEO, se conocen mutaciones genéticas de línea germinal, por ejemplo; el síndrome de mama-ovario hereditario: por mutaciones en los supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2*. El síndrome de Li-Fraumeni: por mutaciones en *TP53* (107,109–111). Los tumores de CEO también se han clasificado como tipo I y tipo II, tomando en consideración mutaciones en genes y grado de diferenciación de las células (112). Los carcinomas de bajo grado son de tipo I y tienen baja inestabilidad cromosómica y mutaciones de los genes: *KRAS*, *BRAF* y *ERBB*. En este tipo se encuentran los carcinomas: seroso de ovario de bajo grado, endometriode de bajo grado, mucinoso y células claras. En contraste, los carcinomas de alto grado tienen pobre pronóstico, inestabilidad cromosómica y mutaciones en el gen *TP53*. En este tipo se encuentran los carcinomas serosos de ovario de alto grado y el endometriode de mediano y alto grado (113–115) (Figura 4).

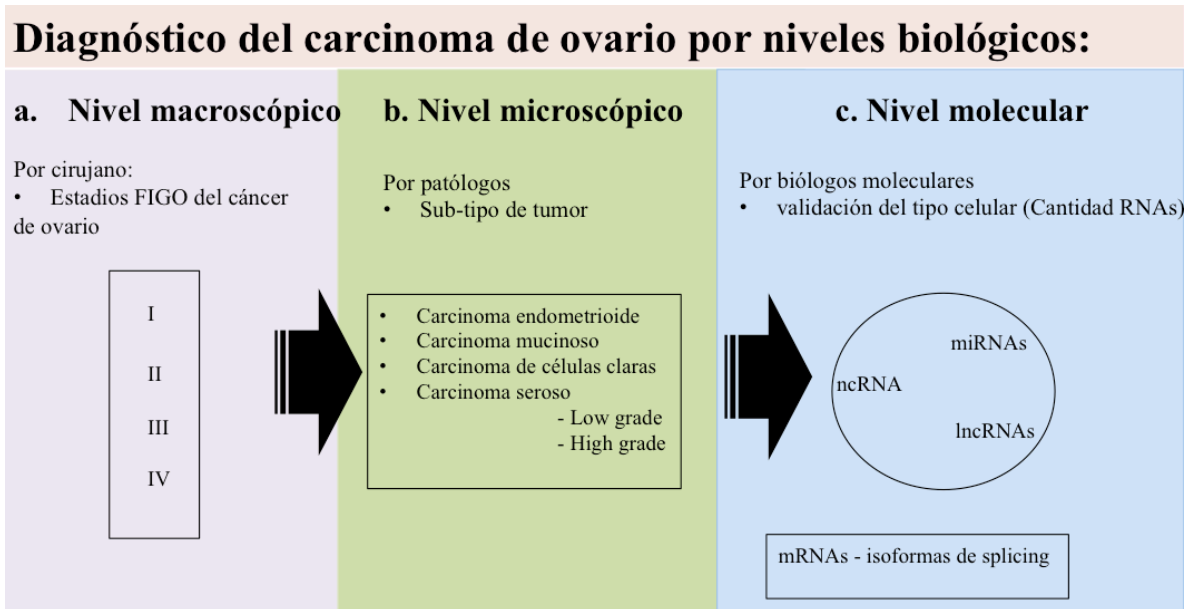


Figura 4.- Expresión de ARNs y validación en el diagnóstico del carcinoma de ovario. La expresión diferencial de los carcinomas de ovario ha sido observada en tres diferentes niveles biológicos: en la localización diferencial de las células del carcinoma (estadios de FIGO), en los diferentes sub-tipos de carcinomas de ovario y finalmente, en la expresión diferencial de ARNs.

METILACIÓN DEL ADN EN EL CARCINOMA DE OVARIO

En cáncer, se ha encontrado la hipometilación del ADN. Por un lado, el ADN está des-metilado en secuencias de elementos repetidos y en oncogenes (genes asociados al crecimiento en el número de células), por el otro lado, se ha encontrado la hipermetilación de algunos genes supresores de tumor (genes asociados a la protección ante el crecimiento en el número de células) (116). Esto se ha observado en varios tipos de cáncer, por ejemplo cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de células de la glía; a este efecto se le ha nombrado el fenotipo en metilación (117). En carcinoma de ovario, también han sido observados los cambios en la metilación del ADN, por ejemplo; la mayor parte del ADN está desmetilado y una buena parte de *loci* se encuentran metilados. Esto se ha identificado tanto en ARNs codificantes, como en ARNs no codificantes (118) Figura 5.

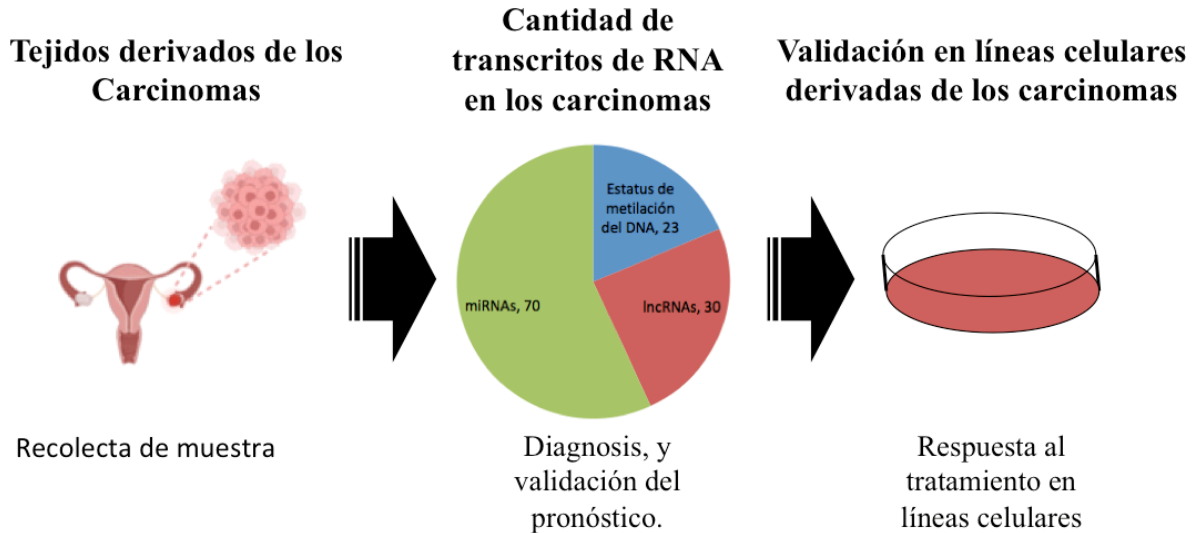


Figura 5.- Expresión de ARN, validación y respuestas al tratamiento de los carcinomas de ovario. La sobre- expresión diferencial observada en los tumores de los carcinomas de ovario y en las células derivadas de los carcinomas de ovario. La expresión derivada a los quimio-tratamientos es un carácter molecular que todavía muestra oportunidades de exploración. Los caracteres histológicos y moleculares de los carcinomas de ovario, dirigen al diagnóstico preciso, el pronóstico y a la predicción de las respuestas a tratamientos químicos por los carcinomas de ovario.

Se han realizado estudios en carcinoma de ovario que muestran el estatus de la metilación del ADN de locus (Tabla 4). Los ensayos para discriminar el estado de metilación en tumores humanos usados son: tratamiento de ADN con bisulfito de sodio y secuenciación y qRT-PCR ó MS-PCR (PCR sensible a metilación). Los genes hipermetilados en el carcinoma de ovario son: *ARH1*, *PEG3*, *BRCA1*, *CDKN2A*, *EGFL7*, *p16*, *BCL2*, *TRAIL-R2*, *P33*, *PCDH17*, *KLFII*, *TBX15*, *RASSF1A*, *MGMT*, *SALL2*, *SLIT2*, *Wnt5a* (Tabla4). Los ARNs asociados a mal pronóstico en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global son: *ER-β*, *FANCF*, *RUNX3* y *CAMK2N1* en carcinomas serosos de alto grado es *SFRP1*; en CCC son *WT1* y *WT1-AS*; en suero: *OPCML* de estadios avanzados. (122-143). Los locus donde se ha encontrado hipometilación del ADN en EOC: *BORIS/CTCF*, clusterin, *CT45*, *MSX1*, *PRAME*. En el caso de mutaciones de *BRCA1* se han asociado con la respuesta a la quimioterapia (141–146), pero la metilación del ADN de *BRCA1* ni *BRCA2* se asocian con el mal pronóstico de los pacientes (147–152). Sin embargo, *MGMT*, *OSMR*, *ESR1* y *FOXL2* se asocian al pronóstico pobre de las pacientes en todos los sub-tipos (153).

“Expresión de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

Tabla 4. Estudios de metilación del ADN en promotores de genes asociados a carcinoma de ovario.

| Metilación del gen | Número de muestras | Población de estudio | Método | Estado en cáncer | Asociado a | Valor-p | Referencia |
|---------------------------|-----------------------------------|--|--|-------------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| ARH1 PEG3 | 50 casos y 5 controles | M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. | Bisulfito de sodio y pirosecuenciación | Hipermetilado | CEO | 0.019 | (121) |
| BORIS/CTCFL | 41 casos y 3 controles | Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA | Bisulfito de sodio y pirosecuenciación | Hipometilado | CEO | <0.001 | (142) |
| BRCA1 | 36 casos y 30 controles | Shanghai Jiao Tong University, 910 Hengshan Road, Shanghai 200030, China. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | Hipermetilado | CEO estado | <0.01 <0.01 | (122) |
| CDKN2A | 95 casos y 40 controles | Faculty of Medicine, Alexandria University, Alexandria, Egypt. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | Hipermetilado | CEO | 0.003 | (119) |
| Clusterin | 275 casos y 10 controles | The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China. | Bisulfito de sodio y RT-PCR | Hipometilado | CEO | <0.05 | (143) |
| CT45 | 86 casos y 9 controles | Roswell Park Cancer Institute; Buffalo, NY USA; Department of Pathology; Roswell Park Cancer Institute; Buffalo, NY USA. | Bisulfito de sodio y pirosecuenciación | Hipometilado | CEO | <0.001 | (144) |
| OPCML | 114 casos y 80 controles in suero | Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, P.R. China. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | Hipermetilado | EOC | <0.001 | (140) |
| DAPK1 and SOX1 | 42 casos y 7 controles in suero | Sir Sundaral Hospital, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi, India. | Bisulfito de sodio y RT-PCR | Hipermetilado | CEO | <0.05 | (154) |
| EGF7 | 18 casos y 8 controles | Faculty of Medicine Ramathodi Hospital, Mahidol University, 10400, Thailand | Bisulfito de sodio y pirosecuenciación | Hipermetilado | COS | 0.001 | (123) |
| P16 | 157 casos y 26 controles | Kidwai Memorial Institute of Oncology, Bangalore, India. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | Hipermetilado | CEO | <0.05 | (124) |

“Expresión de las isoformas de DNMTs en el cáncer de ovario”

| | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------------|--|--------------------------------------|---------------|---|---|-------|
| BCI2 and TRAIL2-R2 | 27 casos y 18 controles | Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena, 190, Santa Elzebiria, Belo Horizonte, MG, Brazil. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | Hipermetilado | CEO | <0.05 | (122) |
| MSSX1 | 185 sensibles y 61 resistentes | Imperial College NHS Trust Tissue Bank, Hammersmith Hospital | Infinium HumanMethylation27 beadchip | Hipermetilado | Resistant | <0.05 | (145) |
| ER-β | 64 casos y 6 controles | ohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Setyo-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574, Japan. | Bisulfito de sodio y pirosequención | Hipermetilado | CEO | | (155) |
| | 75 casos | ludwig-Maximilians University, Campus Innenstadt, Maistrasse 11, 80337 Munich, germany. | Bisulfito de sodio y qRT-PCR | | Pobre pronóstico | =0.031 | (135) |
| PCDH17 | 51 casos y 35 controles | Charles University Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Czech. | Bisulfito de sodio y secuenciación | Hipermetilado | COSAG | | (127) |
| FANCE | 112 casos y 60 controles | Chinese PLA General Hospital, Beijing, China | Bisulfito de sodio y pirosequención | Hipermetilado | Pobre pronóstico Estado Metástasis a nodo linfático | 0.008 <0.05 <0.05 | (136) |
| TBX15 | 80 casos and 17 controles | University of Modena and Reggio Emilia, I-41124 Modena, Italy; Biopath Lab, Medical Biology and Pathology, 1006 Lausanne, Switzerland. | sodium bisulfite and pyrosequencing | Hipermetilado | EOC | | (143) |
| RASSF1A | 54 casos and 2 controles | Department of Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, South Korea. | sodium bisulfite and qRT-PCR | Hipermetilado | Ascites surface involvement bilateral microinvasion implant | 0.027 0.000 0.019 0.027 0.001 | (130) |
| RUNX3 and KAMK2N1 | 36 cases | Jena University Hospital, Bachstrasse 18 07743 Jena, Germany. | sodium bisulfite and qRT-PCR | Hipermetilado | Poor prognosis | 0.005 | (137) |
| Wnt5a | 79 casos and 30 controles | irst Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, China. | sodium bisulfite and qRT-PCR | Hipermetilado | stage lymph node metastasis | 0.018 0.024 | (134) |

La metilación heterogénea del ADN en los carcinomas de ovario, corresponde a la heterogeneidad de los carcinomas de ovario. Los patrones de metilación podría servir como bio-marcador para la clasificación del carcinoma de ovario (156), progresión (157) y respuesta a la terapia (158) (Figura 4). Además, hay estudios que han identificado metilación del ADN en genes presentes en sangre de pacientes con carcinoma de ovario (159–161). Sin embargo, hace falta más estudios que demuestren esta hipótesis. En la figura 4 se muestran los diferentes niveles biológicos donde se atiende el carcinoma de ovario y sus clasificaciones. Por otro lado, los distintos sub-tipos de carcinomas de ovario tienen un parentesco con otros tejidos cercanos al ovario. Por ejemplo: la metilación del carcinoma de ovario endometriode es similar al carcinoma de endometrio (141–144). El metiloma del ADN, extraído del epitelio de la trompa de Falopio (FTE), es más similar al carcinoma seroso de alto grado (166,167). El carcinoma mucinoso cuenta con solamente 81 genes hipometilados similares al carcinoma seroso de alto grado, sin embargo cuenta con más parentesco al carcinoma colorrectal y con el carcinoma de estómago (115,168). El carcinoma de células claras tiene más parentesco de origen con las células de la superficie del ovario sin patología y se ha caracterizado que la vía de HNF-1 está hipometilada y la vía del receptor de estrógenos alfa está hipermetilada (169). Sugiriendo que el origen de los carcinomas de ovario es diferente entre sí y los fenotipos metilados del ADN también (Figura 6).

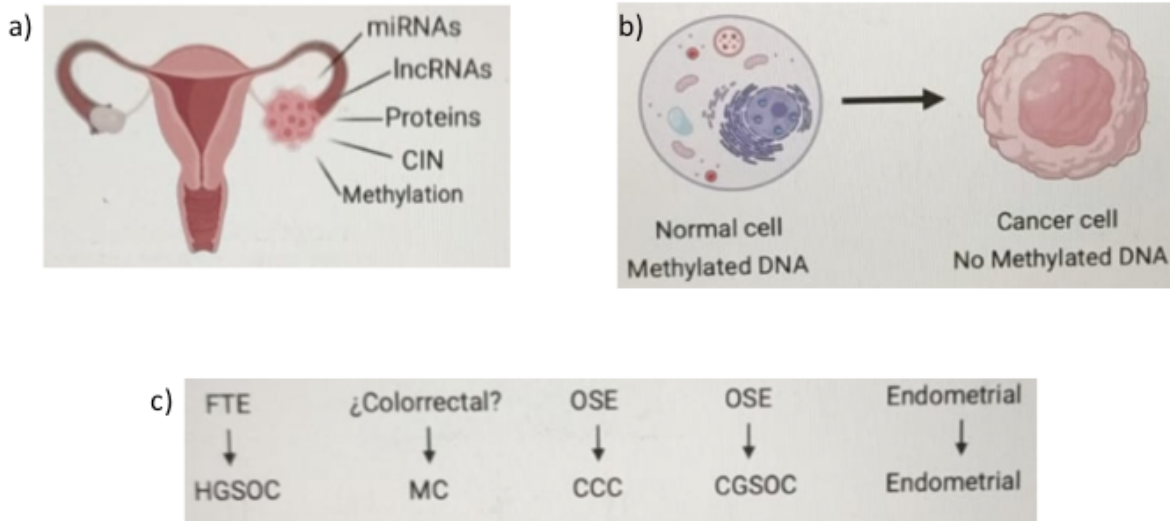


Figura 6.- - La variabilidad de la metilación del ADN en el carcinoma de ovario, corresponde a la variabilidad de los sub-tipos del carcinomas de ovario. a) El carcinoma de ovario está constituido por diferentes caracteres moleculares definidos como: inestabilidad cromosómica, transcritos de ARN (ARNm, miARNs y lncARNs), diferentes proteínas y metilación del ADN. **b)** La metilación del ADN del carcinoma de ovario es diferente entre los diferentes sub-tipos del carcinoma de ovario. Y esto sugiere que, en la historia natural del carcinoma de ovario, los cambios en la metilación del ADN son uno de los primeros pasos dentro de la transformación celular. **c)** Actualmente, gracias a las pruebas moleculares se ha validado que las células de la superficie de ovario (OSE, por sus siglas en inglés) son el tejido ancestral del carcinoma de células claras (CCC) y del carcinoma seroso de ovario de bajo grado (LGSOC, por sus siglas en inglés); Las células del epitelio de la tuba de Falopio (FTE, por sus siglas en inglés), dan origen al carcinoma seroso de ovario de alto grado (HGSOC, por sus siglas en inglés); las células endometriales son células ancestrales del carcinoma endometriode (EC, por sus siglas en inglés); y, todavía no está muy claro, aunque ya se cuenta con las mediciones de la metilación del ADN, en como el ancestro del carcinoma mucinoso podrían ser ó las células colorrectales ó las células gástricas. Con esto, sugerimos que el desarrollo de los distintos sub-tipos de los carcinomas de ovario tienen su propia historia natural, compuesta por evidencias científicas tanto celulares como moleculares. Y, los caracteres moleculares denotan tanto el diagnóstico del sub-tipo de carcinoma como su historia natural.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que las isoformas de RNAm de las DNMTs cambian su expresión a lo largo del desarrollo. También se conoce que la disminución de la metilación del ADN se asocia con inestabilidad cromosómica y que las DNMTs se sobre-expresan en cáncer humano como: el carcinoma de mama, carcinoma renal, carcinoma gástrico y carcinoma de pulmón. Sin embargo, no se ha estudiado la variabilidad de la expresión de las DNMTs en el carcinoma de ovario, y si existe una asociación con el pronóstico clínico de las pacientes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué isoforma de DNMT3B se sobre-expresa en el carcinoma de ovario?

HIPÓTESIS

La expresión diferencial de las isoformas de DNMT3B se asocian al pronóstico clínico de los pacientes con carcinoma de ovario.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el patrón de expresión de las isoformas de DNMT3B y su asociación con variables clínicas: pronóstico clínico, grado de diferenciación, estadio de la enfermedad, sub-tipo tumoral en el carcinoma de ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Colectar muestras biológicas y datos clínicos de pacientes con carcinoma de ovario (período del estudio 2011- 2017).
2. Caracterizar la expresión de las DNMTs e isoformas de DNMT3B en muestras de pacientes con carcinoma de ovario por medio de qRT-PCR.
3. Analizar la asociación entre la expresión de las DNMTs e isoformas de DNMT3B con variables clínicas del carcinoma de ovario.
4. Comprobar si la sobre-expresión de DNMT3B3 en líneas celulares de estadio avanzado del carcinoma seroso de ovario de alto grado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de tejido

Fueron recolectadas 63 muestras de tejidos frescos de carcinomas de ovario y 10 tejidos no cancerosos de ovario obtenidos por el servicio de patología en el salón trans-operatorio, del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Desde abril del 2011, hasta marzo del 2018. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 5. El protocolo fue aprobado por el INCAN en el consentimiento informado 2011 con referencia 008/004/IBI.

Tabla 5. Características clínicas de las pacientes con carcinoma de ovario colectados en este estudio.

| Variable | Categoría | n | % |
|------------------|----------------|----|------|
| Etapa clínica | I | 29 | 46.0 |
| | II | 7 | 11.0 |
| | III | 18 | 29.0 |
| | IV | 9 | 14.0 |
| Tipo histológico | Seroso | 27 | 43.0 |
| | Endometriode | 15 | 24.0 |
| | Células claras | 11 | 17.0 |
| | Mucinoso | 8 | 13.0 |
| | Otro | 2 | 3.0 |
| Grado tumoral | G1 | 18 | 29.0 |
| | G2 | 9 | 14.0 |
| | G3 | 36 | 57.0 |
| Recurrencia | SI | 10 | 16.0 |
| | No | 53 | 84.0 |
| Estatus final | Muerte | 8 | 13.0 |
| | Vivo | 55 | 87.0 |

*Grado tumoral: G1: Bajo grado; G2: Grado mediano; G3: Alto grado.

Transcripción reversa

Los ARN de las muestras de tejido fueron aisladas usando TRIzol Reagent (Ambion, USA) (cat. no. 15596018) y sintetizado el cADN complementario usando el cADN High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) (cat. no. 4368814) de acuerdo con a las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de variantes del splicing alternativo de cada isoforma de DNMTs

El ADN complementario fue sometido a una reacción de PCR cuantitativo para cada una de las DNMTs y las isoformas producto del corte y empalme alternativo de DNMT3B usando Master Mix 2X SYBR Green/ROX qPCR kit (Thermo scientific, USA) (cat. no. K0222) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario equivalente 50 ng (1 microlitro de DNA complementario tomado de una reacción de 20 microlitros donde se adicionaron 1000 ng de RNA en la PCR con transcriptasa reversa) y 0.3 μ M de cada oligonucleótido, durante 40 ciclos a temperatura de elongación de 60 °C. Las reacciones fueron hechas en QuantStudio 3 (Applied Biosystems, USA). Fue usado el gen de GAPDH para normalizar las reacciones de cada uno de los tumores con los ovarios no cancerosos. La expresión de los genes de interés fue reportada por Liu y colaboradores en 2017 (102) y se enlistan en la tabla 6. La eficiencia de amplificación fue calculada antes de ser utilizados (cercano al 100%) y los valores de expresión fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (170).

Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este estudio.

| Gen | Oligonucleótidos sentido | Oligonucleótidos antisentido |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| DNMT1 | AACCTTCACCTAGCCCCAG | CTCATCCGATTTGGCTCTTTCA |
| DNMT3A | GACAAGAATGCCACCAAAGC | CCATCTCCGAACCACATGAC |
| DNMT3B | CCATCAAAGTTTCTGCTGCT | GAAGAGGTGTCGGATGACAG |
| DNMT3B3 | CCGGGATGAACAGGATCTTT | AGTAGTCCTTCAGAGGGGCG |
| DNMT3B4 | CGGTTCTGGAGTGTAAATCC | GGTATTGTCTGTACTTTCTTTAACTGTT |
| DNMT3B5 | AATACAATAGGATAGCCAAGGATCT | TTCAGAGGGGCGAAGAGG |
| DNMT3B6 | CCAAGCTTGAAAGCATGAA | CCGTTGACGAGGATCGAGT |
| DNMT3B7 | CAGTCTAATTACCTTTCACAGAGAACA | GCTTTGAGGCGCTTGGGT |
| DNMT3B3D5 | GAAAGCCCAGCTTCCCTGAGA | AGTTGTGCTCTGTGTGCTGTGT |
| GAPDH | TCGTTCCCAAAGTCTCTGTTC | TCCGAGCCGCTGGTTC |

Validación de expresión de ARN mensajeros usando “TissueScan Ovarian cancer II y III”

La prueba de validación fue usando dos placas de ADN complementario precargadas con carcinomas de ovario (Tissue Scan Ovarian Cancer c arrays II y III) (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) (cat no. HORT102 y HORT103) (n=82). Las placas fueron preparadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Líneas celulares de carcinoma de ovario

Las líneas celulares SKOV3 y OVCAR3 son de la compañía ATCC. Tanto OVCAR3 como SKOV3 son células derivadas del líquido de ascitis en pacientes en estadio 3 del carcinoma de ovario de alto grado. Ambas, tienen *TP53* mutado en e inestabilidad cromosómica. SKOV3 son células de epitelio simple y OVCAR3 son células de epitelio glandular. SKOV3 es más agresiva que OVCAR3 (mayor crecimiento celular, menor muerte celular, mayor inestabilidad cromosómica y mayor migración celular). OVCAR3 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (cat. No. 11875) suplementado con 20% de suero bovino fetal. La línea celular SKOV3 fue cultivada en medio McCoy (ATCC, MNZ, VA, USA) (cat. No. 30-2007) suplementado con 10% de suero bovino fetal. Ambas líneas celulares fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Transfección de DNMT3B3 en las células OVCAR3

Se hizo una transfección transitoria del plásmido pcDNA/Myc_DNMT3B3 (Addgene, MA, USA) (plásmido: 37546) y la condición de vector vacío pcDNA (171), en la línea celular OVCAR3. Se usó lipofectamina 3000 (Invitrogen/Termofisher, Waltham, MA, USA) (no. Cat. L3000-015) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron crecidas durante dos días antes de la transfección, hasta alcanzar el 70% de la confluencia en la caja de cultivo. Ningún tipo de selección fue aplicada durante el cultivo. Las transfecciones fueron

repetidas en diferentes momentos, e independientes cada una de ellas. La sobre-expresión de DNMT3B3 fue verificada por qRT-PCR.

Conteo de metafases

Primero, las células OVCAR3 fueron crecidas en placas de cultivo de 6 pozos (Corning Inc, NY, USA) (no. Cat. 3513). Posteriormente, se hizo la transfección y las células fueron tratadas para el conteo de metafases. Las células fueron tratadas durante 30 minutos con 90 ng/mL de colcemida. (KaryoMAX GIBCO, USA) (no. Cat. 15210-040) para inducir el arresto en metafase, e incubadas durante 30 minutos a 37 °C en solución hipotónica (75mM de KCl). Por último, las células fueron fijadas en 3:1 metanol: ácido acético, hechos por la técnica de las bandas GTG (bandas G usando tripsina y Giemsa). Se contaron un total de 30 metafases y fueron analizados a un nivel de 400-500 resolución de bandeado. Un citogenetista certificado evaluó las metafases duplicadas en cada condición.

Ensayo de inmunoprecipitación de 5´metil citosina (meDIP)

El ensayo de meDIP fue realizado usando el kit meDIP (Diagenode, MagMeDIP qPCR Kit, BE-WLG, and NJ, USA) (cat. no. C02010014) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células OVCAR3 fueron cultivadas en placas de 6 pozos (Corning Inc., USA) (cat. no. 3513). Posteriormente 1×10^6 células fueron transfectadas y, se realizó la inmunoprecipitación de DNA metilado. En el análisis se utilizó la eficiencia de amplificación $Ct_{10\% \text{ Input}}$ para obtener el % de recuperación = $2^{((Ct_{\text{input}} 10\% - 3.32) - (Ct_{\text{IP sample}}))} \times 100$. Las reacciones fueron realizadas por triplicado en una placa de 96 pozos (Applied Biosystems, USA) (cat. no. 4346907). Los oligo- nucleótidos para identificar a satélite 2 del cromosoma 1 en la región pericentromérica (Abcam, ab85781) fueron: 5´-ATCGA ATGGAATGAAAGGAGTCA-3´ (forward) and 5´-GACCATTGGATGATTGCAGTCA-3´ (reverse).

Análisis estadísticos

La expresión relativa de cada DNMT e isoformas de DNMT3B fue obtenida usando la ecuación de $2^{\Delta\Delta Ct}$ que posteriormente fue transformada en $\log_{10}+1$ y se muestra como resultado. Se usó la prueba de comparación de medias en muestras, no paramétricas: Mann-U Whitney, porque la distribución de los datos no era normal. En el programa Prisma 8 para Mac. Los resultados de los niveles de expresión de DNMTs e isoformas de DNMT3B se mostraron usando el gráfico de Tukey (promedio y 1ª desviación estándar dentro en los bigotes). Los resultados fueron considerados significativamente diferentes con una $p < 0.05$. Los análisis de curva ROC y Kaplan–Meyer fueron calculados en el programa SPSS 21 para Mac, y consideramos estadísticamente significativo con un área bajo la curva mayor al 50% para cada expresión de isoforma en supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia general (SG). En Kaplan Meyer, se usaron los datos de fecha en SLE: a partir de la cirugía hasta la recurrencia; y en SG: hasta la muerte. Consideramos significativamente diferentes con una $p < 0.05$ en la prueba de *log rank*.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS METIL-TRANSFERASAS DE ADN EN EL CARCINOMA DE OVARIO

Por un lado, lo primero que hicimos fue analizar la expresión de todas las isoformas de RNA de las DNMTs en 63 muestras tumores frescos de carcinoma de ovario, utilizamos 10 ovarios sin cáncer como la expresión basal de cada una de las isoformas. Se analizó la asociación de la expresión de las DNMTs con los estadios de diferenciación de los tumores del carcinoma de ovario. Se comparó la expresión de los tumores de grado bajo (carcinoma endometriode de grado bajo, carcinoma mucinoso y carcinomas seroso de grado bajo) vs los tumores de grado alto (grados mediano y alto de carcinoma endometriode, carcinoma de células claras, carcinoma seroso de alto grado y carcinomas mixtos de ovario) (Figura 7).

De manera general en la expresión de las DNMTs se encontró que los carcinomas de alto grado de diferenciación tiene diferencias significativas en la sobre-expresión de DNMT3B ($p= 0.0043$), En contraste a las isoformas que no tienen diferencias significativas en la expresión de DNMT1 ($p= 0.0325$) ni DNMT3A ($p= 0.0556$) porque se mantienen constantes (Figura 7a,b,c); posteriormente, analizamos la expresión de las isoformas de DNMT3B y encontramos diferencias significativas en orden de mayor sobre-expresión a menor sobre-expresión: en primer lugar se encuentra a DNMT3B3 ($p= 0.0009$), en segundo lugar se encuentra a DNMT3B3 Δ 5 ($p= 0.0019$), en tercer lugar se encuentra a DNMT3B5 ($p= 0.0039$) y en cuarto lugar se encuentra a DNMT3B6 ($p= 0.0143$) (Figura 7d,f,g,i), en contraste a DNMT3B4 ($p= 0.5537$) y DNMT3B7 ($p= 0.0830$) (Figura 7e,h); DNMT3B4 y 3B7 que son las isoformas de DNMT3B que no tienen dominio catalítico, ni muestran cambio significativo en los carcinomas de alto grado de diferenciación. Este resultado nos sugiere que la cantidad de DNMT3B3 que expresan las células de los tumores de grado alto del carcinoma de ovario es mayor que la que expresan las células de los tumores de grado bajo.

Grados de diferenciación del carcinoma de ovario

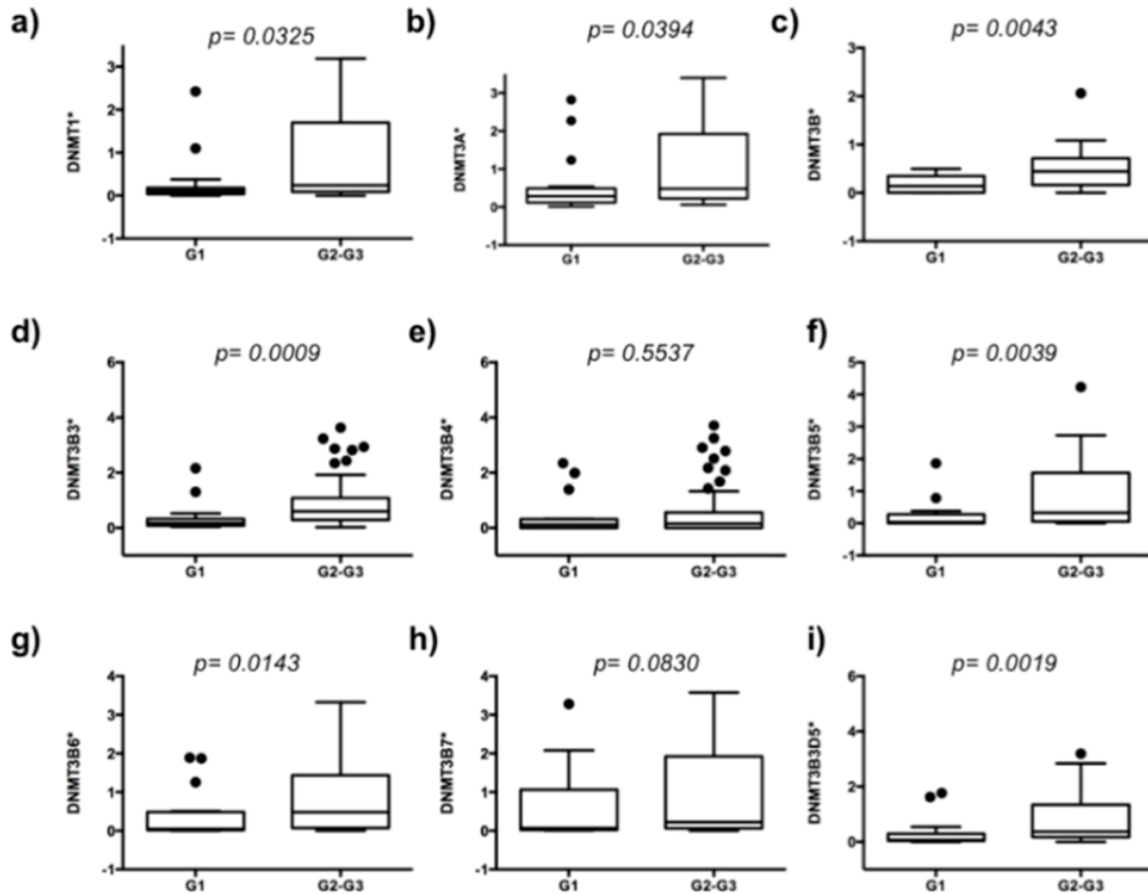


Figura 7. Las isoformas: DNMT1, 3A, 3B3, 3B5, 3B6, 3B3Δ5 se sobre-expresan en los grados de diferenciación altos del carcinoma de ovario. La expresión de las DNMTs en los carcinomas de bajo grado ($n=13$), versus los carcinomas de alto grado ($n=50$). **a)** DNMT1 **b)** DNMT3A **c)** DNMT3B **d)** DNMT3B3 **e)** DNMT3B4 **f)** DNMT3B5 **g)** DNMT3B6 **h)** DNMT3B7 **i)** DNMT3B3Δ5. Los ensayos fueron normalizados con la expresión de GAPDH en cada uno de los casos y se usaron 10 ovarios sin cáncer para obtener la expresión basal. La prueba estadística de comparación de muestras: *Mann U- Witney* fue usada. *los datos se muestran usando $1+\log_{10}$.

Por el otro lado, lo segundo que hicimos fue analizar la asociación de la expresión de todas las DNMTs con los estadios FIGO de los tumores del carcinoma de ovario. Nosotros comparamos la expresión de los tumores de estadios tempranos (estadios I y II) vs estadios avanzados (estadios III y IV) (Figura 8). De manera general en la expresión de las DNMTs, no se encontraron diferencias significativas en los estadios avanzados de los tumores de carcinoma de ovario (Figura 8a,b,c): DNMT3B ($p= 0.0889$), DNMT1 ($p= 0.0861$) y DNMT3A ($p= 0.0556$);

posteriormente, analizamos la expresión de las isoformas de DNMT3B y encontramos diferencias significativas en orden de mayor sobre-expresión a menor sobre-expresión: en primer lugar se encuentra a DNMT3B3 ($p= 0.0022$), en segundo lugar se encuentra a DNMT3B3 Δ 5 ($p= 0.0042$), en tercer lugar se encuentra a DNMT3B5 ($p= 0.0235$), cuarto lugar se encuentra a DNMT3B6 ($p= 0.0250$) y en quinto lugar se encuentra a DNMT3B7 ($p= 0.0471$) (Figura 8d,f,g,h,i). En contraste a DNMT3B4 ($p= 0.6782$) que no tiene dominio catalítico ni muestran cambio significativo (Figura 8e). Este resultado nos sugiere que la cantidad de DNMT3B3 que expresan las células de los tumores de estadios III y IV es mayor que la que expresan las células de los estadios I y II. En conjunto el patrón de expresión de DNMT3B3 podría estar sugiriendo que las células de los tumores de ovario de grado alto de diferenciación en estados avanzados son los que sobre-expresan a DNMT3B3.

Estadios de FIGO en carcinoma de ovario

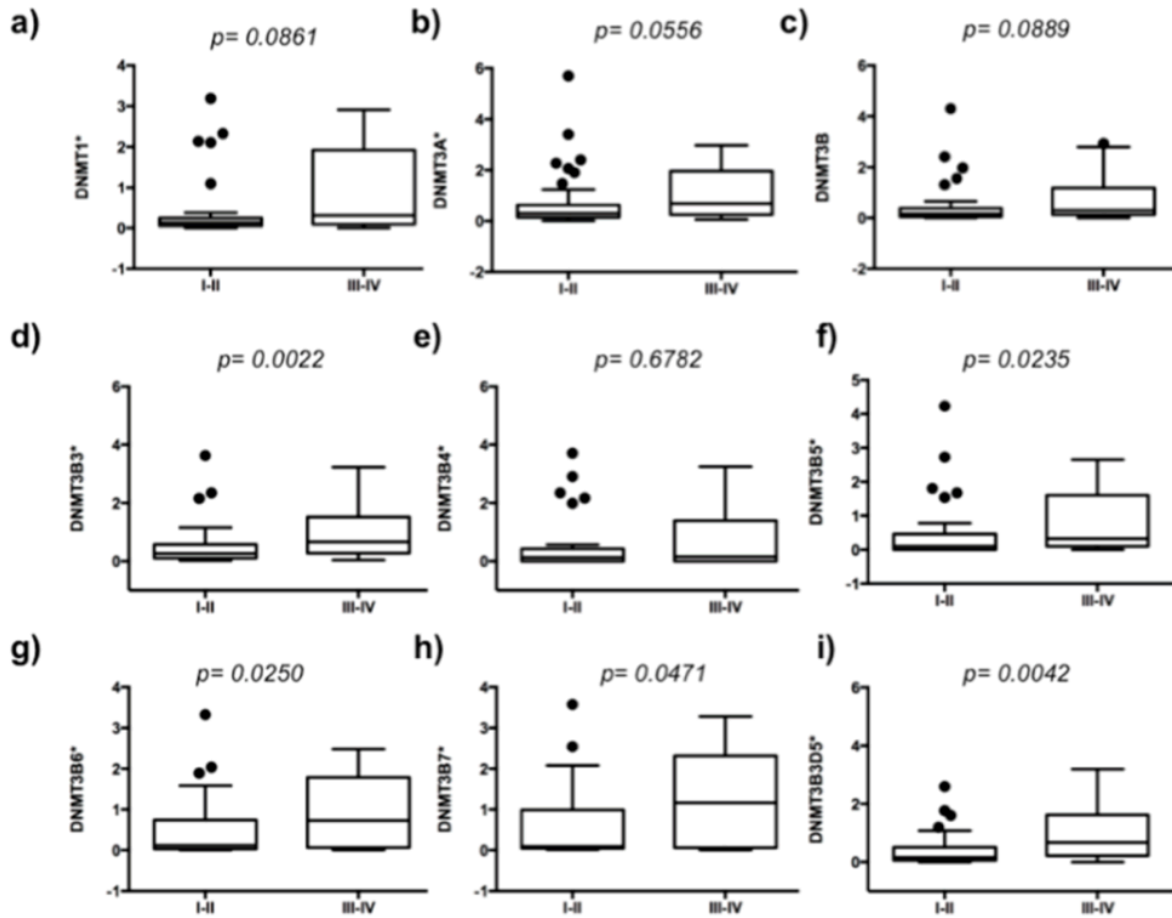


Figura 8. Las isoformas: DNMT3B3, 3B5, 3B6, 3B7 y 3B3Δ5 se sobre-expresan en los estadios avanzados del carcinoma de ovario. La expresión de las isoformas en estadios I y II (estados tempranos) ($n=36$) versus III y IV (estados avanzados) ($n=27$). a) DNMT1, b) DNMT3A, c) DNMT3B, d) DNMT3B3, e) DNMT3B4, f) DNMT3B5, g) DNMT3B6, h) DNMT3B7 y i) DNMT3B3Δ5. Los ensayos fueron normalizados con la expresión de GAPDH en cada uno de los casos y se usaron 10 ovarios sin cáncer para obtener la expresión basal. La prueba estadística de comparación de muestras: *Mann U- Witney* fue usada. *los datos se muestran usando $1+\log_{10}$.

*LA SOBRE-EXPRESIÓN DE DNMT3B3 SE ASOCIA CON PEOR PRONÓSTICO
DE LAS PACIENTES CON SEROSO DEL CARCINOMA DE OVARIO*

Los tumores serosos de ovario de grado alto de diferenciación son los subtipos tumorales con peor pronóstico en las pacientes de carcinoma de ovario. Así que, nos preguntamos si la expresión de las isoformas de DNMT3B (isoforma tipo) y la isoforma DNMT3B3 tienen importancia en el pronóstico de la recurrencia y la muerte de las pacientes. Primero se hizo la curva ROC para saber el valor a partir del cual consideramos la sobre-expresión. Encontramos que DNMT3B3 tiene un punto de corte en 3.29 unidades de la expresión relativa al ovario sin cancer: con un área bajo la curva del 72%, una sensibilidad del 87% y una especificidad del 71%. Sin embargo, DNMT3B no tuvo áreas bajo la curva mayores al 50% en los desenlaces de recurrencia ni muerte. Posteriormente, probamos el valor pronóstico de la sobre-expresión de DNMT3B3. Hicimos un análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer (Figura 9 y 10). En carcinoma de ovario la sobre-expresión de DNMT3B se asoció con menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) ($p= 0.0043$) (Figura 9a), pero no se asoció con supervivencia global (SG) ($p= 0.182$) (Figura 9c) y la sobre- expresión de DNMT3B3 se asoció con menor SLE ($p= 0.002$) y menor SG ($p= 0.017$) en carcinoma de ovario (Figura 9b,d). Por otro lado, específicamente en carcinoma seroso de ovario, la sobre-expresión de DNMT3B1 se asoció con menor SLE ($p=0.005$), pero no con SG ($p= 0.136$) (Figura 10a,c). Interesantemente, en el carcinoma seroso de ovario la sobre-expresión de DNMT3B3 se asoció con menor SLE ($p= 0.017$) y menor SG ($p= 0.038$) (Figura 10b,d) DNMT3B3 muestra diferencias significativas en muerte en todos los tumores del carcinoma de ovario y en los subtipos serosos (curva ROC y análisis de supervivencia) (Tablas 7 y 8). Así que, estos resultados sugieren que se podría diferenciar a los subtipos serosos del carcinoma de ovario con la sobre-expresión de la isoforma DNMT3B3 y podría ser un biomarcador de las pacientes con carcinoma de ovario.

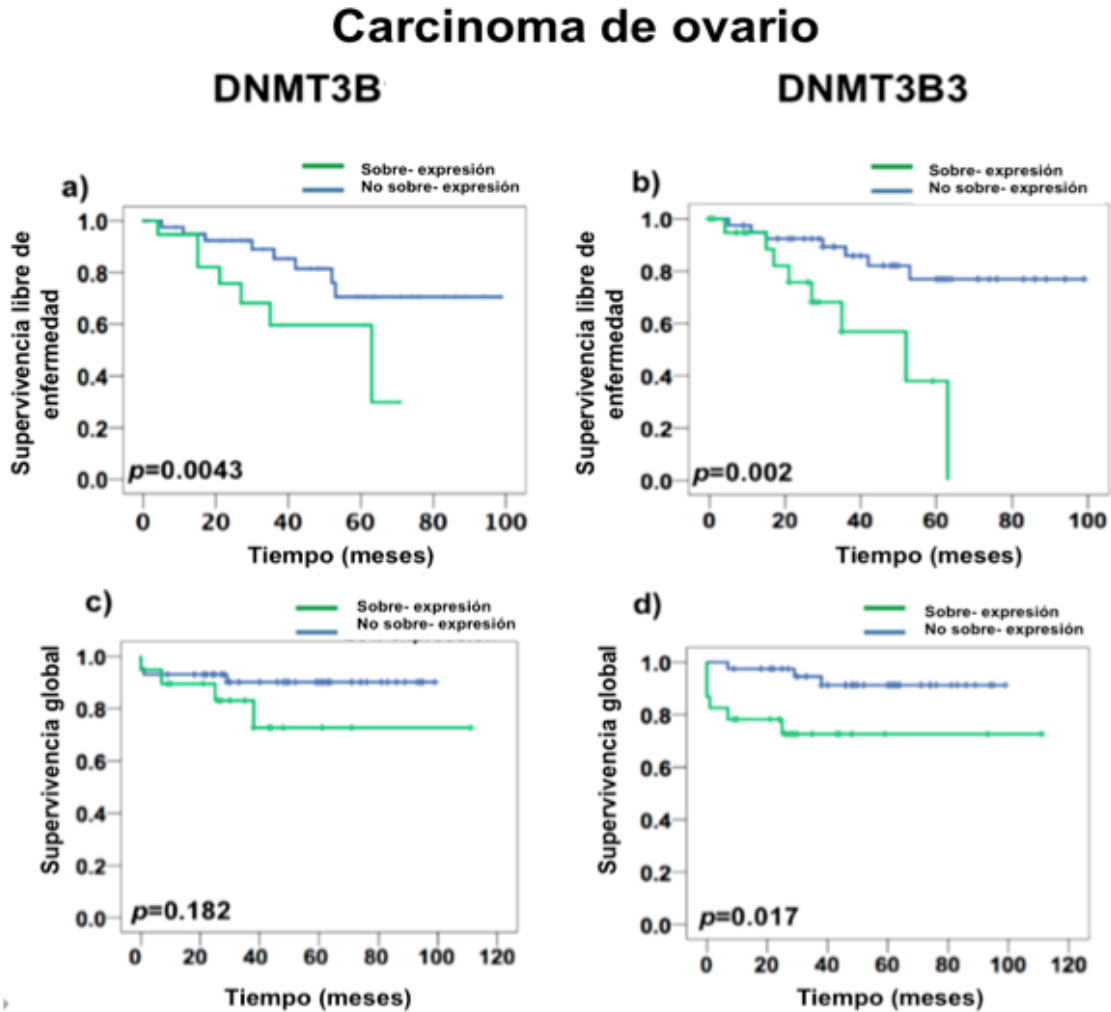


Figure 9. La sobre- expresión de DNMT3B3 se asocia con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en el análisis de Kaplan- Meyer en carcinoma de ovario. Análisis de supervivencia de Kaplan –Meyer en carcinoma de ovario para la expresión de DNMT3B1 con **a)** SLE y **c)** SG. DNMT3B3 **b)** SLE y **d)** SG. Fue usada la prueba de *Log Rank* para calcular las diferencias significativas entre los sub- grupos de sobre- expresión ($n= 46$) y no sobre-expresión ($n= 23$).

Tabla 7. Resultado de las asociaciones de: la expresión de las isoformas de DNMT3B con los análisis de supervivencia del carcinoma de ovario.

| | 3B | 3B3 |
|-----|-------------|------------|
| SLE | $p= 0.0043$ | $p=0.002$ |
| SG | $p= 0.182$ | $p= 0.017$ |

SLE= supervivencia libre de enfermedad. SG supervivencia global.

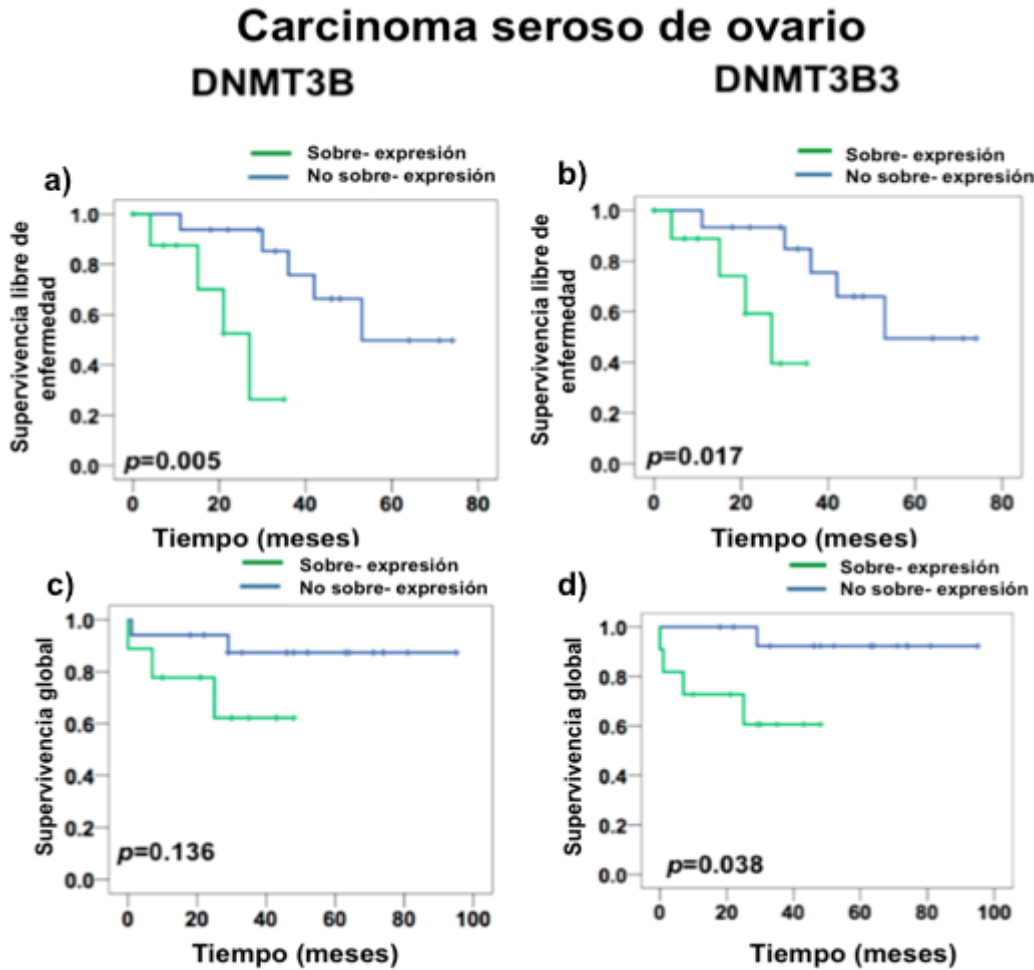


Figura 12. La sobre-expresión de DNMT3B3 se asocia con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en el análisis de Kaplan-Meier en carcinoma seroso de ovario. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en carcinoma de ovario para la expresión de DNMT3B1 con a) SLE y c) SG. DNMT3B3 b) SLE y d) SG. Fue usada la prueba de *Log Rank* para calcular las diferencias significativas entre los sub- grupos de sobre- expresión ($n= 16$) y no sobre-expresión ($n= 11$).

Tabla 8. Resultado de las asociaciones de: la expresión de las isoformas de DNMT3B con los análisis de supervivencia del carcinoma seroso de ovario de alto grado.

| | 3B1 | 3B3 |
|-----|------------|------------|
| SLE | $p= 0.005$ | $p=0.017$ |
| SG | $p= 0.136$ | $p= 0.038$ |

SLE= supervivencia libre de enfermedad. SG supervivencia global.

DNMT3B1 Y DNMT3B3 SE SOBRE-EXPRESAN EN LOS CARCINOMAS SEROSOS DE ALTO GRADO EN ESTADÍOS AVANZADOS.

Debido a que los subtipos histológicos de los carcinomas serosos de alto grado se encontraba sobre-representada con respecto a los otros subtipos histológicos (carcinoma seroso de bajo grado, carcinoma mucinoso, carcinoma endometriode y carcinoma de células claras) nos preguntamos si la expresión de DNMT1, 3A, 3B y las isoformas de DNMT3B: DNMT3B3, 3B4, 3B5, 3B6, 3B7 ó 3B3Δ5 se asocian con los tumores .

Como esperábamos, la expresión de DNMT3B1 y DNMT3B3 de los estadios avanzados (estadios III y IV) ($n= 27$) *versus* estadios tempranos (estadios I y II) ($n= 6$) del carcinoma seroso de ovario y de alto grado de diferenciación ($n= 27$) *versus* los carcinomas serosos de ovario de bajo grado de diferenciación (LGSOC, por sus siglas en inglés) ($n= 6$) (Figure 13). Para validar si DNMT3B3 se sobre-expresa en los estadios avanzados del carcinoma de ovario seroso de alto grado (HGSOC) usamos una placa de arreglos de ADN complementario I y II de Carcinomas de ovario (TissueScan Ovarian Cancer cADN arrays II y III) (OriGen Technologies, Rockville, MD, Texas, USA) (no. cat. HORT102 y HORT103). Ambas placas tienen 14 ovarios sin cáncer y 82 muestras de carcinoma de ovario para ser analizadas (Figura 14). Con este resultado, validamos el hallazgo de que DNMT3B3 se sobre-expresa los carcinomas del subtipo I (grado bajo) y en los del subtipo II (grado alto) (Figura 15).

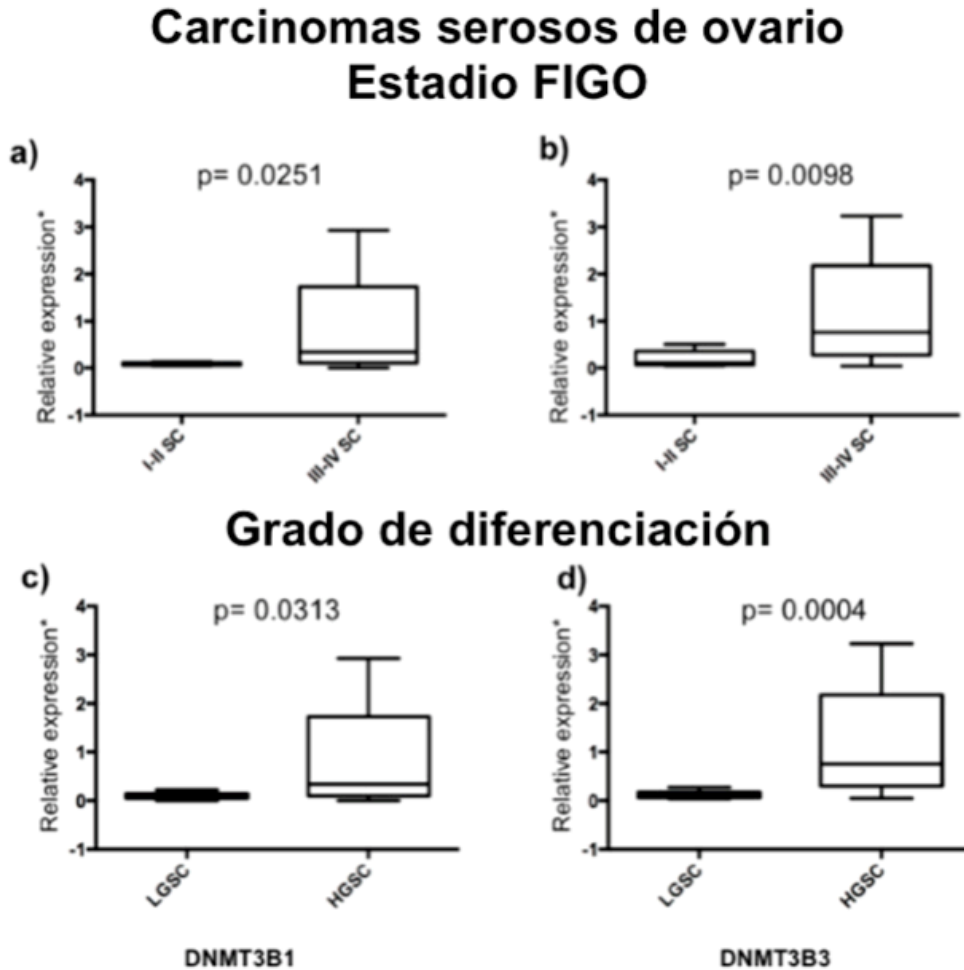


Figura 13. Las isoformas DNMT3B1 y DNMT3B3 se sobre-expresan en los estadios avanzados y los grados de diferenciación altos del carcinoma seroso de ovario. La expresión de las isoformas de DNMT3B en carcinoma seroso de ovario ($n = 27$): LGSOC (carcinoma seroso de bajo grado) ($n = 6$) versus HGSOC (carcinoma seroso de alto grado) ($n = 21$). DNMT3B1: **a)** estadio y **c)** grado y DNMT3B3 **b)** estadio y **c)** grado. Los ensayos fueron normalizados con la expresión de GAPDH en cada uno de los casos y se usaron 10 ovarios sin cáncer para obtener la expresión basal. La prueba estadística de comparación de muestras: *Mann U- Witney* fue usada. *los datos se muestran usando $1 + \log_{10}$.

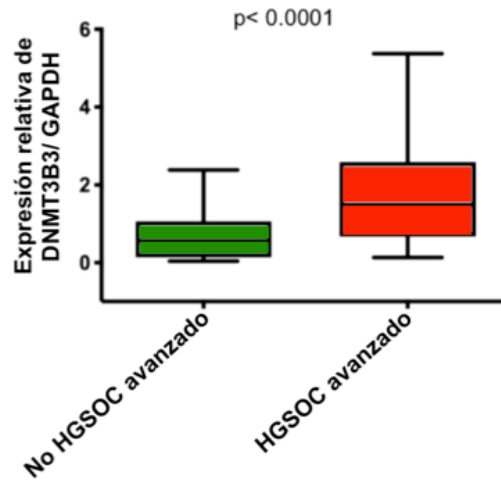


Figura 14. La sobre-expresión de DNMT3B3 validada en los estadios avanzados de alto grado de diferenciación del carcinoma seroso de ovario (HGSOC, por sus siglas en inglés). La sobre- expresión de la isoforma DNMT3B3 medida en 82 muestras de carcinoma de ovario: n= 23 de carcinomas de estadios I y II de alto grado, mucinosos, serosos de bajo grado, endometrioides de bajo grado y células claras (No HGSOC avanzado) *versus* n= 59 de carcinomas de estadios avanzados de alto grado (HGSOC avanzado.). Los ensayos fueron normalizados con la expresión de GAPDH en cada uno de los casos y se usaron 14 ovarios sin cáncer para obtener la expresión basal. La prueba estadística de comparación de muestras: *Mann U- Witney* fue usada.

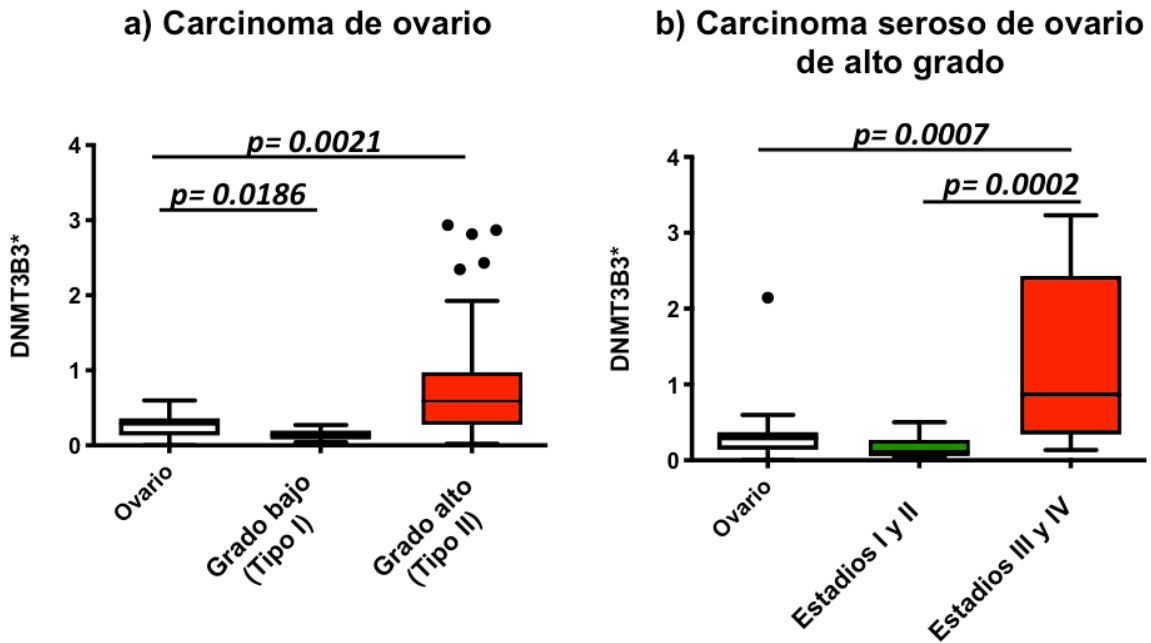


Figura 15. Validación del modelo de la sobre-expresión de DNMT3B3.

a) Se demuestra que DNMT3B3 se sobre-expresa significativamente en los carcinomas de ovario de grado alto (tipo II) y no se sobre-expresa en los carcinomas de ovario de grado bajo (tipo I).

Además, **b)** se demuestra que la DNMT3B3 se sobre-expresa en los carcinomas serosos de alto grado estadios iii-iv pero, no se sobre-expresa en los carcinomas serosos de alto grado estadios I-II. Los ensayos fueron normalizados con la expresión de GAPDH en cada uno de los casos y se usaron 14 ovarios sin cáncer para obtener la expresión basal. Se usó la prueba estadística de comparación de muestras: *Mann U- Witney*.

LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LA METIL -TRANSFERASA DE ADN 3B3 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ESTADIOS AVANZADOS DE CARCINOMA SEROSO DE ALTO GRADO CAUSA HIPOMETILACIÓN DEL ADN.

Después de observar que DNMT3B3 se expresa diferente y que esto se asocia con el pronóstico clínico, los estadios del carcinoma seroso de ovario de grado alto avanzado de las pacientes. Nos preguntamos por el estado endógeno de la expresión de DNMT3B3 y la inestabilidad cromosómica. Utilizamos dos líneas celulares de carcinoma seroso de ovario de grado alto avanzado: OVCAR3 y SKOV3. En ambas líneas celulares encontramos que el ARN mensajero de DNMT3B3 tiene un rango de variabilidad limitado por 10 unidades relativas a la expresión de la línea celular primaria de células de epitelio de ovario (OSE). OVCAR3 mostró una expresión una orden de magnitud menor (10 unidades de la expresión de OSE) de RNA mensajero de DNMT3B3 comparado con SKOV3 (Figura 16a). En la inestabilidad cromosómica encontramos que OVCAR3 (hipo-triploide de 40 a 69 cromosomas; rango: 19; moda: 56; desviación estándar: 5.3) tiene un rango de ploidía menor que SKOV3 (hipo-tetraploide de 68 a 83 cromosomas; rango: 15; moda: 81 desviación estándar: 16.247) (Figura 16b y c). De manera interesante, SKOV3 es una línea celular que tiene mayor variabilidad en la expresión del RNA mensajero de DNMT3B3 y a además una mayor variabilidad en el rango del número de ploidías. Esto podría explicar la razón de que SKOV3 es una línea celular más agresiva que OVCAR3. Por último, quisimos saber si es posible que la sobre-expresión del ARN mensajero de DNMT3B3 por transfección transitoria en las células OVCAR3 podría tener un efecto en la metilación del ADN y la inestabilidad cromosómica (172) (Figura 16). Encontramos que la sobre- expresión de DNMT3B3 causa la des-metilación del satélite 2 hasta en un 75%, pero no altera la moda de la inestabilidad cromosómica (Figura 17).

“Expresión de las isoformas de DNMTs en el carcinoma de ovario”

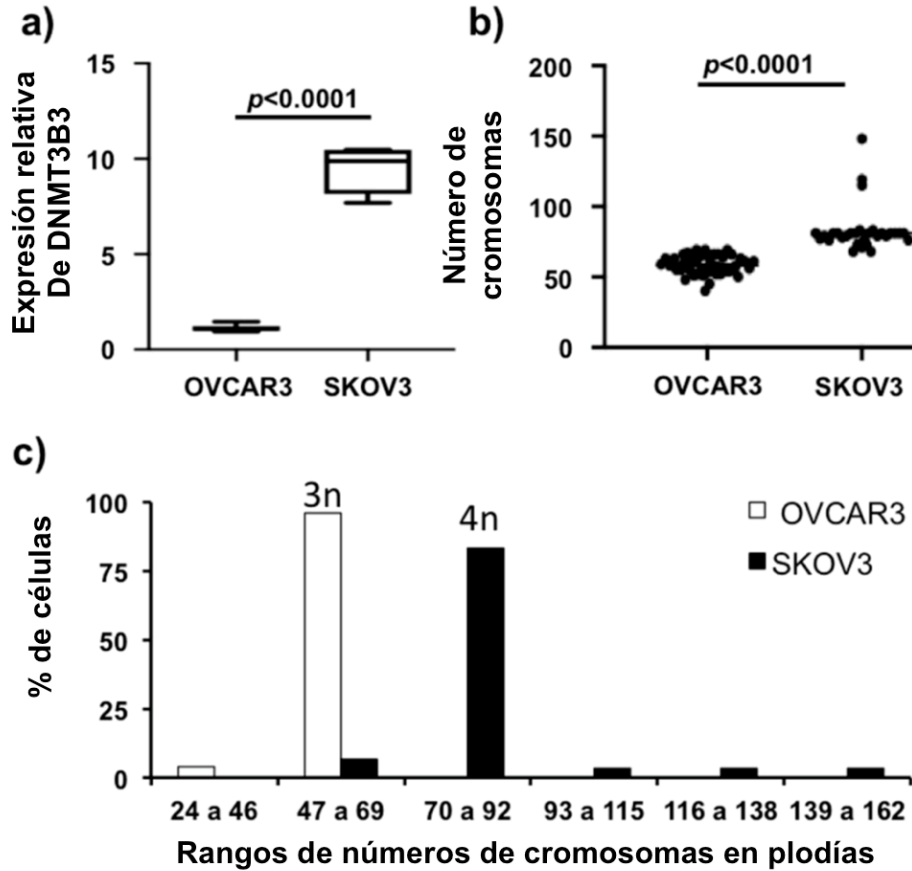


Figura 16. La expresión de DNMT3B3 muestra asociación biológica con la inestabilidad cromosómica en carcinoma de ovario. **a)** Expresión de DNMT3B3 con qRT-PCR, **b)** número de cromosomas y **c)** frecuencia de distribución del número de cromosomas de acuerdo al ranking de ploidía en células derivadas de estadios avanzados de carcinoma seroso de ovario de alto grado: OVCAR3 y SKOV3. Los ensayos de expresión fueron normalizados con GAPDH y la expresión basal usada fue con células derivadas de epitelio superficial de ovario (OSE). La prueba estadística usada fue *Mann U Whitney*.

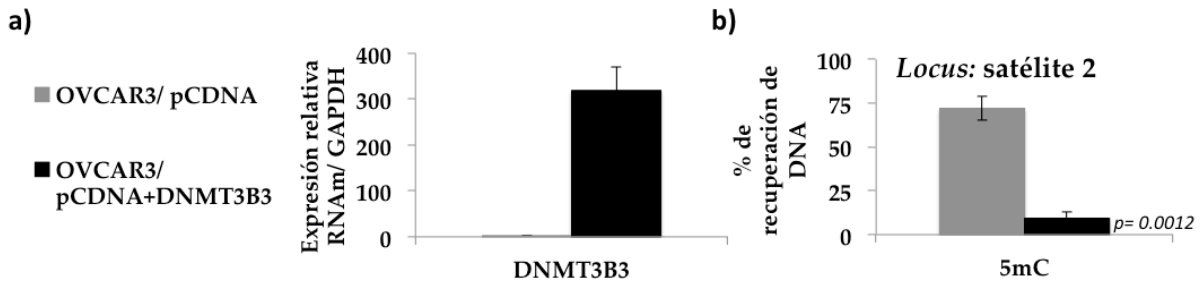


Figura 17. La sobre-expresión de DNMT3B3 causa la hipometilación del ADN del Locus: Satélite 2 en OVCAR3. **a)** Se sobre-expresó a la isoforma DNMT3B3 en OVCAR3. Se determinó qRT-PCR que 2ug de plásmido pCDNA3.1+DNMT3B3 aumenta hasta 300 veces la cantidad de DNMT3B3, comparado con 2 ug de plásmido pCDNA3.1. **b)** La inmuno-precipitación de 5´metilcitocina (5mC) fue usado para medir el estatus de metilación en el locus del satélite 2: después de la transfección de DNMT3B3, fue detectada únicamente el 15% de la metilación del ADN. La prueba estadística utilizada fue: *Mann U Whitney*.

DISCUSION

En este estudio encontramos que DNMT3B3 podría estar involucrado en el desarrollo del carcinoma de ovario y su agresividad y que las isoformas de DNMT3B podrían ser usadas como bio-marcadores pronósticos en el carcinoma de ovario.

La asociación entre metilación del ADN para la estabilidad cromosómica y regular la transcripción del ADN es conocida (107). Por su parte, la sobre- expresión de DNMTs ha sido asociada con la metilación de los genes supresores de tumor en cáncer (71,173–175). Hasta ahora, en *Homo sapiens* han sido demostradas 15 isoformas de DNMT3B, que son el producto del corte y empalme alternativo de exones (75). Se ha sugerido que la expresión de DNMT3B se asocia con la hipometilación de los genes supresores de tumor en cáncer. Además, se ha observado que la sobre-expresión en conjunto de algunas isoformas de DNMT3B, resultan en la des-metilación del ADN. (88,177,178). Nosotros sugerimos que el carácter más significativo de las isoformas de DNMT3B es la ausencia ó la parcial ausencia del dominio catalítico (Figura 18).

La sobre- expresión de DNMT3B3 y 3B3 detectada por PCR había sido reportada en líneas celulares derivadas del carcinoma de ovario (CAOV y SKOV3) (87). En este estudio, nosotros analizamos la expresión de las DNMTs en una corte de pacientes de carcinoma de ovario que incluía los subtipos histológicos más frecuentes histológicos del carcinoma de ovario. Así como pacientes en todas los estadios de del carcinoma de ovario y la mayoría con cirugía con producto de: citorreducción optima. Aunque el subtipo del carcinoma de ovario más frecuente es el seroso, nosotros encontramos resultados interesantes que involucran a todos los subtipos. Dentro de nuestros hallazgos, encontramos que la sobreexpresión de las isoformas de DNMT3B se lleva a cabo en los estadios avanzados (estadios III-IV) y en los tumores de alto grado (G2-G3).

Carcinoma de ovario seroso de alto grado

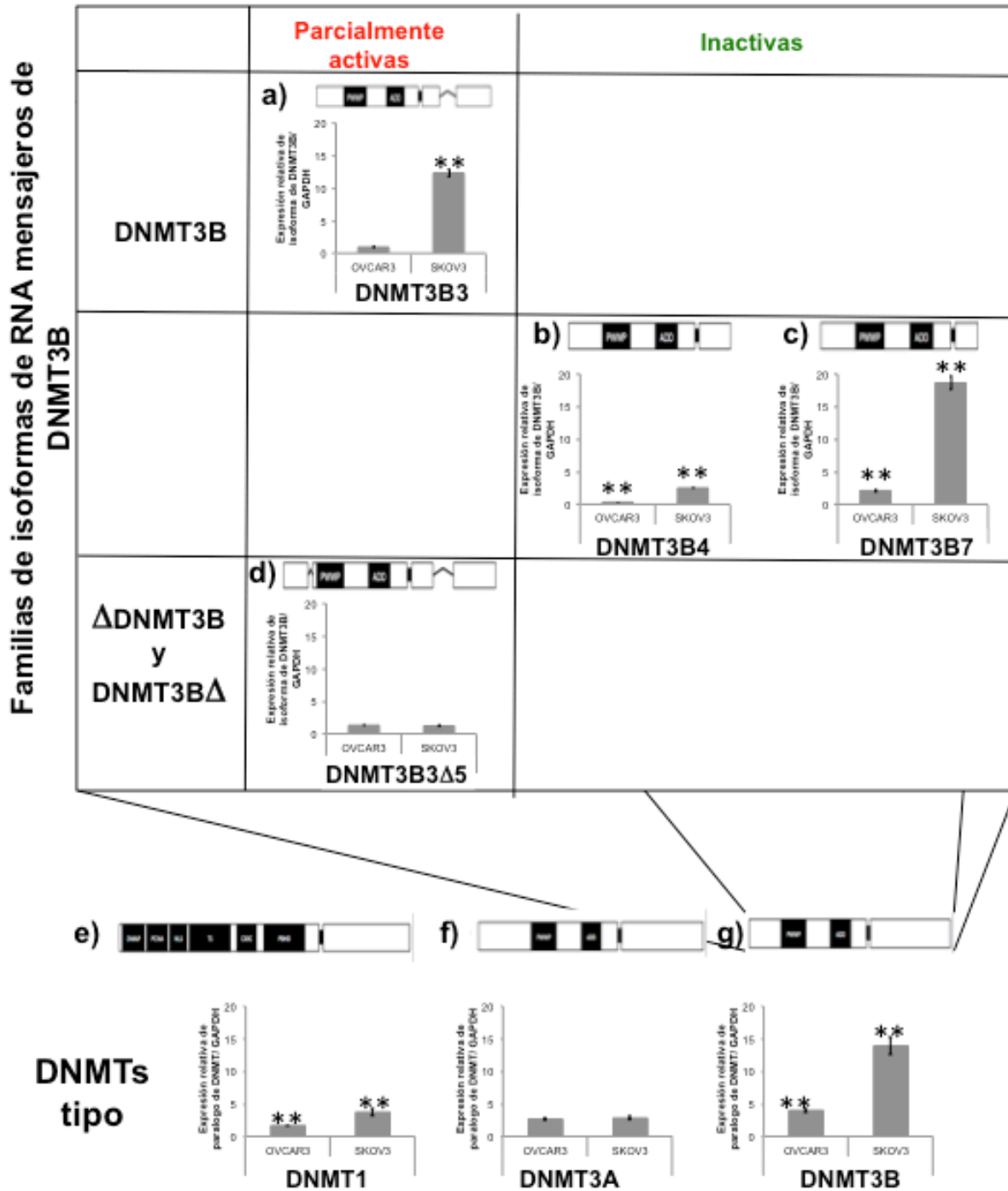


Figura 18. Modelo de la caracterización de la variabilidad de los ARN mensajeros de las Metiltransferasas de ADN en líneas celulares derivadas del subtipo de carcinoma de ovario seroso de alto grado avanzado. Se muestra la variabilidad de las mediciones de los ARN mensajeros de las DNMTs en las células derivadas del carcinoma de ovario seroso de alto grado:

“Expresión de las isoformas de DNMTs en el carcinoma de ovario”

En las líneas celulares OVCAR3 y SKOV3 se observa la variabilidad las cantidades de DNMTs con respecto a la expresión del cultivo epitelial de ovario primario (OSE):

En las isoformas de RNA mensajero producto del splicing alternativo de DNMT3B se observa que:

-Familia de isoformas DNMT3B:

-Isoformas parcialmente activas:

a) DNMT3B3 tiene 7 veces la cantidad de RNA en SKOV3 con respecto a OVCAR3.

-Isoformas inactivas:

b) DNMT3B4 tiene 10 veces la cantidad de RNA en SKOV3 con respecto a OVCAR3.

c) DNMT3B7 tiene 6 veces la cantidad de RNA en SKOV3 con respecto a OVCAR3.

Familias DNMT3B Δ y Δ DNMT3B

-Isoformas parcialmente activas:

d) DNMT3B3 Δ 5 tiene la cantidad de RNA constante en OVCAR3 y SKOV3.

En las isoformas parálogos (tipo) de RNA mensajeros se observan que hay:

e) DNMT1 duplica la cantidad de RNA en SKOV3 con respecto a OVCAR3,

f) DNMT3A permanece constante en los RNAs OVCAR3 y SKOV3,

g) DNMT3B aumenta 3 veces la cantidad de RNA en SKOV3 con respecto a OVCAR3.

El gen *DNMT3B* es un gen parálogo de las metil-transferasas de ADN en *Homo sapiens*. Su RNA mensajero tipo-completo tiene aumentada la transcripción hasta 3 veces en SKOV3 con respecto a OVCAR3. A partir del RNA mensajero de g) DNMT3B se expresan las distintas isoformas de RNAs mensajeros producto del splicing alternativo. Se encuentra la familia de isoformas con pérdidas de exón en el extremo catalítico, que son: parcialmente activas, a) DNMT3B3 que tiene aumento de 6 veces en SKOV3 con respecto a OVCAR3; y las que son inactivas b) DNMT3B4 que tiene aumento de 10 veces, y c) DNMT3B7 que tiene aumento de 6 veces en SKOV3 con respecto a OVCAR3. Y las familias de isoformas con pérdidas de exones en el extremo amino DNMT3B Δ y Δ DNMT3B: d) DNMT3B3 Δ 5 tiene constante la transcripción en SKOV3 y OVCAR3 mostrando que los RNAs mensajeros no pierden los exones 1 al 5 en el carcinoma de ovario y por lo tanto, solo se observan aumentos en la familia de isoformas de RNA mensajero de DNMT3B. Los ensayos de expresión fueron normalizados con GAPDH y la expresión basal usada fue con células derivadas de epitelio superficial de ovario (OSE). La prueba estadística usada fue *Mann U Whitney* ** $p < 0.001$

Estos resultados pueden explicarse como que la expresión de las isoformas de DNMT3B tienen un papel en la agresividad y en la progresión del carcinoma de ovario. En el sub-tipo seroso de ovario, encontramos que DNMT3B3 se sobreexpresa en los estadios avanzados y de alto grado, con valor pronóstico. Mientras que en otros sub-tipos no encontramos las diferencias significativas. Consistente con nuestros resultados, en otros trabajos, se ha encontrado la sobreexpresión de DNMT3B3 en carcinoma gástrico, líneas celulares stem cells y otras líneas celulares derivadas de ovario (89,94,95,175,179,180).

Ostler *et al.*, sugirió que los patrones anormales de metilación del ADN que estaban presentes en el cáncer podrían estar explicados por la regulación de enzimas inactivas de las DNMTs (181). En este estudio, nosotros encontramos

que la sobre-expresión de DNMT3B3 se asocia a la SLE, SG y a la progresión del carcinoma de ovario. De manera interesante, la estructura de DNMT3B3 posee los motivos metil-transferasa: I,IV, VI, IX y X, sugiriendo que tiene una actividad parcial de metil-transferasa de ADN, en contraste a DNMT3B4 que tiene una actividad ausente en presencia de ADN (101). En este sentido, se observó hipometilación del ADN en el *locus* del satélite 2 después de la sobre-expresión de DNMT3B3. Similar a este resultado, ha sido reportado que la sobre-expresión de DNMT3B4 causa hipo-metilación del locus del satélite 2 en las regiones pericentroméricas de la línea celular 293 (99). Además, también ha sido propuesto que las isoformas de DNMT3B compiten una con la otra por el ADN. Por ejemplo; DNMT3B3 y DNMT3B4 en células de cáncer (182). Es por esto por lo que posiblemente, la isoforma DNMT3B3, que tiene un sitio parcial de metilación del ADN es la isoforma que se transcribe en el carcinoma de ovario. Y, de manera antagónica, la isoforma DNMT3B3 Δ 5 es la isoforma que tiene menor cambio en su uso de la transcripción después de la transformación celular. O sea, que DNMT3B3 Δ 5 sería el transcrito de la isoforma que se mantiene constante ante los cambios del núcleo celular en el desarrollo del carcinoma de ovario.

CONCLUSIÓN

En conclusión, la expresión de los ARN mensajeros de las isoformas de DNMT en el carcinoma de ovario es diferencial en relación a estadios tempranos vs estadios avanzados. Nuestros resultados sugieren que en los estadios FIGO, la expresión de cada una de las isoformas de DNMTs son dirigidas al aumento, a través del desarrollo del carcinoma de ovario. Finalmente, DNMT3B3 es la isoforma que hace los cambios más sensibles en su expresión. Con esto, sugerimos que DNMT3B3 podría ser usado como un biomarcador de pronóstico de las pacientes con carcinoma de ovario.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró la variabilidad de las isoformas de ARN mensajeros que se producen en el *locus* de DNMT3B en los estadios avanzados del carcinoma seroso de ovario de alto grado. Y, se sabe que este tipo de tumores tienen mayor inestabilidad cromosómica, mayor resistencia al tratamiento, mutación en p53, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general menor a la de las pacientes con carcinomas de bajo grado. En los siguientes trabajos, Se dirigirá la exploración de las observaciones hacia un siguiente nivel biológico: la metilación del ADN en el contexto de la inestabilidad cromosómica y los cambios en la expresión de *loci* específicos de los núcleos en las células. El efecto en la variabilidad de los ARN mensajeros de los tumores con inestabilidad cromosómica en las pacientes y el desarrollo diferencial de los ARN mensajeros de los tumores con inestabilidad cromosómica e hipometilación del ADN en la carcinogénesis.

REFERENCIAS

1. Luo GZ, Blanco MA, Greer EL, He C, Shi Y. DNA N6-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. diciembre de 2015;16(12):705-10.
2. Bheemanaik S, Reddy YVR, Rao DN. Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochemical Journal*. 15 de octubre de 2006;399(2):177-90.
3. Ratel D, Ravanat JL, Berger F, Wion D. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *BioEssays*. marzo de 2006;28(3):309-15.
4. Charostad J, Astani A, Goudarzi H, Faghihloo E. DNA methyltransferases in virus-associated cancers. *Rev Med Virol*. marzo de 2019;29(2):e2022.
5. Del Castillo Falconi VM, Torres-Arciga K, Matus-Ortega G, Díaz-Chávez J, Herrera LA. DNA Methyltransferases: From Evolution to Clinical Applications. *IJMS*. 12 de agosto de 2022;23(16):8994.
6. Firmino J, Carballo C, Armesto P, Campinho MA, Power DM, Manchado M. Phylogeny, expression patterns and regulation of DNA Methyltransferases in early development of the flatfish, *Solea senegalensis*. *BMC Developmental Biology* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 11 de marzo de 2019];17(1). Disponible en: <http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12861-017-0154-0>
7. Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, Koo HC, Kiger J, Shen CKJ. Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 de octubre de 1999;96(21):11940-5.
8. Capuano F, Mülleder M, Kok R, Blom HJ, Ralser M. Cytosine DNA Methylation Is Found in *Drosophila melanogaster* but Absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and Other Yeast Species. *Analytical Chemistry*. 15 de abril de 2014;86(8):3697-702.
9. Wang X, Bhandari RK. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming of medaka embryo. *Epigenetics*. 3 de junio de 2019;14(6):611-22.
10. Timothy fi Bestor. DNA methyltransferases. *Curr Op Cell Biol*. 1994;6:380-9.
11. Ponger L, Li WH. Evolutionary Diversification of DNA Methyltransferases in Eukaryotic Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. abril de 2005;22(4):1119-28.
12. Rana AK, Ankri S. Reviving the RNA World: An Insight into the Appearance of RNA Methyltransferases. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 6 de junio de 2016 [citado 11 de marzo de 2019];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fgene.2016.00099/abstract>
13. Que Q, Zhang Y, Nelson M, Ropp S, Burbank DE, Van Etten JL. Chlorella virus SC-1A encodes at least five functional and one nonfunctional DNA methyltransferases. *Gene*. mayo de 1997;190(2):237-44.
14. Decewicz P, Radlinska M, Dziejewit L. Characterization of Sinorhizobium sp. LM21 Prophages and Virus-Encoded DNA Methyltransferases in the Light of Comparative Genomic Analyses of the Sinorhizobial Virome. *Viruses*. 26 de junio de 2017;9(7):161.
15. Zeng C, Wu A, Wang Y, Xu S, Tang Y, Jin X, et al. Identification and Characterization of a Ribose 2'-O-Methyltransferase Encoded by the Ronivirus Branch of Nidovirales. Perlman S, editor. *Journal of Virology*. 1 de agosto de

2016;90(15):6675-85.

16. Case JB, Ashbrook AW, Dermody TS, Denison MR. Mutagenesis of S-Adenosyl-l-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7-Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity. Perlman S, editor. *Journal of Virology*. 15 de agosto de 2016;90(16):7248-56.

17. Martin B, Coutard B, Guez T, Paesen GC, Canard B, Debart F, et al. The methyltransferase domain of the Sudan ebolavirus L protein specifically targets internal adenosines of RNA substrates, in addition to the cap structure. *Nucleic Acids Research*. 6 de septiembre de 2018;46(15):7902-12.

18. Li H, Yang F, Gao B, Yu Z, Liu X, Xie F, et al. Hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma tissues upregulates expression of DNA methyltransferases. :11.

19. Paziienza V, Panebianco C, Andriulli A. Hepatitis viruses exploitation of host DNA methyltransferases functions. *Clinical and Experimental Medicine*. agosto de 2016;16(3):265-72.

20. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, et al. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Science*. enero de 2003;94(1):76-80.

21. Shamay M, Krithivas A, Zhang J, Hayward SD. Recruitment of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 de septiembre de 2006;103(39):14554-9.

22. Forde BM, Phan MD, Gawthorne JA, Ashcroft MM, Stanton-Cook M, Sarkar S, et al. Lineage-Specific Methyltransferases Define the Methylome of the Globally Disseminated Escherichia coli ST131 Clone. Sperandio V, editor. *mBio [Internet]*. 17 de noviembre de 2015 [citado 11 de marzo de 2019];6(6). Disponible en: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01602-15>

23. Casselli T, Tourand Y, Scheidegger A, Arnold WK, Proulx A, Stevenson B, et al. DNA Methylation by Restriction Modification Systems Affects the Global Transcriptome Profile in *Borrelia burgdorferi*. Galperin MY, editor. *Journal of Bacteriology [Internet]*. 24 de septiembre de 2018 [citado 11 de marzo de 2019];200(24). Disponible en: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.00395-18>

24. Hosford XCJ, Bui XAQ, Chappie XJS. The structure of the Thermococcus gammatolerans McrB N-terminal domain reveals a new mode of substrate recognition and specificity among McrB homologs. :14.

25. Mouammine A, Collier J. The impact of DNA methylation in *Alphaproteobacteria*: Suppressor mutations in FgSNU66. *Molecular Microbiology*. octubre de 2018;110(1):1-10.

26. Im HN, Kim HS, An DR, Jang JY, Kim J, Yoon HJ, et al. Crystal structure of Rv2258c from Mycobacterium tuberculosis H37Rv, an S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase. *Journal of Structural Biology*. marzo de 2016;193(3):172-80.

27. Chen Z, Zhang Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. *Annu Rev Biochem*. 20 de junio de 2020;89(1):135-58.

28. Babinger P, Völkl R, Cakstina I, Maftai A, Schmitt R. Maintenance DNA

- methyltransferase (Met1) and silencing of CpG-methylated foreign DNA in *Volvox carteri*. *Plant Mol Biol.* 1 de febrero de 2007;63(3):325-36.
29. Taşkin KM, Özbilen A, Sezer F, Hürkan K, Güneş Ş. Structure and expression of dna methyltransferase genes from apomictic and sexual *Boechera* species. *Computational Biology and Chemistry.* abril de 2017;67:15-21.
 30. Brocklehurst S, Watson M, Carr IM, Out S, Heidmann I, Meyer P. Induction of epigenetic variation in *Arabidopsis* by over-expression of DNA METHYLTRANSFERASE1 (MET1). Wu K, editor. *PLOS ONE.* 21 de febrero de 2018;13(2):e0192170.
 31. Taşkin KM, Özbilen A, Sezer F, Hürkan K, Güneş Ş. Structure and expression of dna methyltransferase genes from apomictic and sexual *Boechera* species. *Computational Biology and Chemistry.* abril de 2017;67:15-21.
 32. Kumar R, Chauhan PK, Khurana A. Identification and expression profiling of DNA methyltransferases during development and stress conditions in Solanaceae. *Functional & Integrative Genomics.* septiembre de 2016;16(5):513-28.
 33. Zhang JJ, Yang H. Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Science of The Total Environment.* octubre de 2021;790:148034.
 34. Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma.* febrero de 2010;119(1):35-40.
 35. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Hérault Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science.* 18 de noviembre de 2016;354(6314):909-12.
 36. Jain D, Meydan C, Lange J, Claeys Bouuaert C, Lailier N, Mason CE, et al. rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. Cohen PE, editor. *PLoS Genet.* 30 de agosto de 2017;13(8):e1006964.
 37. Alvarez-Ponce D, Torres-Sánchez M, Feyertag F, Kulkarni A, Nappi T. Molecular evolution of DNMT1 in vertebrates: Duplications in marsupials followed by positive selection. Jeltsch A, editor. *PLoS ONE.* 5 de abril de 2018;13(4):e0195162.
 38. Rodríguez-Osorio N, Wang H, Rupinski J, Bridges SM, Memili E. Comparative functional genomics of mammalian DNA methyltransferases. *Reproductive BioMedicine Online.* febrero de 2010;20(2):243-55.
 39. Jurkowski TP, Jeltsch A. On the Evolutionary Origin of Eukaryotic DNA Methyltransferases and Dnmt2. Lyko F, editor. *PLoS ONE.* 30 de noviembre de 2011;6(11):e28104.
 40. Lai YH, Audira G, Liang ST, Siregar P, Suryanto ME, Lin HC, et al. Duplicated dnmt3aa and dnmt3ab DNA Methyltransferase Genes Play Essential and Non-Overlapped Functions on Modulating Behavioral Control in Zebrafish. *Genes.* 7 de noviembre de 2020;11(11):1322.
 41. Fujihara Y, Miyasako H, Kato K, Hayashi T, Toraya T. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Starfish DNA (Cytosine-5)-methyltransferases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 23 de septiembre de 2012;76(9):1661-71.
 42. Simpson VJ, Johnson TE, Hammen RF. *Caenorhabdys elegans* DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Research.* :9.

43. Pratz L, Rancurel C, Da Rocha M, Danchin EGJ, Castagnone-Sereno P, Abad P, et al. Genome-wide expert annotation of the epigenetic machinery of the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne* spp., with a focus on the asexually reproducing species. *BMC Genomics* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 11 de marzo de 2019];19(1). Disponible en: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4686-x>
44. Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, Turner BM, Hendrich B, Bird A. Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nature Genetics*. diciembre de 1999;23(4):389-90.
45. Madhusoodanan UK, Rao DN. Diversity of DNA methyltransferases that recognize asymmetric target sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. abril de 2010;45(2):125-45.
46. Lee WC, Anton BP, Wang S, Baybayan P, Singh S, Ashby M, et al. The complete methylome of *Helicobacter pylori* UM032. *BMC Genomics*. diciembre de 2015;16(1):424.
47. Mouammine A, Collier J. The impact of DNA methylation in *Alphaproteobacteria*. *Molecular Microbiology*. octubre de 2018;110(1):1-10.
48. Zebrowska J, Zolnierkiewicz O, Skowron MA, Zylicz-Stachula A, Jezewska-Frackowiak J, Skowron PM. A putative Type IIS restriction endonuclease GeoICI from *Geobacillus* sp. – A robust, thermostable alternative to mesophilic prototype BbvI. *J Biosci*. marzo de 2016;41(1):27-38.
49. dos Reis TF, Silva LP, de Castro PA, Almeida de Lima PB, do Carmo RA, Marini MM, et al. The Influence of Genetic Stability on *Aspergillus fumigatus* Virulence and Azole Resistance. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. enero de 2018;8(1):265-78.
50. Nai YS, Huang YC, Yen MR, Chen PY. Diversity of Fungal DNA Methyltransferases and Their Association With DNA Methylation Patterns. *Front Microbiol*. 22 de enero de 2021;11:616922.
51. Bestor TH. Cytosine methylation mediates sexual conflict. *Trends in Genetics*. abril de 2003;19(4):185-90.
52. Kinoshita T. One-Way Control of FWA Imprinting in Arabidopsis Endosperm by DNA Methylation. *Science*. 23 de enero de 2004;303(5657):521-3.
53. Kay S, Skowronski D, Hunt BG. Developmental DNA methyltransferase expression in the fire ant *Solenopsis invicta*: Fire ant developmental DNMT expression. *Insect Science*. febrero de 2018;25(1):57-65.
54. Goll MG, Halpern ME. DNA Methylation in Zebrafish. En: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2011 [citado 11 de marzo de 2019]. p. 193-218. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123876850000056>
55. Williams BP, Gehring M. Stable transgenerational epigenetic inheritance requires a DNA methylation-sensing circuit. *Nature Communications* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 11 de marzo de 2019];8(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-02219-3>
56. Pratz L, Rancurel C, Da Rocha M, Danchin EGJ, Castagnone-Sereno P, Abad P, et al. Genome-wide expert annotation of the epigenetic machinery of the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne* spp., with a focus on the asexually reproducing

- species. *BMC Genomics* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 11 de marzo de 2019];19(1). Disponible en:
<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4686-x>
57. Sun Q, Qiao J, Zhang S, He S, Shi Y, Yuan Y, et al. Changes in DNA methylation assessed by genomic bisulfite sequencing suggest a role for DNA methylation in cotton fruiting branch development. *PeerJ*. 14 de junio de 2018;6:e4945.
 58. Goyal R. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13 de febrero de 2006;34(4):1182-8.
 59. Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology*. junio de 2001;309(5):1189-99.
 60. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. *Journal of Molecular Biology*. octubre de 1988;203(4):971-83.
 61. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*. 24 de enero de 2011;12(2):206-22.
 62. Jain D, Meydan C, Lange J, Claeys Bouuaert C, Lailier N, Mason CE, et al. rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. Cohen PE, editor. *PLOS Genetics*. 30 de agosto de 2017;13(8):e1006964.
 63. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Hérault Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*. 18 de noviembre de 2016;354(6314):909-12.
 64. Gatto S, Gagliardi M, Franzese M, Leppert S, Papa M, Cammisa M, et al. ICF-specific DNMT3B dysfunction interferes with intragenic regulation of mRNA transcription and alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 2 de junio de 2017;45(10):5739-56.
 65. Gujar H, Weisenberger D, Liang G. The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome. *Genes*. 23 de febrero de 2019;10(2):172.
 66. Hu H, Chen C, Shi S, Li B, Duan S. The gene mutations and subtelomeric DNA methylation in immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies syndrome. *Autoimmunity*. 18 de agosto de 2019;52(5-6):192-8.
 67. Saadeh H, Schulz R. Protection of CpG islands against de novo DNA methylation during oogenesis is associated with the recognition site of E2f1 and E2f2. *Epigenetics & Chromatin*. diciembre de 2014;7(1):26.
 68. Gong Z, Wang C, Nieh JC, Tan K. Inhibiting DNA methylation alters olfactory extinction but not acquisition learning in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. julio de 2016;90:43-8.
 69. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*. octubre de 1999;99(3):247-57.
 70. Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, et al. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian

- tumors. *Gynecologic Oncology*. enero de 2011;120(1):113-20.
71. Ahluwalia A, Hurteau JA, Bigsby RM, Nephew KP. DNA Methylation in Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*. agosto de 2001;82(2):299-304.
72. Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA Methyltransferase Variant DNMT3b3 in DNA Methylation. :12.
73. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research [Internet]*. 1 de enero de 1999 [citado 31 de enero de 2019];27(11):2291-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/27.11.2291>
74. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]*. 23 de julio de 2002 [citado 31 de enero de 2019];99(15):10060-5. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.152121799>
75. Gordon CA, Hartono SR, Chédin F. Inactive DNMT3B Splice Variants Modulate De Novo DNA Methylation. Chadwick BP, editor. *PLoS ONE [Internet]*. 19 de julio de 2013 [citado 31 de enero de 2019];8(7):e69486. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069486>
76. Shao G, Zhang R, Zhang S, Jiang S, Liu Y, Zhang W, et al. Splice variants DNMT3B4 and DNMT3B7 overexpression inhibit cell proliferation in 293A cell line. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal [Internet]*. mayo de 2013 [citado 31 de enero de 2019];49(5):386-94. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11626-013-9619-z>
77. Su X, Lv C, Qiao F, Qiu X, Huang W, Wu Q, et al. Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. *ONCOLOGY REPORTS*. 2010;8.
78. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, et al. CpG Island Methylation of DNA Damage Response Genes in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Research [Internet]*. 1 de octubre de 2005 [citado 31 de enero de 2019];65(19):8961-7. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1187>
79. Ostler KR, Yang Q, Looney TJ, Zhang L, Vasanthakumar A, Tian Y, et al. Truncated DNMT3B Isoform DNMT3B7 Suppresses Growth, Induces Differentiation, and Alters DNA Methylation in Human Neuroblastoma. *Cancer Research [Internet]*. 15 de septiembre de 2012 [citado 31 de enero de 2019];72(18):4714-23. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-0886>
80. Brambert PR, Kelps DJ, Hameed R, Desai CV, Calafiore G, Godley LA, et al. DNMT3B7 Expression Promotes Tumor Progression to a More Aggressive Phenotype in Breast Cancer Cells. Coleman WB, editor. *PLOS ONE [Internet]*. 21 de enero de 2015 [citado 31 de enero de 2019];10(1):e0117310. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117310>
81. Shah MY, Vasanthakumar A, Barnes NY, Figueroa ME, Kamp A, Hendrick C, et al. DNMT3B7, a Truncated DNMT3B Isoform Expressed in Human Tumors, Disrupts

- Embryonic Development and Accelerates Lymphomagenesis. *Cancer Research* [Internet]. 15 de julio de 2010 [citado 31 de enero de 2019];70(14):5840-50. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-0847>
82. Plourde KV, Labrie Y, Ouellette G, Pouliot MC, Durocher F. Genome-wide methylation analysis of *DNMT3B* gene isoforms revealed specific methylation profiles in breast cell lines. *Epigenomics* [Internet]. septiembre de 2016 [citado 31 de enero de 2019];8(9):1209-26. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi-2016-0013>
83. Ma MZ, Lin R, Carrillo J, Bhutani M, Pathak A, Ren H, et al. Δ DNMT3B4-del Contributes to Aberrant DNA Methylation Patterns in Lung Tumorigenesis. *EBioMedicine* [Internet]. octubre de 2015 [citado 31 de enero de 2019];2(10):1340-50. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396415301249>
84. Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Expression of Δ DNMT3B Variants and Its Association with Promoter Methylation of *p16* and *RASSF1A* in Primary Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* [Internet]. 1 de septiembre de 2006 [citado 31 de enero de 2019];66(17):8361-6. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-2031>
85. Wang J, Bhutani M, Pathak AK, Lang W, Ren H, Jelinek J, et al. Δ DNMT3B Variants Regulate DNA Methylation in a Promoter-Specific Manner. *Cancer Research* [Internet]. 15 de noviembre de 2007 [citado 31 de enero de 2019];67(22):10647-52. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-1337>
86. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Shan J, Su Z, Fields CR, Vieweg J, et al. A Novel DNMT3B Splice Variant Expressed in Tumor and Pluripotent Cells Modulates Genomic DNA Methylation Patterns and Displays Altered DNA Binding. *Molecular Cancer Research* [Internet]. 1 de octubre de 2009 [citado 31 de enero de 2019];7(10):1622-34. Disponible en: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-09-0018>
87. Van Emburgh BO, Robertson KD. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Research*. julio de 2011;39(12):4984-5002.
88. Ma MZ, Lin R, Carrillo J, Bhutani M, Pathak A, Ren H, et al. Δ DNMT3B4-del Contributes to Aberrant DNA Methylation Patterns in Lung Tumorigenesis. *EBioMedicine*. octubre de 2015;2(10):1340-50.
89. Wang L, Wang J, Sun S, Rodriguez M, Yue P, Jang S, et al. A novel DNMT3B subfamily, Δ DNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology* [Internet]. 1 de julio de 2006 [citado 30 de enero de 2019]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.29.1.201>
90. Eden A. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science*. 18 de abril de 2003;300(5618):455-455.
91. Brambert PR, Kelsch DJ, Hameed R, Desai CV, Calafiore G, Godley LA, et al. DNMT3B7 Expression Promotes Tumor Progression to a More Aggressive Phenotype in Breast Cancer Cells. Coleman WB, editor. *PLOS ONE*. 21 de enero de

2015;10(1):e0117310.

92. Siddiqui S, White MW, Schroeder AM, DeLuca NV, Leszczynski AL, Raimondi SL. Aberrant DNMT3B7 expression correlates to tissue type, stage, and survival across cancers. Ahmad A, editor. PLOS ONE. 2 de agosto de 2018;13(8):e0201522.

93. Ostler KR, Yang Q, Looney TJ, Zhang L, Vasanthakumar A, Tian Y, et al. Truncated DNMT3B Isoform DNMT3B7 Suppresses Growth, Induces Differentiation, and Alters DNA Methylation in Human Neuroblastoma. *Cancer Research*. 15 de septiembre de 2012;72(18):4714-23.

94. Shah MY, Vasanthakumar A, Barnes NY, Figueroa ME, Kamp A, Hendrick C, et al. DNMT3B7, a Truncated DNMT3B Isoform Expressed in Human Tumors, Disrupts Embryonic Development and Accelerates Lymphomagenesis. *Cancer Research*. 15 de julio de 2010;70(14):5840-50.

95. Duymich CE, Charlet J, Yang X, Jones PA, Liang G. DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nature Communications* [Internet]. diciembre de 2016 [citado 30 de enero de 2019];7(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/ncomms11453>

96. Gopalakrishna-Pillai S, Iverson LE. A DNMT3B Alternatively Spliced Exon and Encoded Peptide Are Novel Biomarkers of Human Pluripotent Stem Cells. Pera M, editor. PLoS ONE. 15 de junio de 2011;6(6):e20663.

97. Su X, Lv C, Qiao F, Qiu X, Huang W, Wu Q, et al. Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. *ONCOLOGY REPORTS*. 2010;8.

98. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, et al. CpG Island Methylation of DNA Damage Response Genes in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 1 de octubre de 2005;65(19):8961-7.

99. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 de julio de 2002;99(15):10060-5.

100. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 de julio de 2002;99(15):10060-5.

101. Gordon CA, Hartono SR, Chédin F. Inactive DNMT3B Splice Variants Modulate De Novo DNA Methylation. Chadwick BP, editor. PLoS ONE. 19 de julio de 2013;8(7):e69486.

102. Liu Y, Sun L, Fong P, Yang J, Zhang Z, Yin S, et al. An association between overexpression of DNA methyltransferase 3B4 and clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 21 de marzo de 2017 [citado 30 de enero de 2019];8(12). Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14966>

103. Shao G, Zhang R, Zhang S, Jiang S, Liu Y, Zhang W, et al. Splice variants DNMT3B4 and DNMT3B7 overexpression inhibit cell proliferation in 293A cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. mayo de 2013;49(5):386-94.

104. Siddiqui S, White MW, Schroeder AM, DeLuca NV, Leszczynski AL, Raimondi SL.

- Aberrant DNMT3B7 expression correlates to tissue type, stage, and survival across cancers. Ahmad A, editor. PLOS ONE. 2 de agosto de 2018;13(8):e0201522.
105. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. enero de 2016;66(1):7-30.
 106. Boyd C, McCluggage WG. Low-Grade Ovarian Serous Neoplasms (Low-Grade Serous Carcinoma and Serous Borderline Tumor) Associated With High-Grade Serous Carcinoma or Undifferentiated Carcinoma: Report of a Series of Cases of an Unusual Phenomenon. Am J Surg Pathol. 2012;36(3):8.
 107. McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. Pathology. agosto de 2011;43(5):420-32.
 108. Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. Human Pathology. septiembre de 2009;40(9):1213-23.
 109. Ramus SJ, Harrington PA, Pye C, DiCioccio RA, Cox MJ, Garlinghouse-Jones K, et al. Contribution of *BRCA1* and *BRCA2* mutations to inherited ovarian cancer. Human Mutation. diciembre de 2007;28(12):1207-15.
 110. Andrews L, Mutch DG. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. mayo de 2017;41:31-48.
 111. Lynch HT, Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Seminars in Surgical Oncology. junio de 2000;18(4):305-13.
 112. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. Advances in Anatomic Pathology. septiembre de 2009;16(5):267-82.
 113. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis. The American Journal of Pathology. mayo de 2004;164(5):1511-8.
 114. Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of Ovarian Cancer: Lessons From Morphology and Molecular Biology and Their Clinical Implications. International Journal of Gynecological Pathology [Internet]. febrero de 2008 [citado 23 de enero de 2019];PAP. Disponible en: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00004347-900000000-99979>
 115. Kurman RJ, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory: The American Journal of Surgical Pathology. marzo de 2010;34(3):433-43.
 116. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell. junio de 1992;69(6):915-26.
 117. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nature Reviews Genetics. julio de 2012;13(7):484-92.
 118. Hughes LAE, Melotte V, de Schrijver J, de Maat M, Smit VTHBM, Bovee JVMG, et al. The CpG Island Methylator Phenotype: What's in a Name? Cancer Research. 1 de octubre de 2013;73(19):5858-68.
 119. Abou-Zeid AA, Azzam AZ, Kamel NA. Methylation status of the gene promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) in ovarian cancer. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. noviembre de 2011;71(7):542-7.
 120. Braga L da C, Silva LM, Ramos APÁ da S, Piedade JB, Vidigal PVT, Traiman P, et al. Single CpG island methylation is not sufficient to maintain the silenced

- expression of CASPASE-8 apoptosis-related gene among women with epithelial ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. febrero de 2014;68(1):87-91.
121. Feng W, Marquez RT, Lu Z, Liu J, Lu KH, Issa JPJ, et al. Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*. 1 de abril de 2008;112(7):1489-502.
122. Wang YQ, Yan Q, Zhang JR, Li SD, Yang YX, Wan XP. Epigenetic inactivation of BRCA1 through promoter hypermethylation in ovarian cancer progression: *BRCA1* hypermethylation in ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. febrero de 2013;39(2):549-54.
123. Rattanapan Y, Korkiatsakul V, Kongruang A, Chareonsirisuthigul T, Rerkamnuaychoke B, Wongkularb A, et al. EGFL7 and RASSF1 promoter hypermethylation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Genetics*. agosto de 2018;224-225:37-40.
124. Bhagat R, Kumar SS, Vaderhobli S, Premalata CS, Pallavi VR, Ramesh G, et al. Epigenetic alteration of p16 and retinoic acid receptor beta genes in the development of epithelial ovarian carcinoma. *Tumor Biology*. septiembre de 2014;35(9):9069-78.
125. da Conceição Braga L, Silva LM, Piedade JB, Traiman P, da Silva Filho AL. Epigenetic and expression analysis of TRAIL-R2 and BCL2: on the TRAIL to knowledge of apoptosis in ovarian tumors. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. mayo de 2014;289(5):1061-9.
126. Shen DH, Chan KYK, Khoo US, Ngan HYS, Xue WC, Chiu PM, et al. Epigenetic and genetic alterations of p33 ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis*. abril de 2005;26(4):855-63.
127. Baranova I, Kovarikova H, Laco J, Dvorak O, Sedlakova I, Palicka V, et al. Aberrant methylation of PCDH17 gene in high-grade serous ovarian carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 31 de agosto de 2018;23(1):125-33.
128. Wang G, Li X, Tian W, Wang Y, Wu D, Sun Z, et al. Promoter DNA methylation is associated with *KLF11* expression in epithelial ovarian cancer: Promoter Dna Methylation Is Associated With *KLF11* Expression. *Genes, Chromosomes and Cancer*. julio de 2015;54(7):453-62.
129. Gozzi G, Chelbi ST, Manni P, Alberti L, Fonda S, Saponaro S, et al. Promoter methylation and downregulated expression of the TBX15 gene in ovarian carcinoma. *Oncology Letters*. octubre de 2016;12(4):2811-9.
130. Choi YL, Kang SY, Choi JS, Shin YK, Kim SH, Lee SJ, et al. Aberrant hypermethylation of RASSF1A promoter in ovarian borderline tumors and carcinomas. *Virchows Archiv*. marzo de 2006;448(3):331-6.
131. Qiao B, Zhang Z, Li Y. Association of *MGMT* promoter methylation with tumorigenesis features in patients with ovarian cancer: A systematic meta-analysis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. enero de 2018;6(1):69-76.
132. Sung CK, Li D, Andrews E, Drapkin R, Benjamin T. Promoter methylation of the SALL2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology*. junio de 2013;7(3):419-27.
133. Qiu H, Zhu J, Yu J, Pu H, Dong R. SLIT2 is Epigenetically Silenced in Ovarian Cancers and Suppresses Growth when Activated. :5.
134. Jin P, Song Y, Yu G. The Role of Abnormal Methylation of Wnt5a Gene Promoter

- Regions in Human Epithelial Ovarian Cancer: A Clinical and Experimental Study. *Analytical Cellular Pathology*. 16 de julio de 2018;2018:1-9.
135. Kirn V, Shi R, Heublein S, Knabl J, Guenther-Biller M, Andergassen U, et al. Estrogen receptor promoter methylation predicts survival in low-grade ovarian carcinoma patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. octubre de 2014;140(10):1681-7.
136. Ding JJ, Wang G, Shi WX, Zhou HH, Zhao EF. Promoter Hypermethylation of *FANCF* and Susceptibility and Prognosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Reproductive Sciences*. enero de 2016;23(1):24-30.
137. Häfner N, Steinbach D, Jansen L, Diebolder H, Dürst M, Runnebaum IB. RUNX3 and CAMK2N1 hypermethylation as prognostic marker for epithelial ovarian cancer: Prognostic Methylation Markers for EOC. *International Journal of Cancer*. 1 de enero de 2016;138(1):217-28.
138. Kardum V, Karin V, Glibo M, Skrtic A, Martic TN, Ibisevic N, et al. Methylation-associated silencing of SFRP1 gene in high-grade serous ovarian carcinomas. *Annals of Diagnostic Pathology*. diciembre de 2017;31:45-9.
139. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Shiina H, Yamada H, Yamamoto R, et al. WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer*. 1 de noviembre de 2005;104(9):1924-30.
140. Wang B, Yu L, Luo X, Huang L, Li QS, Shao XS, et al. Detection of OPCML methylation, a possible epigenetic marker, from free serum circulating DNA to improve the diagnosis of early-stage ovarian epithelial cancer. *Oncology Letters*. julio de 2017;14(1):217-23.
141. Pradhan M, Risberg BÅ, Tropé CG, van de Rijn M, Gilks CB, Lee CH. Gross genomic alterations and gene expression profiles of high- grade serous carcinoma of the ovary with and without BRCA1 inactivation. *BMC Cancer* [Internet]. diciembre de 2010 [citado 31 de enero de 2019];10(1). Disponible en: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-493>
142. Link PA, Zhang W, Odunsi K, Karpf AR. BORIS/CTCF mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunity*. 2013;13:9.
143. Yang G, Zhang H, Liu Y, Zhou J, He W, Quick CM, et al. Epigenetic and immunohistochemical characterization of the Clusterin gene in ovarian tumors. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. mayo de 2013;287(5):989-95.
144. Zhang W, Barger CJ, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Miller A, Akers SN, et al. DNA hypomethylation-mediated activation of *Cancer/Testis Antigen 45 (CT45)* genes is associated with disease progression and reduced survival in epithelial ovarian cancer. *Epigenetics*. 3 de agosto de 2015;10(8):736-48.
145. Bonito NA, Borley J, Wilhelm-Benartzi CS, Ghaem-Maghani S, Brown R. Epigenetic Regulation of the Homeobox Gene MSX1 Associates with Platinum-Resistant Disease in High-Grade Serous Epithelial Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 15 de junio de 2016;22(12):3097-104.
146. Zhang W, Barger CJ, Eng KH, Klinkebiel D, Link PA, Omilian A, et al. PRAME expression and promoter hypomethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* [Internet]. 19 de julio de 2016 [citado 31 de enero de 2019];7(29). Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/9977>

147. Goodheart M, Rose S, Hattermann-Zogg M, Smith B, De Young B, Buller R. BRCA2 alteration is important in clear cell carcinoma of the ovary. *Clinical Genetics*. agosto de 2009;76(2):161-7.
148. Bernards SS, Pennington KP, Harrell MI, Agnew KJ, Garcia RL, Norquist BM, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with BRCA1 or RAD51C methylated versus mutated ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*. febrero de 2018;148(2):281-5.
149. Sun T, Ruscito I, Dimitrova D, Chekerov R, Kulbe H, Baron U, et al. Genetic Versus Epigenetic BRCA1 Silencing Pathways: Clinical Effects in Primary Ovarian Cancer Patients. *International Journal of Gynecological Cancer*. octubre de 2017;27(8):1658-65.
150. Shilpa V, Bhagat R, Premalata CS, Pallavi VR, Ramesh G, Krishnamoorthy L. BRCA1 promoter hypermethylation and protein expression in ovarian carcinoma—an Indian study. *Tumor Biology*. mayo de 2014;35(5):4277-84.
151. Australian Ovarian Cancer Study (AOCS), Kondrashova O, Topp M, Nesic K, Lieschke E, Ho GY, et al. Methylation of all BRCA1 copies predicts response to the PARP inhibitor rucaparib in ovarian carcinoma. *Nature Communications* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 31 de enero de 2019];9(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05564-z>
152. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, et al. The Role of BRCA Status on the Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review of the Literature with a Meta-Analysis. *Bishop AJR, editor. PLoS ONE*. 1 de mayo de 2014;9(5):e95285.
153. Losi L, Fonda S, Saponaro S, Chelbi S, Lancellotti C, Gozzi G, et al. Distinct DNA Methylation Profiles in Ovarian Tumors: Opportunities for Novel Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 24 de mayo de 2018;19(6):1559.
154. Kaur M, Singh A, Singh K, Gupta S, Sachan M. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of DAPK1 and SOX1 methylation in epithelial ovarian cancer in a north Indian population. *Genes & Genetic Systems*. 2016;91(3):175-81.
155. Suzuki F, Akahira J ichi, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S ichi, et al. Loss of estrogen receptor β isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Science*. diciembre de 2008;99(12):2365-72.
156. Earp MA, Cunningham JM. DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes. *Genomics*. diciembre de 2015;106(6):311-21.
157. Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. DNA methylation changes in ovarian cancer: Implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecologic Oncology*. abril de 2008;109(1):129-39.
158. Wei SH, Chen CM, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu CR, Rahmatpanah F, et al. Methylation Microarray Analysis of Late-Stage Ovarian Carcinomas Distinguishes Progression-free Survival in Patients and Identifies Candidate Epigenetic Markers. *Clinical Cancer Research*. 2002;8:2246-52.
159. Wei SH. Prognostic DNA Methylation Biomarkers in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 1 de mayo de 2006;12(9):2788-94.
160. Collins Y, Dicioccio R, Keitz B, Lele S, Odunsi K. Methylation of death-associated

protein kinase in ovarian carcinomas. *International Journal of Gynecological Cancer*. febrero de 2006;16(S1):195-9.

161. de Caceres II, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, et al. Tumor Cell-Specific BRCA1 and RASSF1A Hypermethylation in Serum, Plasma, and Peritoneal Fluid from Ovarian Cancer Patients. *Cancer Research*. 2004;64:6476-81.
162. Furlan D. The High Frequency of De novo Promoter Methylation in Synchronous Primary Endometrial and Ovarian Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 1 de junio de 2006;12(11):3329-36.
163. Niskakoski A, Pasanen A, Porkka N, Eldfors S, Lassus H, Renkonen-Sinisalo L, et al. Converging endometrial and ovarian tumorigenesis in Lynch syndrome: Shared origin of synchronous carcinomas. *Gynecologic Oncology*. julio de 2018;150(1):92-8.
164. Kolbe DL, DeLoia JA, Porter-Gill P, Strange M, Petrykowska HM, Guirguis A, et al. Differential Analysis of Ovarian and Endometrial Cancers Identifies a Methylator Phenotype. Califano J, editor. *PLoS ONE*. 5 de marzo de 2012;7(3):e32941.
165. Guo C, Ren F, Wang D, Li Y, Liu K, Liu S, et al. RUNX3 is inactivated by promoter hypermethylation in malignant transformation of ovarian endometriosis. *Oncology Reports*. diciembre de 2014;32(6):2580-8.
166. Pisanic TR, Cope LM, Lin SF, Yen TT, Athamanolap P, Asaka R, et al. Methylomic Analysis of Ovarian Cancers Identifies Tumor-Specific Alterations Readily Detectable in Early Precursor Lesions. *Clinical Cancer Research*. 15 de diciembre de 2018;24(24):6536-47.
167. Klinkebiel D, Zhang W, Akers SN, Odunsi K, Karpf AR. DNA Methylome Analyses Implicate Fallopian Tube Epithelia as the Origin for High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Research*. 1 de septiembre de 2016;14(9):787-94.
168. Liew PL, Huang RL, Weng YC, Fang CL, Hui-Ming Huang T, Lai HC. Distinct methylation profile of mucinous ovarian carcinoma reveals susceptibility to proteasome inhibitors: Methylation profile of MuOC and PSMB8. *International Journal of Cancer*. 15 de julio de 2018;143(2):355-67.
169. Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, et al. Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology: Methylation in ovarian clear cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 1 de agosto de 2014;135(3):585-97.
170. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
171. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chédin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem*. 1 de agosto de 2005;95(5):902-17.
172. Zeimet AG, Fiegl H, Goebel G, Kopp F, Allasia C, Reimer D, et al. DNA ploidy, nuclear size, proliferation index and DNA-hypomethylation in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. abril de 2011;121(1):24-31.
173. Van Emburgh BO, Robertson KD. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Research*. julio de 2011;39(12):4984-5002.
174. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA

- expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research*. 1 de enero de 1999;27(11):2291-8.
175. Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Expression of $\Delta DNMT3B$ Variants and Its Association with Promoter Methylation of *p16* and *RASSF1A* in Primary Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*. 1 de septiembre de 2006;66(17):8361-6.
176. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Shan J, Su Z, Fields CR, Vieweg J, et al. A Novel DNMT3B Splice Variant Expressed in Tumor and Pluripotent Cells Modulates Genomic DNA Methylation Patterns and Displays Altered DNA Binding. *Molecular Cancer Research*. 1 de octubre de 2009;7(10):1622-34.
177. Vavouri T, Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biology*. 2012;13(11):R110.
178. Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, et al. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*. 27 de abril de 2006;25(18):2636-45.
179. Manzo M, Wirz J, Ambrosi C, Villaseñor R, Roschitzki B, Baubec T. Isoform-specific localization of DNMT3A regulates DNA methylation fidelity at bivalent CpG islands. *The EMBO Journal*. 1 de diciembre de 2017;36(23):3421-34.
180. Wang J, Bhutani M, Pathak AK, Lang W, Ren H, Jelinek J, et al. $\Delta DNMT3B$ Variants Regulate DNA Methylation in a Promoter-Specific Manner. *Cancer Research*. 15 de noviembre de 2007;67(22):10647-52.
181. Ostler KR, Davis EM, Payne SL, Gosalia BB, Expósito-Céspedes J, Beau MML, et al. Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene*. agosto de 2007;26(38):5553-63.
182. Aoki A. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Research*. 1 de septiembre de 2001;29(17):3506-12.



Review

DNA Methyltransferases: From Evolution to Clinical Applications

Victor M. Del Castillo Falconi^{1,2}, Karla Torres-Arciga^{1,2} , Genaro Matus-Ortega³, José Díaz-Chávez^{1,2,*}
and Luis A. Herrera^{1,2,4,*}

¹ Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), Avenida San Fernando No. 22, Sección XVI Tlalpan, Ciudad de México 14080, Mexico

² Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

⁴ Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Ciudad de México 14610, Mexico

* Correspondence: jdiazchavez03@gmail.com (J.D.-C.); lherrera@inmegen.gob.mx (L.A.H.)

Abstract: DNA methylation is an epigenetic mark that living beings have used in different environments. The MTases family catalyzes DNA methylation. This process is conserved from archaea to eukaryotes, from fertilization to every stage of development, and from the early stages of cancer to metastasis. The family of DNMTs has been classified into DNMT1, DNMT2, and DNMT3. Each DNMT has been duplicated or deleted, having consequences on DNMT structure and cellular function, resulting in a conserved evolutionary reaction of DNA methylation. DNMTs are conserved in the five kingdoms of life: bacteria, protists, fungi, plants, and animals. The importance of DNMTs in whether methylate or not has a historical adaptation that in mammals has been discovered in complex regulatory mechanisms to develop another padlock to genomic insurance stability. The regulatory mechanisms that control DNMTs expression are involved in a diversity of cell phenotypes and are associated with pathologies transcription deregulation. This work focused on DNA methyltransferases, their biology, functions, and new inhibitory mechanisms reported. We also discuss different approaches to inhibit DNMTs, the use of non-coding RNAs and nucleoside chemical compounds in recent studies, and their importance in biological, clinical, and industry research.

Keywords: 5-methylcytosine; cancer biology; DNA methylation; DNA methyltransferases; DNA methylation; DNMTs isoforms; epigenetics



Citation: Del Castillo Falconi, V.M.; Torres-Arciga, K.; Matus-Ortega, G.; Díaz-Chávez, J.; Herrera, L.A. DNA Methyltransferases: From Evolution to Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8994. <https://doi.org/10.3390/ijms23168994>

Academic Editors: Ignacio Camacho-Arroyo, Jorge Melendez-Zajgla, Mahara A. Valverde Ramirez and Mauricio Rodriguez-Dorantes

Received: 9 July 2022
Accepted: 2 August 2022
Published: 12 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

DNA methylation is an essential epigenetic mark that living beings have used to survive in different ambient conditions. For example, in prokaryotes, it is used to differentiate their own DNA from foreign DNA and avoid endoreduplication [1]. Moreover, in eukaryotes, DNA methylation is used to silence DNA fragments and whole chromosomes, program cell differentiation, and avoid errors in DNA cell segregation [2–4]. In addition, DNA methylation is a promising molecular tool to cause changes in living beings' phenotypes in an epigenetic way, for example, in plants or mushrooms metabolites production, reproduction, differentiation, or clinical use to treat diseases [2–5]. In mammals, there are several mechanisms to regulate the expression or the gene dose of DNMTs. In cancer, these mechanisms have been shown to be the product of alternative splicing isoforms and non-coding RNAs that regulate DNMTs mRNA expression [6,7]. Interestingly, these regulatory mechanisms are affected in cancer, changing dose in initiation, progression, and metastasis. In this sense, several compounds inhibit DNA methylation and are probed to combine chemotherapies in cancer treatments [8,9]. Therefore, DNA-methyltransferases (DNMTs) are an exciting subject for researching the capacity to manipulate the living cells' phenotypes.



Article

Expression of DNA Methyltransferase 3B Isoforms Is Associated with DNA Satellite 2 Hypomethylation and Clinical Prognosis in Advanced High-Grade Serous Ovarian Carcinoma

Victor M. Del Castillo Falconi ^{1,*}, José Díaz-Chávez ^{1,*}, Karla Torres-Arciga ¹, Fernando Luna-Maldonado ¹, Adriana A. Gudiño-Gomez ², Abraham Pedroza-Torres ³, Clementina Castro-Hernández ¹, David Cantú de León ¹ and Luis A. Herrera ^{1,2,*}

- ¹ Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Avenida San Fernando No. 22, Sección XVI Tlalpan, Ciudad de México 14080, Mexico
- ² Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Ciudad de México 14610, Mexico
- ³ Cátedras CONACYT—Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México 14610, Mexico
- * Correspondence: jdiazchavez03@gmail.com (J.D.-C.); lherrera@inmegen.gob.mx (L.A.H.)



Citation: Del Castillo Falconi, V.M.; Díaz-Chávez, J.; Torres-Arciga, K.; Luna-Maldonado, F.; Gudiño-Gomez, A.A.; Pedroza-Torres, A.; Castro-Hernández, C.; Cantú de León, D.; Herrera, L.A. Expression of DNA Methyltransferase 3B Isoforms Is Associated with DNA Satellite 2 Hypomethylation and Clinical Prognosis in Advanced High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12759. <https://doi.org/10.3390/ijms232112759>

Academic Editors: Ignacio Camacho-Arroyo, Jorge Melendez-Zajgla, Mahara A. Valverde Ramirez and Mauricio Rodriguez-Dorantes

Received: 19 August 2022

Accepted: 18 October 2022

Published: 22 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Alterations in DNA methylation are critical for the carcinogenesis of ovarian tumors, especially ovarian carcinoma (OC). DNMT3B, a de novo DNA methyltransferase (DNMT), encodes for fifteen spliced protein products or isoforms. DNMT3B isoforms lack exons for the catalytic domain, with functional consequences on catalytic activity. Abnormal expression of DNMT3B isoforms is frequently observed in several types of cancer, such as breast, lung, kidney, gastric, liver, skin, leukemia, and sarcoma. However, the expression patterns and consequences of DNMT3B isoforms in OC are unknown. In this study, we analyzed each DNMT and DNMT3B isoforms expression by qPCR in 63 OC samples and their association with disease-free survival (DFS), overall survival (OS), and tumor progression. We included OC patients with the main histological subtypes of EOC and patients in all the disease stages and found that DNMTs were overexpressed in advanced stages (p -value < 0.05) and high-grade OC (p -value < 0.05). Remarkably, we found DNMT3B1 overexpression in advanced stages (p -value = 0.0251) and high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) (p -value = 0.0313), and DNMT3B3 was overexpressed in advanced stages (p -value = 0.0098) and high-grade (p -value = 0.0004) serous ovarian carcinoma (SOC). Finally, we observed that overexpression of DNMT3B isoforms was associated with poor prognosis in OC and SOC. DNMT3B3 was also associated with FDS (p -value = 0.017) and OS (p -value = 0.038) in SOC patients. In addition, the ovarian carcinoma cell lines OVCAR3 and SKOV3 also overexpress DNMT3B3. Interestingly, exogenous overexpression of DNMT3B3 in OVCAR3 causes demethylation of satellite 2 sequences in the pericentromeric region. In summary, our results suggest that DNMT3B3 expression is altered in OC.

Keywords: ovarian cancer; DNMT3B isoforms; histological grade; biomarkers; cancer epigenetics; DNA methylation

1. Introduction

Ovarian cancer (OC) is the most lethal cancer of the female genital tract. In the United States, OC is responsible for more cancer-related deaths than all other gynecological tumors [1]. OC is a heterogeneous histological cancer. There is non-epithelial cancer, an uncommon group comprising germinal and stromal tissues; however, the most frequent tumor is epithelial ovarian cancer, which comprises more than 90% of all OC cases. The subtypes of epithelial ovarian cancer (EOC) are serous ovarian carcinoma (SOC), endometrioid carcinoma (EC), mucinous carcinoma (MC), clear cells carcinoma (CCC), and mixed carcinoma [2,3].