UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de IGF2 sobre el panorama de metilación del ADN y la expresión de ARNm asociada en la línea celular HTR-8/SVneo

David Alejandro López González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2021

Efecto de IGF2 sobre el panorama de metilación del ADN y la expresión de ARNm asociada en la línea celular HTR-8/SVneo

David Alejandro López González

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Bioquímica

Director:
Título Yadi Adriana Umaña Pérez, MSc, PhD

Línea de Investigación:
Factores de crecimiento, diferenciación y cáncer
Grupo de Investigación:
Grupo de Investigación en Hormonas GIH

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2021

A mis padres, gracias por tanto y tanto apoyo.

A la doctora Adriana, gracias por la paciencia.

A la Universidad Nacional, gracias por mis amigos.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

David A. López G.

_____

David Alejandro López González
CC 1013638215

28 de julio de 2021

RESUMEN

El proceso de implantación placentaria depende de una minuciosa regulación de la invasión de la decidua materna por parte del subtipo celular denominado trofoblasto extravelloso, la evasión del sistema inmune de la madre y la remodelación de la vasculatura local. Estos y otros procesos hacen que la implantación placentaria sea notablemente similar a la invasión tumoral. Las células de cáncer deben su origen a una pérdida de la identidad celular somática acompañada del desarrollo de un fenotipo aberrante que se alcanza como consecuencia de la reactivación de programas de desarrollo embrionario. Se cree que la pérdida de la identidad celular, así como la reactivación de los programas de desarrollo se deben en gran medida a una pérdida de la estabilidad genómica, que a su vez depende del panorama de metilación a nivel genómico. Se sabe que diversos estímulos extracelulares son capaces de promover una remodelación del panorama de metilación de células somáticas tal que contribuye a una transición maligna hacia un fenotipo altamente proliferativo e invasivo, que se debe tanto a la activación estocástica de oncogenes, como a un silenciamiento de genes supresores de tumores.

Utilizando la línea celular derivada de trofoblasto, HTR-8/SVneo, por su fenotipo pseudomaligno y como modelo para el estudio de la biología placentaria y de la progresión tumoral, el propósito de este trabajo fue analizar la respuesta funcional de la línea ante un estímulo mitogénico con el péptido IGF2, y determinar cómo esta respuesta se relaciona con la variación en el panorama de metilación genómico y la expresión de RNA mensajero. A través de la interrogación del panorama de metilación genómico y la actividad transcripcional de la línea celular se identificaron variaciones que aparecen por efecto del estímulo y que ocurren de manera simultánea con un aumento de la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de la línea celular. Muchos de los genes comprometidos en estas variaciones han sido descritos previamente en cáncer y más aún, hacen parte de vías de señalización a través de las cuales podría estar procediendo el estímulo con IGF2 y que además, son importantes para la adquisición de un fenotipo maligno en diversos tipos de cáncer. En conclusión, el péptido IGF2 tiene la capacidad de aumentar la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de la línea celular, y estos cambios ocurren de manera paralela, y probablemente como consecuencia de alteraciones a nivel epigenético y transcripcional.

PALABRAS CLAVE

Cáncer, Sistema de señalización IGF, Epigenética, Inestabilidad genómica, Expresión génica, Transformación maligna.

ABSTRACT

Effect of IGF2 on the DNA methylation landscape and the associated mRNA expression in the cell line HTR-8/SVneo

The process of placental implantation depends on a thorough regulation of the invasion of the maternal decidua by the cellular subtype known as extravillous trophoblast, invasion of the maternal immune system and remodeling of the local vasculature. These and other processes make the placental implantation remarkably similar to tumor invasion. Cancer cells owe their origin to a loss of somatic cellular identity, accompanied by the development of an aberrant phenotype achieved as a consequence of the stochastic reactivation of embryonic development programs. It is believed that this loss of cellular identity, as well as the reactivation of these programs is owed to a great extent to a loss of genomic stability, which in turn depends on the DNA methylation landscape at the genomic level. It has been observed that extracellular stimuli of diverse kinds are capable of promoting a remodeling of the DNA methylation landscape in somatic cell such that it contributes to a malignant transformation to a highly proliferative, migratory and invasive phenotype, which is owed both to a stochastic activation of oncogenes and a silencing of tumor-repressor genes.

Using trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell line because its pseudo malignant phenotype and as model for the study of placental biology and tumor progression, the purpose of this work was to analyze the functional response of the cell line as a response to a mitogenic stimulus with IGF2, and to determine how this response is related to the variation of the methylation landscape and the transcriptional activity of the cell line. Through interrogation of the genomic methylation landscape and the transcriptional activity of the cell line, some alterations were identified that appear as a consequence of the stimulus and that occur simultaneously with an increase of the proliferative, migratory and invasive activity of the cell line. Many of the genes compromised in these alterations have been previously described in cancer and moreover, take part in signaling pathways through which the IGF2 stimulus could be proceeding and that are important for the acquisition of a malignant phenotype in several types of cancer. In conclusion, IGF2 peptide has the capacity of promoting the proliferative, migratory and invasive capacities of the cell line and these changes happen simultaneously, and probably as a consequence of alterations at epigenetic and transcriptional levels.

KEY WORDS

Cancer, IGF signaling system, epigenetics, genomic instability, genic expression, malignant transformation.

CONTENIDO

Introducción…… 1

Objetivos…… 6

Revisión bibliográfica…….. 7

Metodología…… 12

Aportes del presente trabajo…….. 18

Discusión…… 36

Conclusiones…….. 41

Perspectivas…….. 42

Financiación…….. 44

Bibliografía…….. 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aproximación experimental para evaluar el efecto del IGF2 en el panorama de metilación del ADN y expresión génica en la línea HTR-8/SVneo. 15

Figura 2. Efecto de IGF2 sobre la actividad proliferativa de la línea celular HTR-8/SVneo. 22

Figura 3. Efecto de IGF2 sobre la actividad migratoria de la línea celular de HTR-8/SVneo. 24

Figura 4. Efecto de IGF2 sobre la actividad invasiva de la línea celular HTR-8/SVneo. 25

Figura 5. Selección de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 durante 24h. 27

Figura 6. Selección de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 durante 48h. 28

Figura 7. Niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en vías de señalización identificadas en el análisis de rutas KEGG. 29

Figura 8. Top 10 genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 10 nM. 30

Figura 9. Cambio en los niveles de metilación de la línea celular HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2 10 nM. 31

Figura 10. Impacto del tratamiento con IGF2 sobre el panorama global de metilación de las regiones genómicas en la línea celular htr-8/SVneo a 24 y 48 horas. 34

Figura 11. Impacto del tratamiento con IGF2 sobre el panorama global de metilación en las regiones asociadas a islas CpG en la línea celular HTR-8/SVneo. 35

Figura 12. Análisis de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente metilados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 10 nM. 36

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la función de la placenta es primordial durante la embriogénesis y el desarrollo. El funcionamiento de la placenta depende entre otros factores, de su correcto crecimiento, ubicación e implantación en el tejido materno. En el tejido placentario, el subtipo celular conocido como trofoblasto extravelloso (EVT), es el encargado de la invasión de la decidua materna y de la remodelación de su vasculatura, proceso que permite el aumento de flujo sanguíneo uteroplacentario hacia el embrión a través de la placenta (1, 2).

El linaje celular trofoblástico de primer trimestre presenta similitudes notables con el tejido tumoral (3). Entre estas similitudes, las más sobresalientes son la evasión del sistema inmune del hospedero, la promoción de la angiogénesis –en condiciones de hipoxia-, la alta capacidad proliferativa y el poder de invasión del tejido circundante.

Durante las últimas décadas se ha considerado que el cáncer surge a partir de una única célula. De acuerdo con este modelo, conocido como el modelo clonal genético del cáncer, una serie de alteraciones genéticas que ocurren en tejidos somáticos es responsable de la selección clonal continua de las células cancerosas y de la heterogeneidad celular observada en los tumores sólidos. Esta serie de alteraciones genotípicas y fenotípicas continuadas da paso a la adquisición de las características típicas del fenotipo tumoral, como proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis aumentada, entre otras. Este modelo ha sido respaldado por el descubrimiento de los oncogenes y genes supresores de tumores, a cuya activación y represión aberrante respectivamente se les atribuye la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el gran número de estos genes que se ha descrito sugiere que el cáncer es una enfermedad altamente compleja y que alteraciones en estos dos grupos de genes podrían contribuir a la aparición del cáncer a través de diferentes mecanismos en los tejidos, como de hecho se observa en la práctica. Este modelo además ha permitido la identificación de mutaciones *gatekeeper*, mutaciones que son necesarias para la adquisición de las propiedades fundamentales en las primeras etapas de la progresión tumoral como aquellas que ocurren en el gen APC en el cáncer colorrectal (4) o VHL en el carcinoma de células renales (5).

A pesar de los grandes avances logrados gracias a este modelo clásico del cáncer, se ha observado que esta visión tiene varias limitaciones. Por ejemplo, los cambios genéticos relacionados con la progresión tumoral son, en muchos casos, inconsistentes; en el cáncer colorrectal, que es probablemente el ejemplo mejor estudiado de las alteraciones genéticas en la progresión tumoral, no se han encontrado mutaciones suficientes para algunas etapas específicas de la progresión tumoral además de la mutación *gatekeeper* en un inicio (6).

Se ha sugerido que para la progresión del cáncer colorrectal se necesita no una, sino varias alteraciones mutacionales secuenciales aunque el orden en la aparición de estas alteraciones parece no ser importante (7). Por otra parte, sí se ha identificado cambios a nivel transcripcional que podrían estar ligados con esta propiedad, en ausencia de alteraciones en la secuencia del DNA (8).

Ha resultado difícil compatibilizar las observaciones acerca de la cinética tumoral con la idea de múltiples mutaciones seleccionadas clonalmente. Por un lado, la mayoría de los tumores adultos requiere varios años de exposición al estímulo para ser evidenciados en su forma detectable más temprana. A pesar de que el modelo de las mutaciones múltiples secuenciales podría explicar la progresión tumoral, no hay evidencia de una mutación crítica además de la mutación *gatekeeper* en las etapas más tempranas de la aparición de la enfermedad, de manera que no habría una explicación para la latencia prolongada de la enfermedad. Asimismo, el modelo de las mutaciones múltiples falla en explicar lo prolongado de la progresión tumoral; el desarrollo de un tumor metastático es un proceso que ocurre en múltiples etapas y que frecuentemente toma varios años en completarse. Si se necesitan años para que aparezca el tumor, entonces también debería tomar años para que progrese, teniendo en cuenta que los tumores sólidos no se dividen de forma significativamente más rápida que las células normales (9).

Actualmente se considera que los mecanismos mutacionales no son el único camino que podría conducir a la adquisición del fenotipo canceroso; las alteraciones epigenéticas (alteraciones heredables no basadas en la secuencia del DNA) son rutas alternativas para lograr las alteraciones de la funcionalidad génica. Dichos mecanismos epigenéticos son diversos e incluyen alteraciones en las modificaciones post traduccionales de las histonas, alteraciones en la estructura de la cromatina, regulación por parte de RNA no codificante y de manera llamativa, alteraciones en el panorama de metilación del DNA.

La metilación del DNA es un proceso enzimático a través del cual un grupo metilo (CH_3) es enlazado de forma covalente a la posición 5 de un residuo de citosina en el DNA, para convertirlo en 5-metilcitosina (5mC) y así modular la expresión génica mediante la interacción con complejos proteicos remodeladores de la cromatina de acuerdo con los estados de metilación regionales. En mamíferos, este fenómeno ocurre en palíndromos CpG, parejas simétricas de dinucleótidos de guanina-citosina. En la mayor parte de los casos, cuando esta metilación ocurre sobre la región promotora del gen, el resultado es la represión de la transcripción; sin embargo, cuando ocurre sobre la región codificante (cuerpo del gen), aumenta la actividad transcripcional (10).

La metilación del DNA está involucrada en numerosos procesos, particularmente los importantes durante el desarrollo embrionario como la impronta génica, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de transposones (11). Algunas regiones del DNA enriquecidas en sitios CpG denominadas islas CG (CGI) se encuentran frecuentemente en superposición con regiones promotoras, lo que sugiere que están involucradas en la regulación transcripcional. Las CGIs asociadas con regiones promotoras se encuentran en su mayoría desprovistas de metilación en células germinales y algunas de ellas se encuentran metiladas de forma tejido-específica en células somáticas.

La relación entre la metilación del DNA y la estructura de la cromatina ha sido estudiada ya durante décadas (12, 13) y se sabe que el mantenimiento de los patrones de metilación del genoma es fundamental para mantener la identidad y función celular. El estado de la metilación de la cromatina modula la accesibilidad de la maquinaria transcripcional y, en consecuencia, la expresión de los genes asociados. Como regla general, como una CGI asociada a una región promotora está metilada, la cromatina se encuentra en una estructura condensada evitando la transcripción. Cuando se encuentra demetilada, la estructura de la cromatina es potencialmente accesible a los factores transcripcionales y a la maquinaria de transcripción. El patrón de metilación de CGIs asociadas a promotores está minuciosamente controlado para asegurar que cada tipo celular tenga acceso a los programas transcripcionales requeridos para llevar a cabo sus funciones específicas, mientras al mismo tiempo se previene el acceso a otros programas transcripcionales no relacionados con las funciones de ese tipo celular específico.

La hipometilación global es un factor que contribuye de manera importante a la carcinogénesis humana a través de mecanismos como la activación de oncogenes, la reactivación de transposones y el desencadenamiento de la inestabilidad cromosomal. Uno de los primeros efectos de la hipometilación descritos en cáncer fue la asociación con la activación de oncogenes *ras* en cáncer colorrectales. La asociación entre la hipometilación del DNA y la inestabilidad cromosomal ha sido confirmada en modelos *in vivo* y animales, así como en tejidos tumorales primarios (14). La hipometilación global del DNA se refleja en la demetilación de repeticiones intercaladas, repeticiones en tándem y transposones, favoreciendo rearreglos a nivel cromosomal que resulten en un incremento en la pérdida de heterocigosidad (LOH) después de la mitosis (15, 16). De forma interesante, se ha observado que la hipometilación aberrante del DNA puede conducir a diversas condiciones incluyendo inestabilidad cromosómica, inserción de oncogenes virales, activación de genes promotores del crecimiento como R-Ras y MAPSIN en cáncer gástrico, S-100 en cáncer de colon y MAGE en melanoma (17), y pérdida de la impronta (*loss of imprinting*, LOI) en tumores (18).

Adicionalmente, se cree que la reactivación de procesos específicos de desarrollo embrionario en células con genomas inestables puede contribuir a la expansión tumoral y la metástasis. Específicamente, la alteración en el estado de la metilación del DNA, causada por diversos estímulos extracelulares, es uno de los causantes de la remodelación de la cromatina que conlleva al establecimiento de la arquitectura más abierta presente en células embrionarias (19). En la carcinogénesis, estados restrictivos de la cromatina pueden bloquear el funcionamiento de programas supresores de tumores mientras que estados permisivos tienen la potencialidad de permitir la activación estocástica de oncogenes, ambos eventos favoreciendo la aparición y el desarrollo tumoral. Un estudio realizado recientemente encontró grandes semejanzas entre el panorama de metilación del DNA del linaje celular placentario encargado de invadir la decidua materna y las alteraciones de este mecanismo epigenético en cáncer, sugiriendo que la transición somática hacia el cáncer se debe a la reactivación de programas de desarrollo embrionario, producida por alteraciones en la metilación genómica (20).

Por otro lado, son varios los circuitos moleculares implicados en la consecución de las propiedades proliferativas, invasivas y migratorias del trofoblasto extravelloso, que también participan en la progresión tumoral de las células cancerosas, y que podrían estar relacionados con las alteraciones en la estructura de la cromatina. Las similitudes incluyen alteraciones en la regulación de las moléculas de adhesión, por ejemplo, la sobreexpresión de los receptores de las integrinas α1β1 y αvβ3. También se conoce que la activación del eje fosfatidilinositol 3-kinasa PI3K/AKT es una característica central de ambos tipos celulares para alcanzar sus propiedades altamente proliferativas, invasivas y migratorias.

Varios ejes autocrinos y paracrinos como los del sistema del factor de crecimiento epidermal (EGF)/receptor de EGF (EGFR), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/receptor de HGF (HGFR), y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)/receptor de VEGF (VEGFR) tienen un rol determinante en los procesos proliferativos e invasivos. Se resalta el papel de los factores de crecimiento por ser la principal forma de señales extracelulares que determinan el destino celular (21, 22) y por ser además muy importantes para la actividad proliferativa y la regulación de los procesos relacionados tanto en células tumorales como en tejido placentario. De entre estos sistemas se destaca el sistema IGF (23, 24) que cumple un papel clave en el desarrollo y el cáncer mediante la regulación de procesos celulares tan diversos y tan importantes como proliferación, apoptosis, diferenciación, supervivencia, metabolismo y migración.

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2, IGF2, se considera como el factor más importante involucrado en la proliferación de células placentarias y en la invasión de la

decidua materna durante el embarazo, siendo un regulador mayor del crecimiento embrionario (25), y juega un papel clave en la proliferación tumoral promoviendo la síntesis de proteínas e inhibiendo la proteólisis (23). Varios estudios han encontrado una correlación entre altos niveles de IGF1 y -2 circundantes y mayores riesgos de cáncer.

Se conoce que el gen de IGF2 está sometido a un riguroso control epigenético a través del mecanismo de impronta génica, que se encuentra frecuentemente alterado en cáncer (26). Es posible que una pérdida de la impronta de este gen durante la vida adulta de un individuo, provocada por inestabilidad genómica u otros desórdenes pueda conducir a una sobreexpresión del ligando, lo que podría contribuir a la aparición de la enfermedad. Particularmente, la pérdida de impronta del gen de IGF2 resulta en su expresión bialélica patológica observada en el tumor de Wilms (27), y está relacionada con cáncer de esófago, de ovario y de vejiga (28–30) y con un mayor riesgo de cáncer de colon (31).

HTR-8/SVneo es una línea celular transfectada derivada de trofoblasto humano de primer trimestre que ha sido ampliamente usada como modelo de estudio para la progresión tumoral y para la biología placentaria (32, 33). Esta línea celular es derivada de células de trofoblasto extravelloso y fue desarrollada a partir de un explante primario de placenta e inmortalizada mediante transfección con el antígeno T40 grande del virus del simio (34).
Por lo anterior y por su alta capacidad invasiva y proliferativa, consecuencia de su origen celular placentario, esta línea es considerada como pseudomaligna, por presentar un fenotipo que se caracteriza por ser susceptible a señales que promueven la proliferación, invasión y angiogénesis y al mismo tiempo ser susceptible a señales de anti-crecimiento, lo que la hace ideal para el estudio *in vitro* de los fenómenos que ocurren en la biología tumoral.

Como se ha descrito, han sido grandes los avances hechos en investigación básica del cáncer y en especial en la identificación de los cambios moleculares que subyacen la biología celular del cáncer, particularmente los cambios a nivel de mutaciones somáticas como la amplificación HER2/NEU en cáncer de seno, las mutaciones en el gen ERBB2 en el cáncer de pulmón, las mutaciones en EGFR en cáncer de pulmón y el arreglo BCR-ABL en la leucemia crónica mieloide, descubrimientos que han permitido su abordaje desde un punto de vista terapéutico. Sin embargo, las aproximaciones principales al tratamiento de tumores sólidos todavía implican el tratamiento con radiación o medicamentos altamente citotóxicos.

De forma similar, los descubrimientos hechos en epigenética para determinar las alteraciones no mutaciones que podrían estar contribuyendo a la aparición de la enfermedad también han sido numerosos e importantes, como la hipometilación del DNA,

la hipoacetilación de la cromatina y los cambios en los patrones de metilación de regiones genómicas como promotores y otros que determinan la estructura de la cromatina y con ello, la actividad transcripcional de ciertas ubicaciones genómicas. La hipometilación global del DNA, que conlleva a la inestabilidad genómica global y a una mayor frecuencia tumoral ha sido observada *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos (35–37), así como la activación específica de oncogenes como Ras en cáncer gástrico, y la ciclina D2 y MASPIN en cáncer de páncreas (38–40). El silenciamiento de genes supresores de tumores está asociado con la hipermetilación de regiones promotoras de estos genes y la hipoacetilación de la cromatina, que afecta genes como RB1, p16 (CDKN2A) VHL, MLH1, entre otros (41–44).

Ya que la implantación placentaria es un proceso minuciosamente controlado y es además modulado mediante un delicado balance entre la invasión del trofoblasto y la restricción del crecimiento celular, que los tejidos placentarios invasivos comparten numerosas semejanzas con los tumores metastásicos y que la desregulación epigenética del cáncer se asemeja al panorama epigenético placentario, es de gran importancia elucidar cuáles son las alteraciones epigenéticas subyacentes involucradas en la transformación maligna de las células cancerosas y determinar cuál podría ser el papel de los factores de crecimiento, particularmente IGF2, en estos procesos. Este entendimiento puede proporcionar nuevos enfoques no sólo del efecto de los factores de crecimiento sobre el control epigenético de las propiedades invasivas sino también de su papel en la transición maligna en múltiples tipos celulares. Así, el propósito del presente trabajo fue profundizar en la comprensión de la dinámica y del funcionamiento del control epigenético sobre una línea celular pseudomaligna de origen placentario como modelo de frontera entre la función placentaria controlada y la alteración cancerosa descontrolada. Además, determinar la correlación -si existe- entre las alteraciones a nivel epigenético con la actividad transcripcional y la modificación del fenotipo celular que aparecen bajo estímulos con IGF2. La información en este trabajo es una contribución al cuerpo de estudios requeridos en pro de determinar las particularidades epigenéticas asociadas con el cáncer y su patogénesis.

Como resultado este trabajo constituye la primera evidencia de la que tenemos noticia de que el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 – IGF2 es capaz de modular el panorama de metilación de una línea celular humana. Por otra parte, el análisis realizado nos permitió identificar varias funciones biológicas que podrían estar comprometidas en la alteración del metiloma y/o del transcriptoma. Muchos de los procesos que se identificaron como afectados por el tratamiento hormonal pueden coincidir con los procesos afectados en las primeras etapas de la transformación maligna de las células cancerosas y que podrían contribuir a la aparición de la enfermedad, y pueden hacer parte de un conjunto más grande de alteraciones que constituyen la base del fenotipo canceroso.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar los cambios en el panorama de la metilación del genoma y en la expresión de mRNA de la línea celular HTR-8/SVneo que aparecen bajo estímulos con IGF2 y analizar su relación con la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de la línea celular.

Objetivos específicos

1. Determinar genes que exhiben variaciones en su perfil de metilación en respuesta a estímulos con IGF2 en la línea celular HTR-8/SVneo.
2. Evaluar el efecto de estímulos con IGF2 en la expresión de genes en la línea celular HTR-8/SVneo.
3. Establecer la forma en la que la variación en el perfil de metilación del genoma inducida por IGF2 se relaciona con la subsecuente alteración de las propiedades invasivas, proliferativas y migratorias de la línea celular HTR-8/SVneo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las células cancerosas muestran alteraciones notables en su epigenoma, entre ellas la metilación del DNA. Al respecto, las células cancerosas evidencian una hipometilación global del genoma con una hipermetilación de regiones puntuales conocidas como islas CpG y que frecuentemente coinciden con regiones promotoras que muchas veces resultan ser de genes supresores de tumores (50). El estudio de las alteraciones en los patrones de metilación en cáncer ha sido fructífero en campos como la identificación de causas de la enfermedad, el diagnóstico a través de características biomarcadoras y el diseño de tratamientos correctivos que tienen targets epigenéticos.

El epigenoma celular constituye un andamiaje fundamental para la regulación espaciotemporal de la actividad transcripcional y la modulación de los fenotipos celulares mediante las modificaciones covalentes de histonas y ácidos nucleicos y la estructuración de contactos de largo alcance entre regiones distantes del DNA. Cada vez son más los avances realizados en la comprensión de los fenómenos epigenéticos en múltiples funciones celulares y diversos tejidos, así como en múltiples enfermedades, incluyendo al cáncer. Junto con la metilación del DNA, las modificaciones post traduccionales en las colas de las histonas juegan un papel preponderante en la determinación de la estructura de la cromatina mediante la interacción con complejos proteicos remodeladores de la cromatina, para así modular el acceso de la maquinaria de transcripción a ciertas ubicaciones genómicas de acuerdo con los tipos celulares específicos. Además, la regulación epigenética a través de mecanismos de RNA no codificante juega un papel importante en la regulación de la expresión a nivel gen y cromosoma, determinando la cantidad de transcritos que alcanzan la etapa de traducción.

Avances recientes en la epigenética del cáncer

Recientemente se estableció que el RNA largo no codificante (lncRNA) LINC01419, a través de regulación transcripcional epigenética, promueve la metilación de la región promotora del gen ZIC1 inhibiendo así su expresión, y activa la vía de señalización PI3K/Akt, promoviendo los fenotipos malignos de células de carcinoma hepatocelular *in vitro* e *in vivo* (45). Por otro lado, se ha observado que la N-α-acetiltransferasa D (NatD), que se encarga de la histona H4, reconocida por estar relacionada con los procesos de proliferación celular, promueve las propiedades migratorias e invasivas de células de cáncer de pulmón a través de la represión de la expresión de Slug, un factor de transcripción importante en la transición epitelial-mesenquimal. La sobreexpresión de NatD se correlaciona con la

expresión de Slug, probablemente a través de la modificación de la arquitectura de la cromatina, promoviendo los procesos de transición epitelial-mesenquimal (EMT) y la invasividad (46).

Yusufova *et al*. encontraron que la pérdida de la histona H1 se correlaciona con el desarrollo de linfomas (47). La histona H1 es fundamental en la estructura de los nucleosomas ya que permite su compactación y estabilidad, aunque sus funciones biológicas no están muy bien determinadas (47). El estudio en mención muestra que las alteraciones en la función de la histona H1 tiene efectos drásticos sobre la arquitectura de la cromatina, que a su vez es determinante de la actividad transcripcional modulando el acceso de la maquinaria de transcripción a diferentes regiones del genoma.
Particularmente, la transición hacia un estado más relajado de la cromatina permite la activación estocástica de genes relacionados con el potencial pluripotente celular y conduciendo a la aparición de poblaciones celulares con capacidades proliferativas y de autorrenovación aumentadas, conllevando a la aparición de linfomas altamente resistentes.

La importancia de la estructura de la cromatina en la aparición de leucemias es reforzada por el hallazgo de que el gen aberrante fusionado denominado ZMYND11-MBTD1 (ZM), frecuentemente observado en leucemias mieloides, se colocaliza con genes proleucémicos como Hoxa, Meis1, Myb, Myc and Sox4 y recluta a un complejo acetilador de histonas para así mantener el estado permisivo de la estructura de la cromatina en estas ubicaciones (48).

Por otra parte, se identificó al RNA largo no codificante *RMAS11* como promotor de la metástasis del cáncer colorrectal, como posible biomarcador de la enfermedad y como blanco terapéutico para el tratamiento de la misma (49). Estos y otros hallazgos realizados en el campo de la epigenética del cáncer son importantes porque respaldan la hipótesis de que la alteración de mecanismos de regulación epigenética es suficiente para la consecución de los fenotipos malignos del cáncer y que estas alteraciones son independientes de alteraciones mutacionales en la secuencia del DNA.

Metilación del DNA en cáncer

Varios estudios han identificado una correlación clara entre las alteraciones de los patrones de metilación del DNA y una remodelación de la estructura de la cromatina que resulta en una inestabilidad genómica que conduce o podría conducir al cáncer. Saghafinia *et al*. identificaron alteraciones mutacionales que relacionan a miembros de la vía WNT y factores modificadores de la cromatina con alteraciones en la metilación del DNA (51). Aún más

interesante, se encontró que las alteraciones genéticas y epigenéticas confluyen hacia la alteración de las mismas vías ejerciendo una influencia de mutua estimulación y mantenimiento perpetuando así la progresión maligna. Más aún, la adquisición del panorama de metilación característico de las células cancerosas ha sido confirmado múltiples veces y la evidencia reciente apunta en esta dirección. Un estudio se valió de la técnica CRISPR para identificar eventos causales de la aparición de cáncer de próstata. De manera sorprendente encontraron que las alteraciones en el panorama de metilación del DNA y la ocurrencia de ciertos SNPs se combinan de forma sinérgica para lograr una remodelación de la estructura de la cromatina que resulta causal para el desarrollo de la enfermedad (52).

Adicionalmente, Ando *et al.* evaluaron la estructura de la cromatina y las alteraciones de metilación en regiones promotoras en un modelo de cáncer oral y se confirmó en múltiples tipos de tumores, reforzando la idea de que existe un panorama epigenético común en las células de cáncer que es consecuencia de la inestabilidad genómica que a su vez puede ser consecuencia de estímulos o desórdenes metabólicos (53).

La relación entre el metabolismo de la metionina y la metilación del DNA es fundamental ya que la S-adenosil-metionina (SAM) es la fuente primaria de los grupos metilo con los que se modifica los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG (54). Al respecto, algunos estudios han identificado eventos metabólicos que podrían estar relacionados con las alteraciones epigenéticas que ocurren en las etapas tempranas de la aparición del cáncer; un estudio reciente resalta la particular importancia de las alteraciones en el metabolismo de la metionina en las modificaciones del metiloma observadas en las células cancerosas y, cuantifican la relación que existe entre las alteraciones epigenéticas y del metabolismo y sus implicaciones clínicas (55).

Por su parte, otro estudio encontró que la metformina, medicamento usado para el tratamiento de la diabetes, promueve la salud al ser un inhibidor de las metiltransferasas dependientes de SAM y que esta inhibición ocurre en varios tipos de células cancerosas y no cancerosas de manera que podría ser usado como regulador epigenético-metabólico para la regulación de la maquinaria metabólica directamente relacionada con la metilación del DNA (56). Desentrañar el funcionamiento de las alteraciones epigenéticas que podrían dar origen al cáncer es de fundamental importancia para su comprensión y para prevenir la aparición de la enfermedad.

Respecto a las estrategias de diagnóstico basadas en las alteraciones del panorama de metilación del DNA, estudios recientes muestran que las propiedades fisicoquímicas del

DNA, directamente dependientes de su estado de metilación, servirían para evaluar su potencial como biomarcador en cáncer (57). Específicamente, los investigadores encontraron que el comportamiento polimérico del DNA se encuentra fuertemente influenciado por el patrón de metilación de los sitios CpG y que estos cambios en las propiedades fisicoquímicas (solvatación, afinidad) permiten formular métodos para la detección de biomarcadores de progresión tumoral basado en las propiedades fisicoquímicas que surgen como consecuencia del estado de metilación.

Diseñar estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer ha sido de las tareas más retadoras a las que se ha enfrentado la humanidad. En este campo, a pesar de los significativos avances hechos en la comprensión de la biología del cáncer, los tratamientos más ampliamente utilizados se basan en el uso de moléculas citotóxicas o la irradiación, lo que implica importantes consecuencias negativas a nivel sistémico para el paciente. Por su parte, un avance revolucionario en nuestra era ha sido el desarrollo de la inmunoterapia, aprobada para el tratamiento clínico de muchos tipos de cáncer, tiene menos efectos colaterales sobre la salud de los pacientes y además ha mostrado altas tasas de efectividad. Sin embargo, el alto costo de los tratamientos y los riesgos asociados con las reacciones adversas asociadas a sistemas inmunes sobre reactivos son algunas de las desventajas de la estrategia. De forma alternativa o complementaria a las existentes, están surgiendo las terapias que abordan la enfermedad enfocándose en las características epigenéticas que presentan las células cancerosas, y que el reciente entendimiento de la epigenética tumoral ha permitido que sean más sofisticadas y más especializadas enfocándose especialmente en la modulación de la estructura de la cromatina en diferentes niveles, y esperanzadoras por cuanto las modificaciones epigenéticas, al contrario de las mutaciones somáticas, son reversibles.

Específicamente, para la modulación de la metilación del DNA, que como se ha mencionado tiene una relación estrecha con la estructura de la cromatina, la aproximación más popular ha sido del desarrollo de inhibidores de las enzimas DNA-metiltransferasa (DNMTs). La azacitidina y la decitabina han sido ampliamente usado para este fin desde mucho antes de que se reconociera la importancia y la complejidad de los patrones de metilación en el cáncer y han sido usados para tal fin con un rango relativamente amplio de efectividad. Por otra parte, dos medicamentos recientemente aprobados, el enasidenib y el evosidenib, que tienen como blanco enzimas demetilantes del DNA, han mostrado su efectividad en leucemias pero su efectividad en tumores sólidos está por comprobarse (58, 59). Finalmente, las terapias epigenéticas pueden ser usadas de forma complementaria a las estrategias inmunológicas para lograr avances en el tratamiento del cáncer (60).

Los medicamentos diseñados para inhibir eventos epigenéticos se han enfocado en las DNMTs pero también pueden ser usados para abordar otras enzimas, que en conjunto pueden provocar cambios en el genoma de las células cancerosas a nivel de reactivación de transposones virales que establecerán un estado que mimetiza un entorno viral, lo que resulta en una célula cancerosa más susceptible de ser detectada por las células del sistema inmune aumentando así la efectividad de la inmunoterapia.

De manera sobresaliente, Bronchud y colaboradores identificaron similitudes epigenéticas significativas entre tejidos placentarios y cancerosos del mismo paciente con cáncer de mama durante el embarazo (61). En este estudio, Bronchud y colaboradores utilizaron un microarreglo más novedoso que el mencionado anteriormente para el análisis del metiloma de tejidos sanos y cancerosos, el *Infinium MethylationEPIC* de Illumina. Este nuevo microarreglo utiliza la misma tecnología que el Illumina HumanMethylation 450K pero determina más de 850.000 sitios CpG en comparación con los 450.000 que se podían determinar con el modelo anterior. En general, los investigadores proponen la existencia de un interruptor epigenético que controla los programas invasivos/evasivos en el tejido placentario y que puede ser utilizado por las células cancerosas para alcanzar su fenotipo maligno, principalmente con respecto a la modulación del sistema inmune del hospedero.

Los resultados de Tai *et al*., muestran que el incremento de IGF2 en suero y la alteración en el estado de la metilación en su correspondiente gen podrían ser usados como biomarcadores para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, y de manera especial, que la metilación del DNA podría ser un blanco terapéutico para el tratamiento de esta condición (62). Los investigadores determinaron el estado de metilación del promotor del gen *IGF2* y la activación transcripcional asociada en tejidos de hígado de rata sometidos a un tratamiento con 2-acetilaminofluoreno, un agente carcinogénico. Encontraron una relación clara entre la tasa de demetilación de la región genómica y la condición del tejido (no canceroso, precanceroso y canceroso) y entre la expresión anormal de IGF2 y el grado de diferenciación, la invasión tumoral y HBV-DNA, así como una correlación negativa entre el grado de metilación del promotor P3 del gen IGF2 y la expresión de IGF2.

Epigenética de HTR-8/SVneo

Los avances realizados en la epigenética del fenotipo invasivo son numerosos y muestran la complejidad del proceso, principalmente en cuanto a la regulación de la expresión génica por parte de los mecanismos basados en RNAs no codificantes. Se descubrió que el microRNA miR-92a-1-5p controla el fenotipo invasivo de la línea celular HTR-8/SVneo a

través de la modulación de la activación de MAPK y FAS, que a su vez incrementa la producción de las proteínas efectoras de la invasión MMP-2 y MMP-9, y que este fenómeno ocurre en respuesta al tratamiento con factor de crecimiento epidermal (EGF) (63), un estímulo extracelular conocido por constituir una señal poderosa de diferenciación, proliferación e invasión celular en esta línea celular y en varios tipos de cáncer (64, 65). Un estudio similar refuerza la importancia de la regulación epigenética a través de miRNAs en la línea celular HTR-8/SVneo mediante el hallazgo de la modulación de la capacidad invasiva de la línea celular a través de microRNA 145-5p. El efecto negativo que tiene el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) sobre la línea celular ocurre a través de la estimulación de la producción de miRNA 145-5p, que su vez interactúa de forma física con la región no codificante de Cyr61, que codifica para un factor de crecimiento que promueve la adhesión de células epiteliales y que tiene un efecto estimulante sobre la capacidad invasiva de la línea celular. De forma especialmente llamativa, se observó la interacción del micro RNA con una región regulatoria distante de la región promotora pero que tiene efectos importantes a nivel post transcripcional (66).

Smith *et al.,* identificaron cambios en el perfil de metilación de tejido embrionario estimulado con el factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4) y con CHIR, un agonista de WNT. Sorprendentemente, este cambio condujo a una nueva subpoblación celular cuya metilación se asemejó notablemente a la de tejido extraembrionario. El cambio en el perfil de metilación procede a través de las dos vías de señalización que están involucradas en varios procesos celulares corriente abajo y frecuentemente desregulados en cáncer (20). Específicamente, la sensibilidad a FGF ocurre a través de la señalización RAS/MAPK/ERK que tiene un potencial oncogénico extensivo y roles putativos en el establecimiento del metiloma canceroso.

El presente trabajo se enmarca en el cuerpo de contribuciones para la elucidación de los primeros eventos en la aparición de cáncer en cuanto busca ayudar a describir algunas de las primeras alteraciones epigenéticas que ocurren en la adquisición del fenotipo maligno y sus implicaciones tanto en los eventos de implantación placentaria como de progresión tumoral.

METODOLOGÍA

Este trabajo se planteó como un estudio exploratorio para determinar los cambios en el panorama de metilación en la línea celular HTR-8/SVneo como modelo de progresión tumoral temprana bajo estímulos con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2, relacionar estos cambios con alteraciones en la actividad transcripcional de la línea celular e interpretar las implicaciones biológicas de los eventos observados.

Para cumplir los objetivos planteados se recurrió a técnicas de interrogación de cambios a nivel de genoma para asociar diferentes características, de manera que este estudio puede ser catalogado como un estudio de asociación epigenómica, EWAS, por sus siglas en inglés. La línea celular HTR-8/SVneo se sometió a estímulos con el péptido IGF2. El metiloma de las células estimuladas se interrogó mediante una tecnología de hibridación con sondas en un microarreglo desarrollada por Illumina. Asimismo, el cambio en la actividad transcripcional de las células estimuladas se evaluó mediante la secuenciación de todo el transcriptoma. Para ello, el mRNA se enriqueció, amplificó y secuenció mediante la tecnología de secuenciación de Illumina, que permite detectar y secuenciar el mRNA. Un análisis computacional de los dos sets de datos permitió encontrar cambios significativos en el metiloma y en el transcriptoma, que aparecieron luego del tratamiento con el péptido IGF2. Con esta información se realizó un análisis de los genes que comparten alteraciones en los dos frentes y de rutas biológicas que resultan implicadas por el estímulo y a través de las cuales se podría estar adquiriendo el fenotipo observado en la línea celular.

En detalle, la línea celular se cultivó en condiciones basales y bajo tratamiento con el péptido IGF2 a una concentración de 10 nM, esta última se denominó condición de estímulo. Los cambios en la actividad transcripcional de la línea celular se evaluaron en los tiempos de 0, 24 y 48h, mediante RNAseq comparando el tratamiento hormonal con las condiciones control. De manera similar, los cambios en panorama de metilación de la línea celular se evaluaron comparando la condición estimulada con la condición basal a los tiempos de 0, 12, 24 y 48h mediante la tecnología Infinium MethylationEPIC de Illumina. Asimismo, los cambios en el fenotipo funcional de la línea celular promovidos por el estímulo se determinaron evaluando la actividad proliferativa, migratoria e invasiva. Finalmente, se contrastaron los datos de metilación y expresión diferencial de la línea celular con el fin de, mediante un análisis de anotación biológica funcional, proponer las posibles implicaciones de estos hallazgos a nivel de fenotipo.

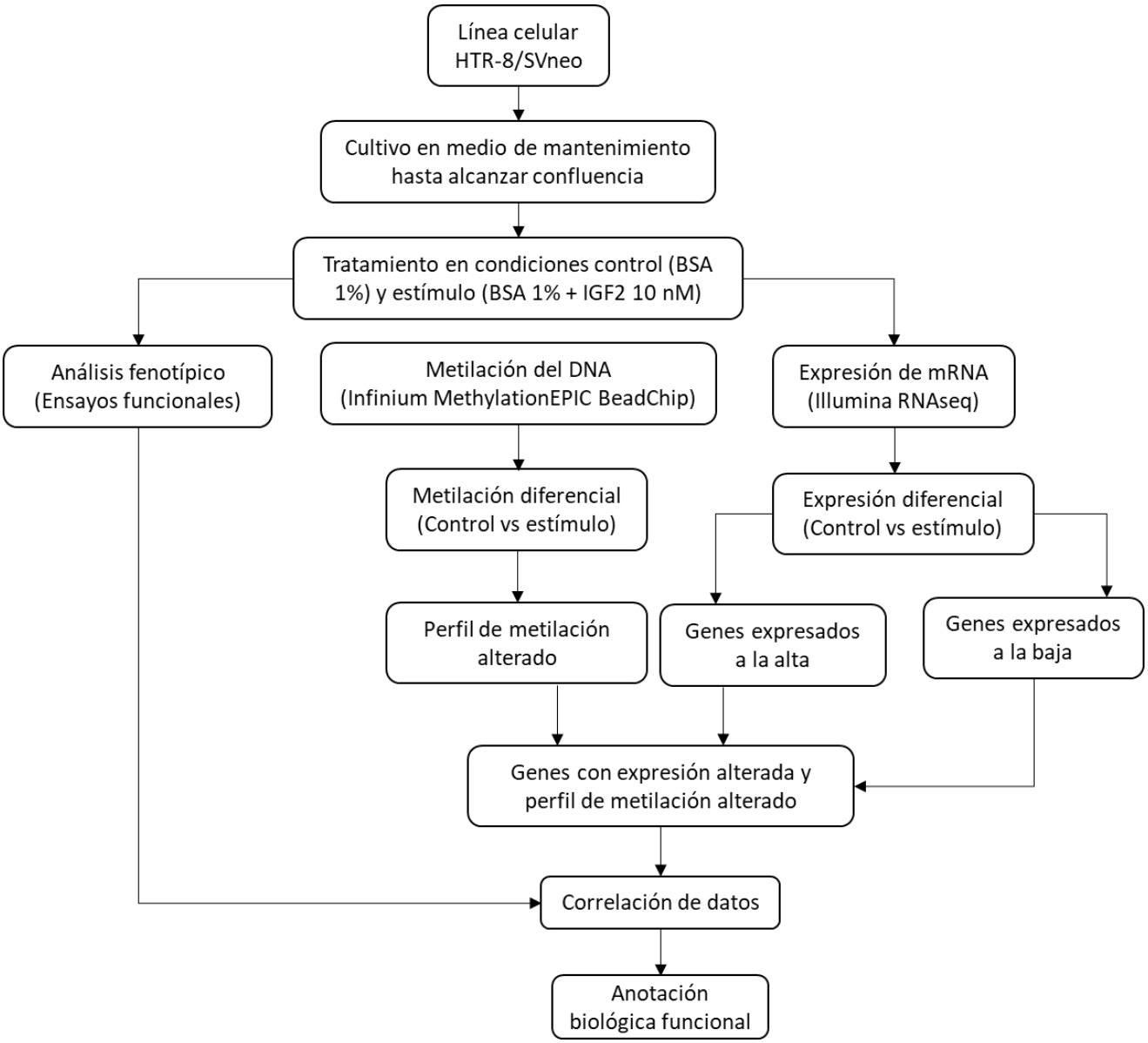

Figura 1. Aproximación experimental para evaluar el efecto del IGF2 en el panorama de metilación del DNA y expresión génica en la línea HTR-8/SVneo.

Cultivo celular

La línea celular HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271™) se cultivó en medio Dubelco's Modified Eagle's Medium DMEM (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) hasta alcanzar una confluencia del 80%. Durante el mantenimiento del cultivo celular y los diversos ensayos la línea celular se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%.

Estímulo

Para determinar el efecto del péptido IGF2 sobre las propiedades de la línea HTR-8/SVneo, las células se privaron de suero fetal bovino durante 4 horas, al cabo de las cuales se aplicó el estímulo con IGF2 a una concentración de 10 nM (Figura 1). Las células se cultivaron durante 0, 12, 24 y 48 horas en medio DMEM con albumina sérica bovina (BSA) al 1% con (condición estimulada) o sin IGF2 (condición control). La concentración de IGF2 se seleccionó con base en estudios preliminares realizados en el grupo de investigación, en los que se evidencia respuesta fisiológica del cultivo HTR-8/SVneo y otros estudios en los que evaluaron los niveles biodisponibles del péptido en pacientes con diferentes tipos de cáncer. La concentración se encuentra cerca al límite superior del rango descrito (2-10 nM) (67–72). Los tiempos de estímulo se seleccionaron con base en estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación (73–75) y por otros investigadores (76, 77). En estos tiempos se ha observado respuesta fisiológica de células de trofoblasto humano bajo estímulos con IGF2.

Extracción de DNA genómico y RNA total

El DNA genómico y el RNA total se extrajeron del cultivo celular de HTR-8/SVneo usando los kits QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y QIAgen RNAeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) respectivamente, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La cantidad y la calidad del DNA genómico y del RNA se estimaron con Nanodrop (Thermo Scientific™) y mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. La relación 260/280 estuvo entre 1,71 y 1,88 para todas las muestras de DNA y entre 1,89 y 2.02 para las muestras de RNA. Los patrones de migración en los geles de agarosa no evidenciaron degradación en ninguno de los dos grupos de muestras. Para las muestras de RNA, la integridad se estimó mediante la determinación del número RIN (78), que, en todas las muestras, fue superior a 7,4.

RNAseq

El análisis de la expresión global de mRNA se realizó mediante RNAseq. La secuenciación se realizó por triplicado para cada una de 6 muestras (18 muestras en total). Luego de la verificación de la calidad de las muestras de RNA total, el mRNA se enriqueció usando perlas de oligo dT. Luego, el mRNA se fragmentó de forma aleatoria usando un buffer de fragmentación, enseguida se sintetizó el cDNA usando el mRNA enriquecido como plantilla y *primers* hexaméricos aleatorios. Posteriormente, se adicionaron dNTPs, *second-strand synthesis* buffer (Illumina), RNAasa H y DNA polimerasa I para proceder con la síntesis de segunda hembra (*second-strand synthesis*). Luego de ligación A y ligación de secuencias adaptadoras específicas, la librería de cDNA se completó mediante una filtración por tamaño y un enriquecimiento mediante PCR.

El control de calidad al que se sometió la librería final consistió en tres pasos:
1) La concentración de la librería se determinó por fluorometría en el equipo Qubit 2.0.
2) El tamaño de los insertos se determinó en el equipo Agilent 2100.
3) La concentración efectiva de la librería se cuantifico mediante qPCR.

Las librerías cualificadas se unificaron de acuerdo con la concentración efectiva y a la cantidad requerida y usadas como input para la secuenciación en la plataforma Illumina Hiseq2500. Esta tecnología de secuenciación denominada secuenciación por síntesis (Sequencing By Synthesis, SBS) es una estrategia de secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing, NGS) que detecta bases individuales a medida que van siendo incorporadas a hebras de DNA en elongación, con base en una plantilla complementaria. Para ello, un marcador fluorescente reversible es escaneado cada vez que se incorpora un nucleótido, y luego removido para permitir la incorporación del siguiente nucleótido. Siendo que en el momento de la incorporación los cuatro tipos de nucleótidos están presentes en el medio, se minimiza el sesgo por incorporación.

Los datos en formato FASTQ obtenidos en la etapa de secuenciación se analizaron usando el protocolo de análisis RASflow (RNA-Seq Analysis Snakemake Workflow) escrito en Python y basado en snakemake (79). Este protocolo permitió ejecutar todas las etapas del análisis de los datos de secuenciación desde la verificación del control de calidad, pasando por el alineamiento, hasta la cuantificación y el análisis de la expresión diferencial. El protocolo comenzó con la evaluación de la calidad de los *reads* generados en la etapa de secuenciación mediante la herramienta FASTQC (80). Luego de evaluar la calidad de los *reads*, el usuario tiene la potestad de decidir si someterlos a un proceso de *trimming,* de ser necesario es realizado con la herramienta TrimGalore (81). Luego de esta segunda etapa, la calidad de los *reads* se evaluó nuevamente para verificar su mejora y se procedió con los módulos de análisis. Estos consisten en alineamiento, cuantificación y análisis de expresión diferencial. El alineamiento se realizó contra el transcriptoma humano, de acuerdo con las recomendaciones del diseñador del protocolo (79), mediante la herramienta Salmon (82), que además cuantificó los transcritos. Finalmente, el protocolo contempló la realización de un análisis de expresión diferencial, comparando control versus estímulo, que se realizó con la herramienta DeSeq2 (83), que provee una lista de los genes diferencialmente expresados (debajo de un valor predefinido FDR < 0,05).

Evaluación de los niveles de 5mC

El contenido de 5mC en las muestras de DNA genómico (gDNA) se determinó mediante inmunodetección usando el kit MethylFlash Global DNA methylation (5-mC) ELISA easy kit

(Epigentek Group; Farmingdale, NY, USA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, 100 ng de DNA genómico se sometieron al tratamiento y la fracción de DNA metilado se detectó en una configuración de captura-inmunodetección basada en la lectura del valor de absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas modelo 680 (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, USA).

Análisis de metilación de DNA genómico

El análisis de metilación se realizó usando la tecnología Infinium MethylationEPIC de Illumina (84, 85). Un total de 500 ng de DNA genómico del cultivo celular de HTR-8/SVneo sometido a condiciones sin tratamiento (control) o tratado con IGF2 10 nM a diversos tiempos, se trató con bisulfito usando el EZ DNA methylation kit (Zymo Research Corporation, Irvin, CA, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La metilación del DNA se analizó usando el microarreglo Infinium Human MethylationEPIC BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), que contiene 866.836 sondas anotadas a diferentes regiones genómicas dependiendo de su ubicación relativa con respecto a un gen o a una isla CpG para interrogar la metilación de sitios CpG (85).

El DNA convertido con bisulfito se usó para realizar el análisis de metilación con el ensayo Infinium de acuerdo con el protocolo estándar Infinium HD Assay Methylation Protocol (Part # 15019510, Illumina). A continuación, el microarreglo se escaneó en el equipo Illumina iScan. Los valores crudos de intensidad de metilación (IDAT) para cada sitio CpG, que son representados como valores β se calcularon usando el módulo de metilación del software Illumina GenomeStudio 2.0. Los valores β se calcularon así:

$$\beta = \frac{M}{U + M + 100}$$

Donde:

$U =$ Intensidad de la sonda no metilada
$M =$ Intensidad de la sonda metilada

Los datos IDAT crudos obtenidos en el ensayo con el microarreglo MethylationEPIC se analizaron usando el software GenomeStudio® y el protocolo de análisis RnBeads 2.0, escrito en R (versión 3.2.1) (86). Este protocolo permite realizar todas las etapas de análisis de los datos IDAT obtenidos en la etapa de hibridación, desde la normalización y el procesamiento hasta la identificación de sitios y regiones diferencialmente metilados. Todas las muestras superaron los criterios de control de calidad de GenomeStudio® basados

en sondas control integradas en el microarreglo para verificar la calidad de la tinción, hibridación, extensión y especificidad, y mostraron una alta eficiencia de conversión con bisulfito, con intensidades de señal por encima de 4000 (87). Tanto el microarreglo Infinium Human MethylationEPIC como su predecesor, el microarreglo Human Methylation450K se ha reportado que tienen sondas con reactividad cruzada, estas son sondas que han resultado alinear con más de una ubicación genómica y que pueden dar falsos positivos de hibridación por este motivo (88).

En nuestro análisis, todas estas sondas se removieron durante la etapa de control de calidad y, por lo tanto, excluidas de análisis posteriores. Estas etapas de control de calidad se aplicaron para minimizar los errores y remover las señales de baja calidad. Se incluyeron correcciones de background y normalización por intensidad de tinción. Todas aquellas sondas con un p-valor de detección superior a 0.05 se excluyeron de los análisis posteriores. La corrección por background se realizó sustrayendo la media del valor M de las 600 sondas control negativas y los datos de metilación se normalizaron mediante el método BMIQ (beta-mixture quantile nomalization method) (89).
Después de las etapas de control de calidad, se obtuvieron datos de metilación del DNA correspondientes a 805158 sondas. A continuación, los valores beta se convirtieron a valores M, que tienen mejores atributos estadísticos, para los análisis bioinformáticos y estadísticos posteriores (90):

$$M = log2\left(\frac{\beta}{1-\beta}\right)$$

Finalmente, la determinación de las sondas que presentaron metilación diferencial entre la muestra control y la muestra tratada con IGF2 se realizó de forma pareada a través de un modelo de regresión lineal usando la herramienta Limma (91) y los valores M, que se ajustaron utilizando un valor umbral de beta absoluto superior a 0.2, es decir, un cambio en el estado de metilación superior al 20%. Dado que los valores beta son más fáciles de interpretar biológicamente que los valores M, éstos se reconvirtieron a valores beta para describir los resultados de la metilación del DNA. La anotación de los genes asociados a cada sitio CpG se realizó usando el documento “MethylationEPIC manifiest file” de Illumina (92).

Anotación biológica funcional

Los genes identificados como diferencialmente expresados y/o metilados se sometieron a una anotación biológica funcional mediante la herramienta online Enrichr (consultada el 27 de julio y el 20 de noviembre de 2020 y entre el 5 y el 8 de febrero de 2021). Para este

análisis, los códigos ID de Ensembl de los correspondientes genes se usaron como identificador y el genoma humano de referencia (RefSeq GRCh38.p13) se usó como referencia. Enrichr (93) es una herramienta online que permite la anotación biológica funcional de listas de genes de cualquier tamaño. Esta herramienta integra el conocimiento provisto por numerosos proyectos de anotación biológica de alta calidad para proveer información sintetizada acerca de listas de genes mamíferos. Particularmente, el propósito en su diseño fue integrar el mayor número posible de proyectos, permitiendo ejecutar simultáneamente los cálculos de significancia estadística para las listas de genes sometidas, y proveyendo herramientas altamente ajustables para la visualización de la calidad y la pertinencia de los resultados. Asimismo, usamos las bases de datos KEGG para la anotación de las vías biológicas enriquecidas con nuestros sets de genes, y las bases de datos Gene Ontology (GO) para la anotación biológica funcional de los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares derivados de ellos.

Ensayos de actividad biológica

Los ensayos de actividad biológica se plantearon para evaluar el cambio en las actividades proliferativa, invasiva y migratoria de las células estimuladas con IGF2 con respecto a la condición control sin estímulo y así determinar su relación con los cambios a nivel de metilación del DNA y actividad transcripcional promovidos por el estímulo.

Ensayo de proliferación celular

La capacidad mitogénica del péptido IGF2 ha sido ampliamente estudiada y es bien conocida en líneas celulares sanas y cancerosas. Para evaluar esta capacidad del péptido IGF2 sobre la línea celular HTR-8/SVneo, se sembraron $5x10^3$ células por pozo en una placa de 96 pozos. Una vez se adhirieron las células y luego de una depleción de suero fetal bovino durante 4 horas, se colocaron los estímulos en medio DMEM, BSA 1% para la condición control y BSA 1% + IGF2 10 nM para el tratamiento. Las células se cultivaron durante 48 horas. El número de células en cada tratamiento se determinó mediante la tinción de los núcleos con una solución de Hoechst 33342 en una dilución 1:5000 en PBS, se incubó durante 15 minutos en oscuridad, se retiró el exceso de reactivo y finalmente se contaron las células en un microscopio de fluorescencia EVOS M5000 (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) usando la herramienta de conteo incluida en el software del equipo. Cada tratamiento se evaluó por triplicado y el experimento se realizó tres veces.

Ensayos de migración celular

En una placa de 12 pozos se sembraron ~$2x10^5$ células y se cultivaron hasta alcanzar su crecimiento en monocapa. Luego, se utilizó una punta de micropipeta de 200 µL estéril para rasgar una herida lineal en cada monocapa. Las células despegadas se removieron lavando

con 1 mL de PBS. Luego, se adicionó nuevo medio DMEM con los tratamientos correspondientes (BSA 1% y BSA 1% + IGF2 10 nM) y se tomaron imágenes fotográficas para monitorear el cierre de la herida durante 48 horas usando un microscopio Leica DM IL (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó usando el software TScratch (v 1.0) (94), que calcula el área de la herida abierta para cada imagen tomada. El porcentaje de área de herida se graficó para cada tratamiento a lo largo del tiempo. Cada valor se presenta como la media del porcentaje de herida abierta calculada con el registro de 10 imágenes. El experimento se replicó tres veces.

Ensayos de invasión celular

Para este ensayo se determinó el número de células invasivas que lograban llegar a la membrana de una cámara Transwell (Costar) después de atravesar una matriz proteica sintética. El tamaño de los poros de la membrana de las cámaras Transwell fue 8 µm. La membrana de la cámara superior se recubrió con 50 µL de Geltrex™ (Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Luego de la solidificación, 100 µL de la suspensión celular en medio DMEM, equivalente a $2x10^5$ células se depositaron en la cámara superior. En la cámara inferior se colocó 500 µL de medio con el correspondiente estímulo de IGF2 10 nM o medio basal. Luego de 24 horas, se removieron las células de la parte superior de la membrana, se hicieron lavados con PBS para remover las células no invasivas. Las células que quedaron en la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con una solución de Hoechst 33342 en una dilución 1:5000 en PBS, se incubó durante 15 minutos en oscuridad, se retiró el exceso de reactivo y finalmente se contaron las células en un microscopio de fluorescencia EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) usando la herramienta de conteo incluida en el software del equipo. Los núcleos de las células invasivas se contaron en cada uno de tres pozos por tratamiento y el experimento se realizó por duplicado.

Tratamiento estadístico y análisis de los datos

Todos los valores son presentados como la media de las réplicas correspondientes en cada procedimiento ± desviación estándar (SD), a menos que se indique lo contrario. El nivel de significancia se calculó mediante test de comparaciones múltiples o test estadísticos para sets de datos no paramétricos según correspondiera en cada caso. Un valor de p-value < 0,05 se consideró como estadísticamente significativo. Para los análisis se utilizó el software estadístico Prism® GraphPad.

APORTES DEL PRESENTE TRABAJO

AUMENTO DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA, MIGRATORIA E INVASIVA DE LA LÍNEA CELULAR EN RESPUESTA AL ESTÍMULO CON IGF2

Para investigar la respuesta fisiológica de la línea celular HTR-8/SVneo al estímulo con IGF2, se determinó la variación en la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de las células cultivadas bajo condiciones control o bajo estimulo hormonal de IGF2 durante diferentes tiempos. Estas tres propiedades celulares son fundamentales tanto para la adquisición del fenotipo maligno característico de los tumores como para la implantación de la placenta en el embarazo.

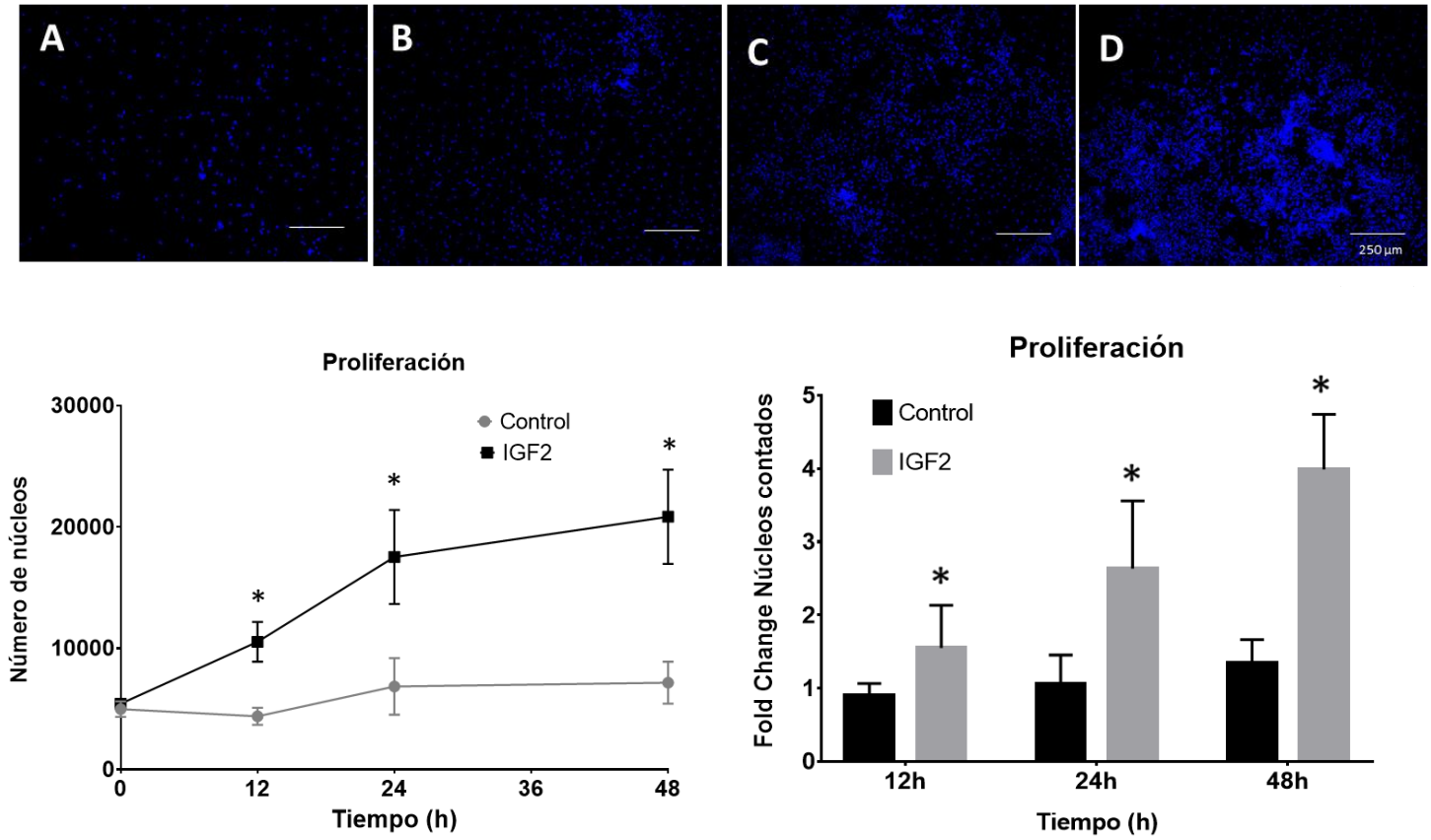

Figura 2. Efecto de IGF2 sobre la actividad proliferativa de la línea celular HTR-8/SVneo. El número de células HTR-8/SVneo en cultivo con o sin IGF2 se siguieron por tinción con Hoescht 33342® desde el inicio del estímulo y hasta 72 horas. **Arriba:** Imágenes representativas de núcleos registrados para cada tiempo (A = 0h, B = 12h, C = 24h y D = 48h). **Izquierda:** Número de núcleos contados para cada condición a cada tiempo. **Derecha:** Fold-change del número de núcleos en el cultivo celular contados en cada tiempo de tratamiento relativo a cada tratamiento a 0h. Los datos se presentan

como el promedio de tres réplicas en tres experimentos independientes ± SD (n=3) . IGF2 vs Control (* = $p < 0,05$).

Respecto a la actividad proliferativa, encontramos un aumento significativo en el número de células en respuesta a la adición de IGF2 mostrado como el fold-change (tasa de cambio) con respecto al tratamiento control sin estímulo en todos los tiempos evaluados (Figura 2).

Posteriormente se evaluó el efecto del estímulo hormonal sobre la actividad migratoria de la célula mediante ensayos de cierre de la herida midiendo el porcentaje de superficie de la herida abierta, tomando como 100% el área de la herida al inicio del experimento (Figura 3). Se encontró que el tratamiento con IGF2 promueve un cierre de la herida 4 veces más rápido en comparación con el tratamiento control; a las 72h de tratamiento, la diferencia en el porcentaje de cierre de herida es 75%.

Teniendo en cuenta esta medida de migración celular se procedió, como se describió previamente, a determinar la proporción de células invasivas o que lograban atravesar una capa de Geltrex® y depositarse en la membrana de un sistema Transwell. Se encontró que el número de células estimuladas con IGF2 que invadieron la membrana fue 3,03 veces mayor a las que invadieron en la condición control (Figura 4).

En los tres casos, se encontró que el estímulo con el péptido promovió un aumento en la actividad de las propiedades funcionales (proliferación, migración e invasión) de la célula, propiedades que en conjunto constituyen la base del fenotipo maligno altamente proliferativo e invasivo de las células metastáticas. IGF2 es reconocido por ser un agente mitógeno poderoso en esta línea celular y en varios subtipos celulares incluyendo diferentes tumores, de manera que el aumento en las actividades de las propiedades funcionales de la línea celular que aparecen por efecto de la estimulación con IGF2 concuerda con los reportes hechos previamente (95, 96) y corresponde con una progresión hacia el fenotipo invasivo que exhiben los tumores metastáticos.

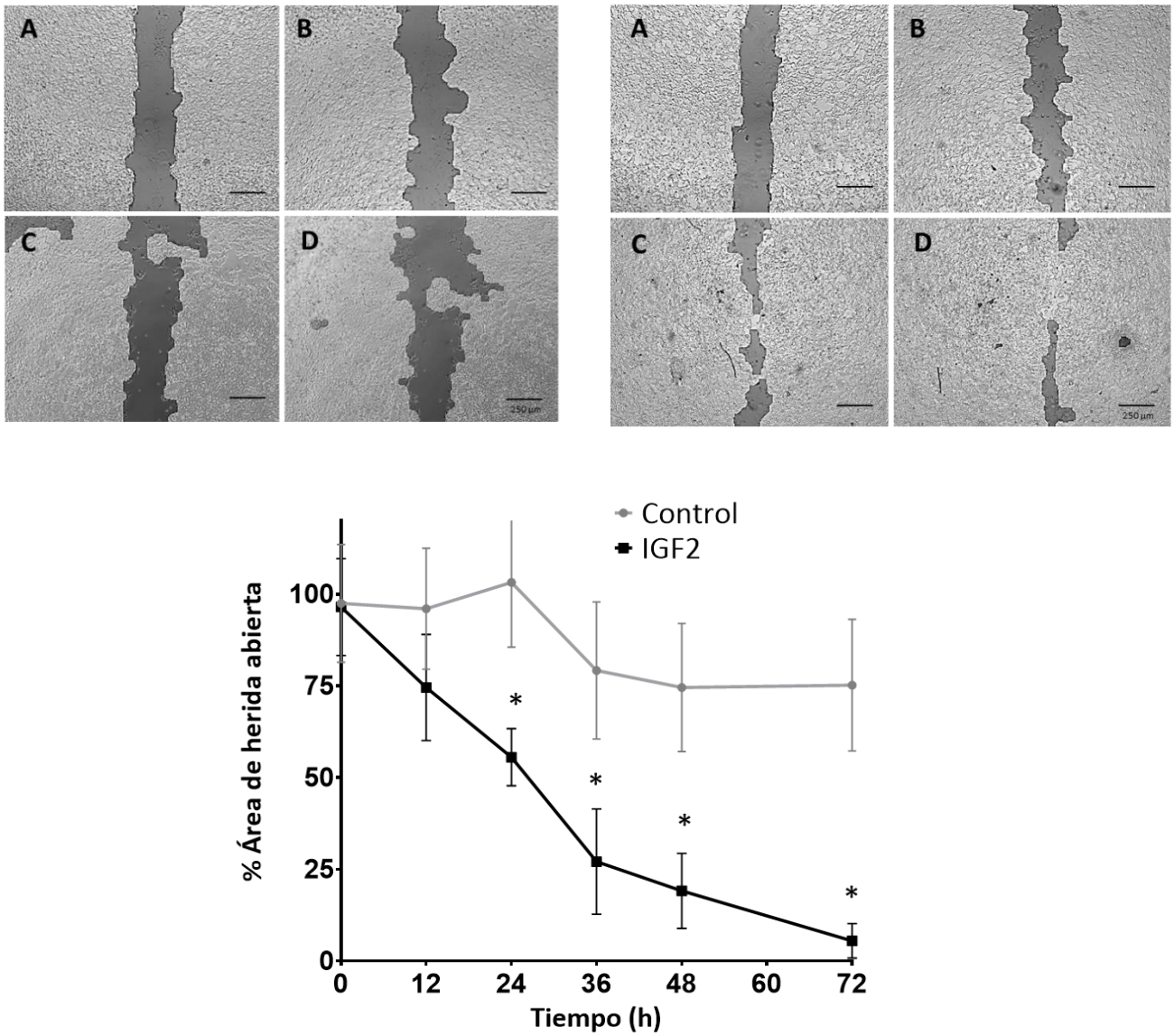

Figura 3. Efecto de IGF2 sobre la actividad migratoria de la línea celular de HTR-8/SVneo.
Se realizó una herida sobre una monocapa de células HTR-8/SVneo a confluencia y se monitoreó el cierre de ésta en los tiempos indicados tras incubación con IGF2 10 nM o en condiciones control. **Arriba:** Imágenes representativas de la secuencia del cierre de la herida para el tratamiento control (Izquierda) e IGF2 10 mM (Derecha) (A = 0h, B = 12h, C = 24h y D = 48h). **Abajo:** Porcentaje de área de la herida abierta para cada tiempo evaluado. El área de la herida a tiempo 0 se tomó como 100%. Los datos se presentan como la media ± SD del porcentaje de herida abierta determinado con 10 campos (n = 30). (IGF2 vs Control * = $p < 0,05$)

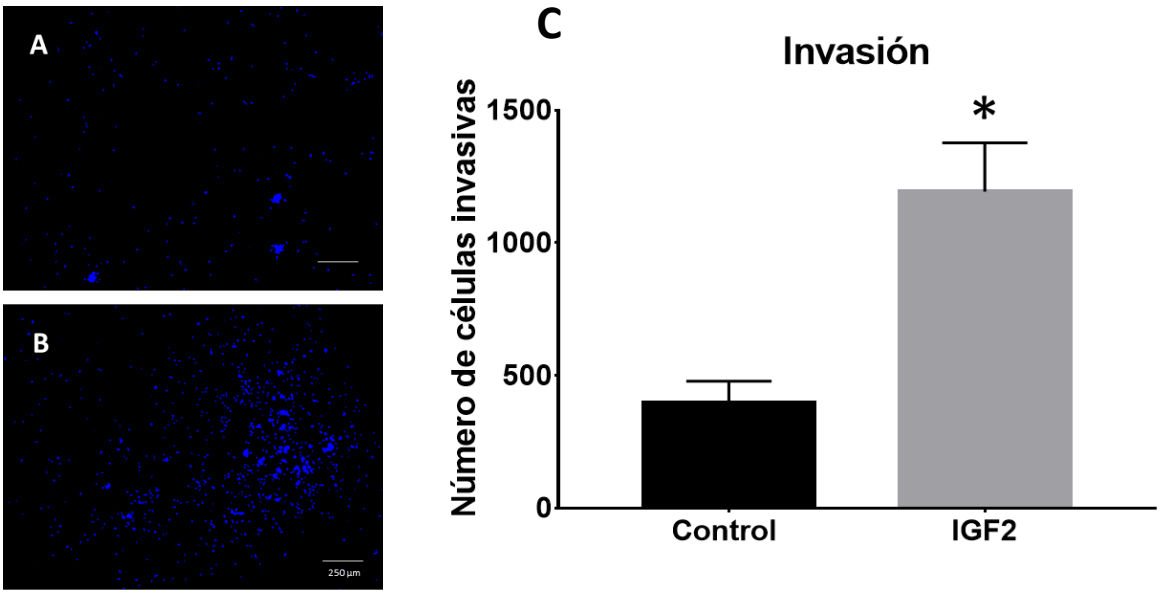

Figura 4. Efecto de IGF2 sobre la actividad invasiva de la línea celular HTR-8/SVneo. La capacidad del péptido IGF2 para promover la actividad invasiva de la línea celular HTR-8/SVneo se determinó a 24 horas, usando una concentración de péptido de 10 nM. **Izquierda:** imágenes representativas del número de células invasivas para cada tratamiento (A = Control, B = IGF2 10 nM). El número de células invasivas (C) se determinó contando los núcleos teñidos con Hoescht 33342® de las células que invadieron a través de una capa de Geltrex®. Los datos se presentan como la media del número de células invasivas ± SD (n = 6). IGF2 vs Control (* = $p < 0,05$)

IGF2 influye sobre la expresión de mRNA en las células HTR-8/SVneo

El impacto que tiene el estímulo hormonal sobre la actividad transcripcional de la línea celular pudo observarse con los datos de expresión de mRNA obtenidos por RNAseq de células en cultivo bajo condiciones control o bajo condiciones estímulo. Los datos en esta etapa permitieron identificar varios genes que se expresaron diferencialmente en células de trofoblasto estimuladas con IGF2 en comparación con la condición control (Tabla suplementaria S1). La corrección por testeo múltiple usando un FDR predeterminado por debajo del 5% (valor $q < 0.05$) permitió identificar 170 genes diferencialmente expresados a las 24h, mientras se identificaron 172 genes a las 48h.

El enriquecimiento de los genes identificados como diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2, se realizó con un análisis de rutas biológicas en la base de datos KEGG usando la herramienta online de búsqueda y enriquecimiento Enrichr. Estos análisis de rutas biológicas incluyeron la lista de todos los genes

diferencialmente expresados o dividiendo este conjunto de genes entre regulados a la alta y regulados a la baja (Tablas suplementarias S2 y S3). Una selección de las rutas biológicas enriquecidas con cada grupo de genes se presenta en las figuras 5 y 6 para el estímulo realizado a las 24h y a las 48h, respectivamente. Esta selección se realizó teniendo en cuenta la pertinencia de los términos, y se incluyeron aquellos términos que se repetían a 24 y 48h. De esta lista de rutas biológicas es importante resaltar especialmente que los términos "*Human papillomavirus infection"* y *"citokine-citokine receptor interaction"* resultan enriquecidos tanto a 24 h como a 48 h con los correspondientes genes expresados a la baja para cada tiempo. De manera igualmente llamativa, las vías *"Chemokine signalling pathway", "Insulin signalling pathway", "relaxin signalling pathway"* y *"Human papilomavirus infection"* aparecen como enriquecidas tanto a 24 como a 48h con los genes expresados al alta en cada tiempo.

Adicionalmente, de las vías biológicas enriquecidas con la lista total de genes diferencialmente expresados, aparecen tanto a 24 h como a 48 h los términos *"Cytokine-cytokine receptor interaction", "Human papilloma virus infection", "Neurotrophin signalling pathway" e "Insulin signalling pathway".* Lo anterior sugiere que a pesar de que el estímulo no promueve el establecimiento de un perfil de expresión claramente definido y que se mantenga estable a lo largo del tiempo, sí logra involucrar algunos sistemas celulares comunes a lo largo del tiempo. La figura 7 muestra estos perfiles de expresión de una forma más clara, en las rutas en común enriquecidas a 24 y a 48h para todos los genes diferencialmente expresados. De estas gráficas se aprecia la alteración de los niveles de expresión de los genes miembros en cada vía biológica comprometida. Finalmente, la figura 8 muestra los genes cuya expresión resultó más alterada para cada tiempo y en total para los dos tiempos de estímulo.

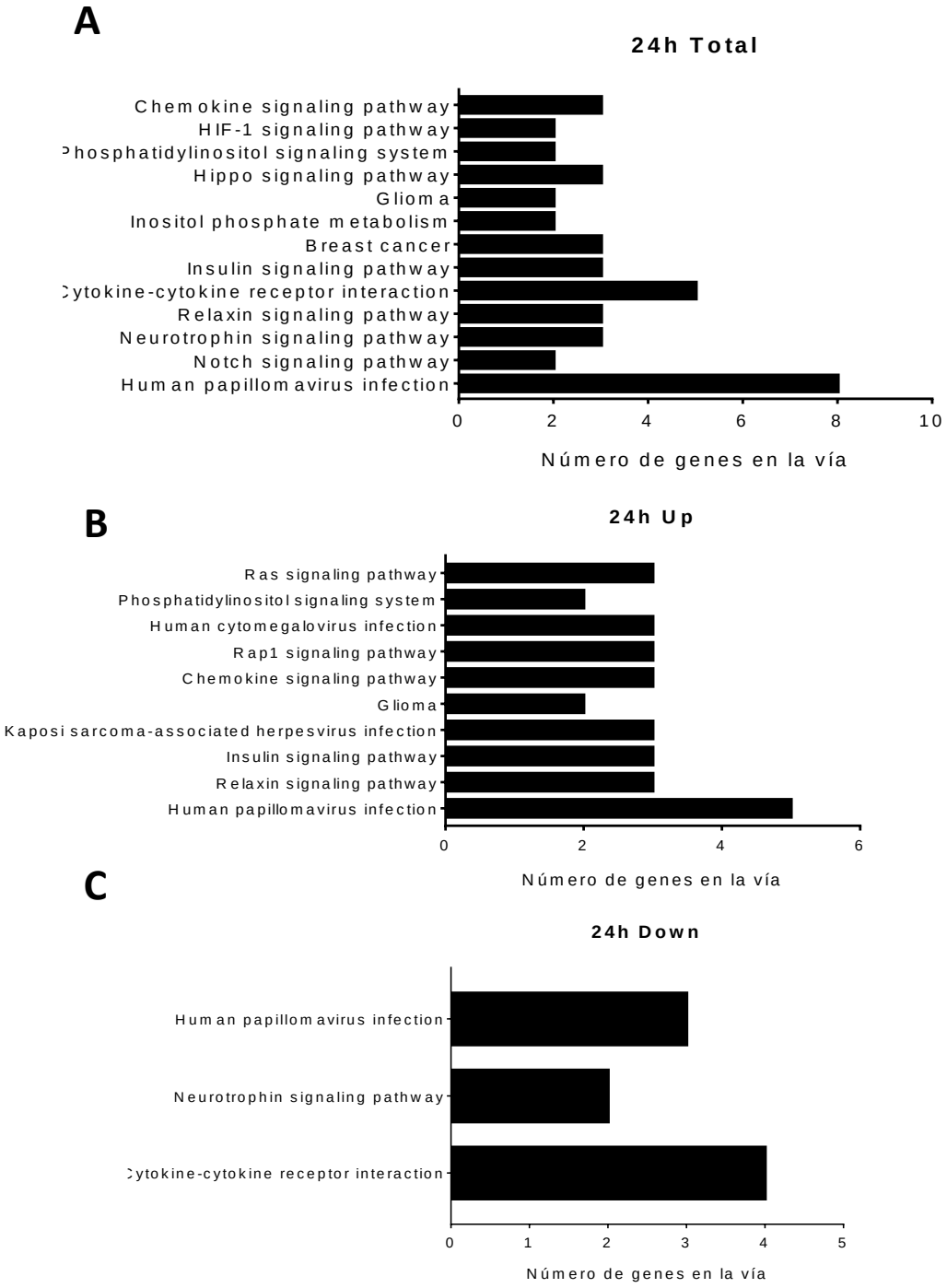

Figura 5. Selección de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 durante 24h. A) Rutas enriquecidas usando todos los genes diferencialmente expresados a 24 h, **B)** Solamente genes expresados al alta y **C)** genes expresados a la baja.

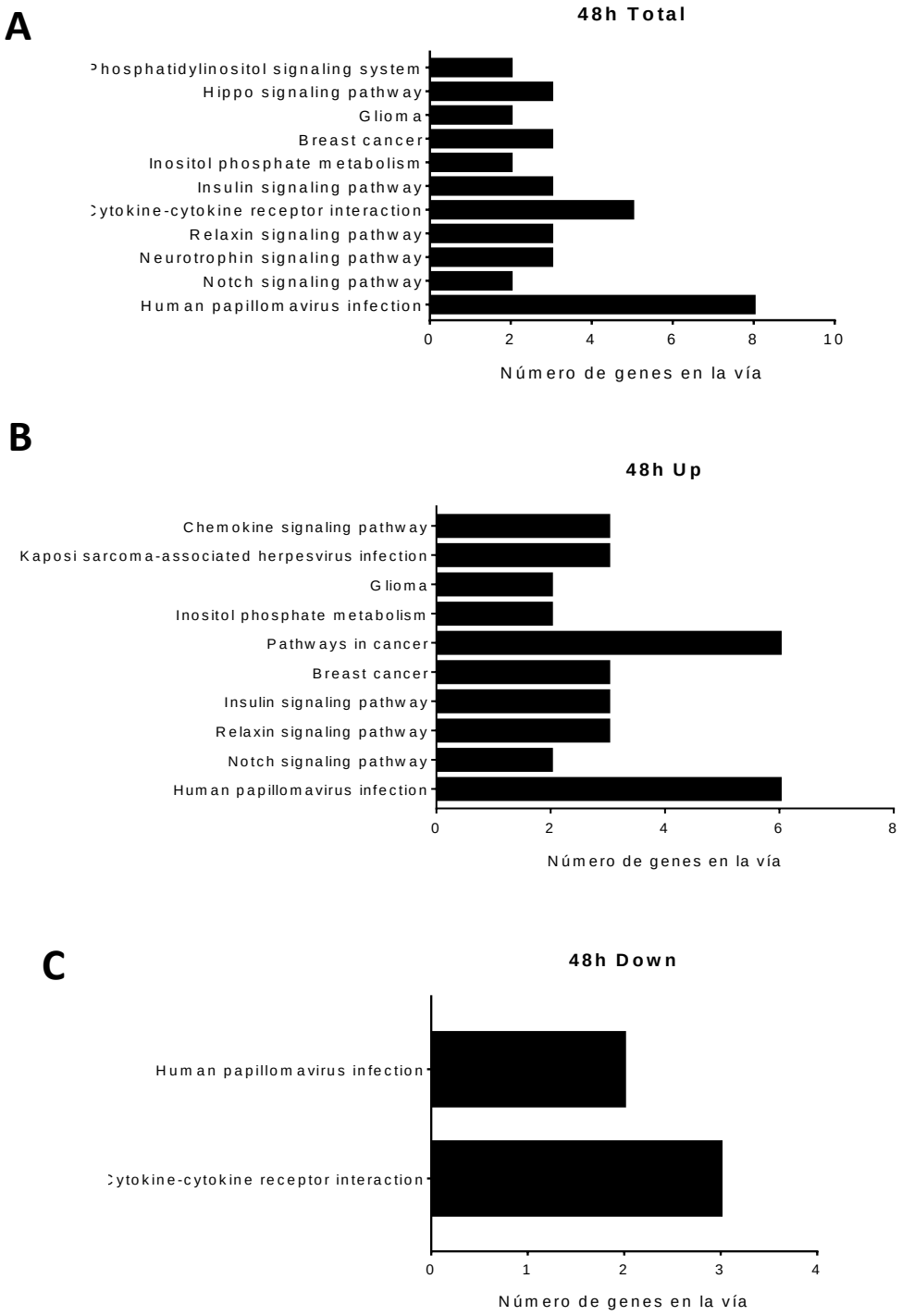

Figura 6. Selección de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 durante 48h. A) Rutas enriquecidas usando todos los genes diferencialmente expresados a 24 h, **B)** Solamente genes expresados al alta y **C)** genes expresados a la baja.

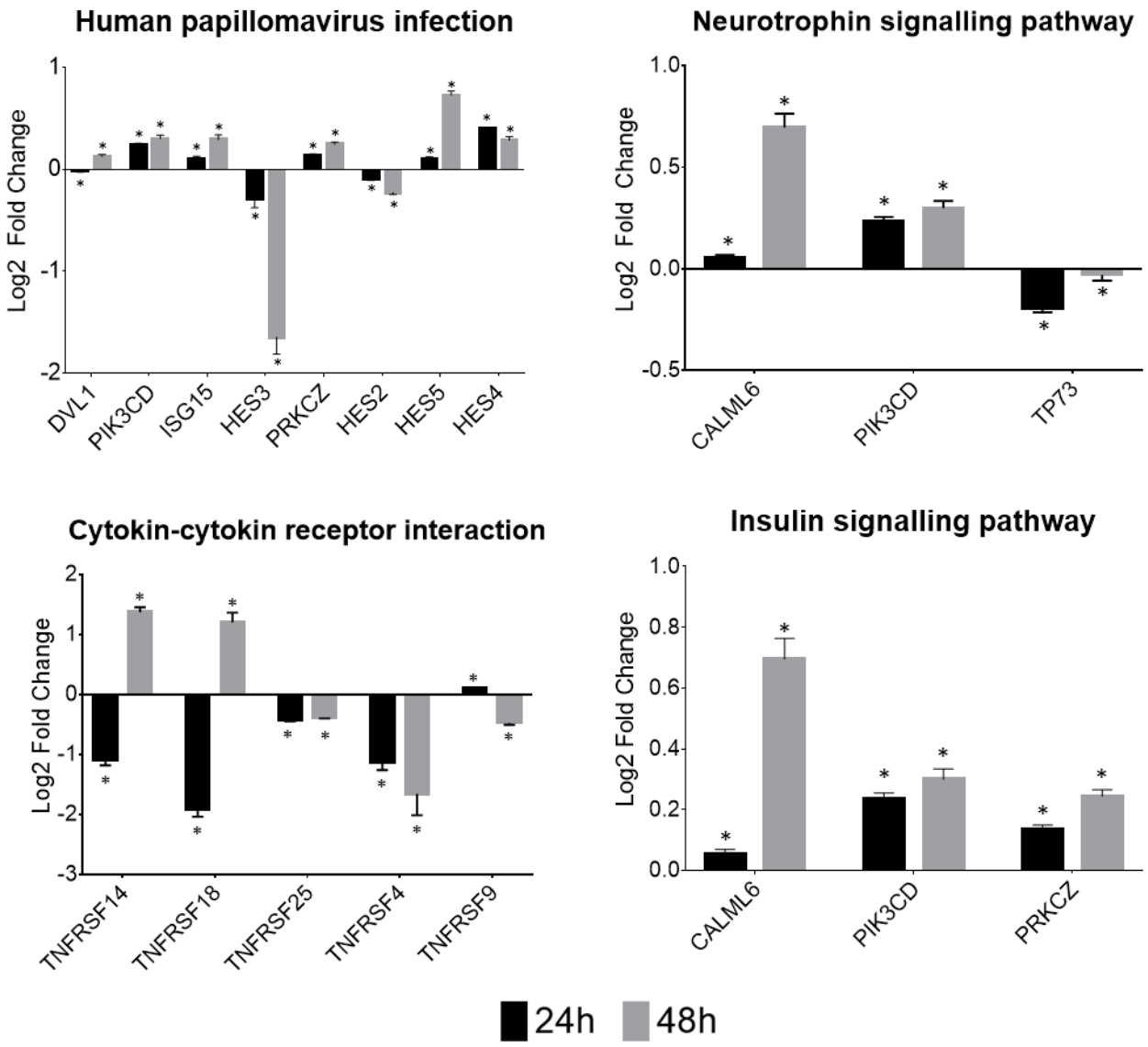

Figura 7. Niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en algunas vías de señalización identificadas en el análisis de rutas KEGG a 24 y 48h. Los datos se presentan como Log2 Fold Change del nivel de expresión ± SE (* = q < 0,05).

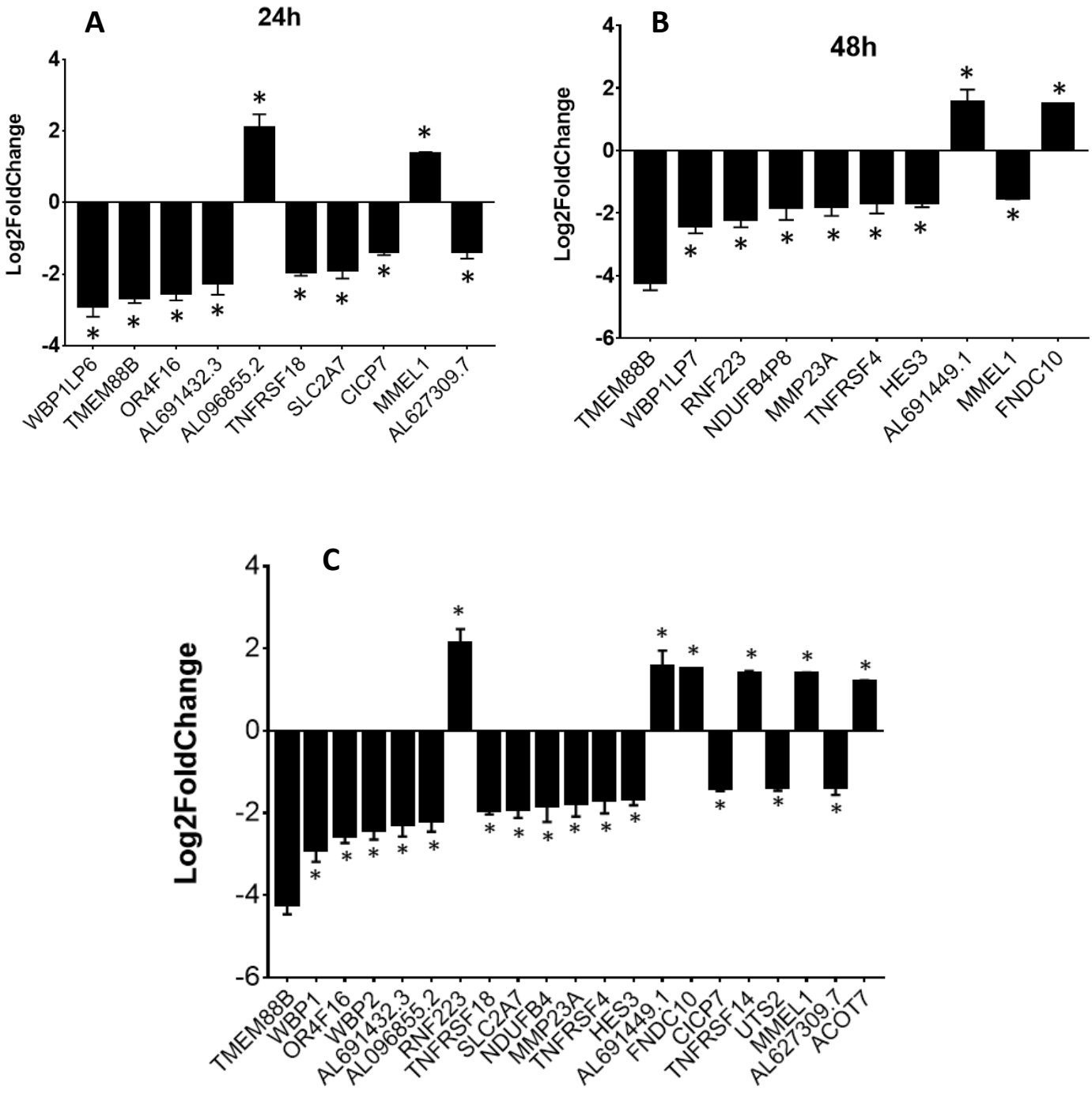

Figura 8. Top 10 genes diferencialmente expresados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 10 nM.

A) Top 10 genes expresados diferencialmente a 24 horas. **B)** Top 10 de genes expresados diferencialmente a 48 horas. **C)** Top 20 de todos los genes diferencialmente expresados a 24 y 48 horas. Los datos se presentan como Log2 Fold Change del cambio de expresión ± SE. (* = q < 0,05).

IMPACTO DE IGF2 SOBRE EL PANORAMA DE METILACIÓN DEL DNA EN LA LÍNEA CELULAR HTR-8/SVneo

Inicialmente evaluamos el efecto del tratamiento con el péptido IGF2 sobre los niveles de metilación del DNA durante varios tiempos de tratamiento. Se encontró que, a partir de las 12 horas de tratamiento, el contenido de 5mC en el DNA genómico de la línea celular HTR-8/SVneo disminuye de forma significativa con respecto a las 0 horas, y a partir de este momento tiempo, la hipometilación se mantiene hasta 72 horas (Figura 9A).

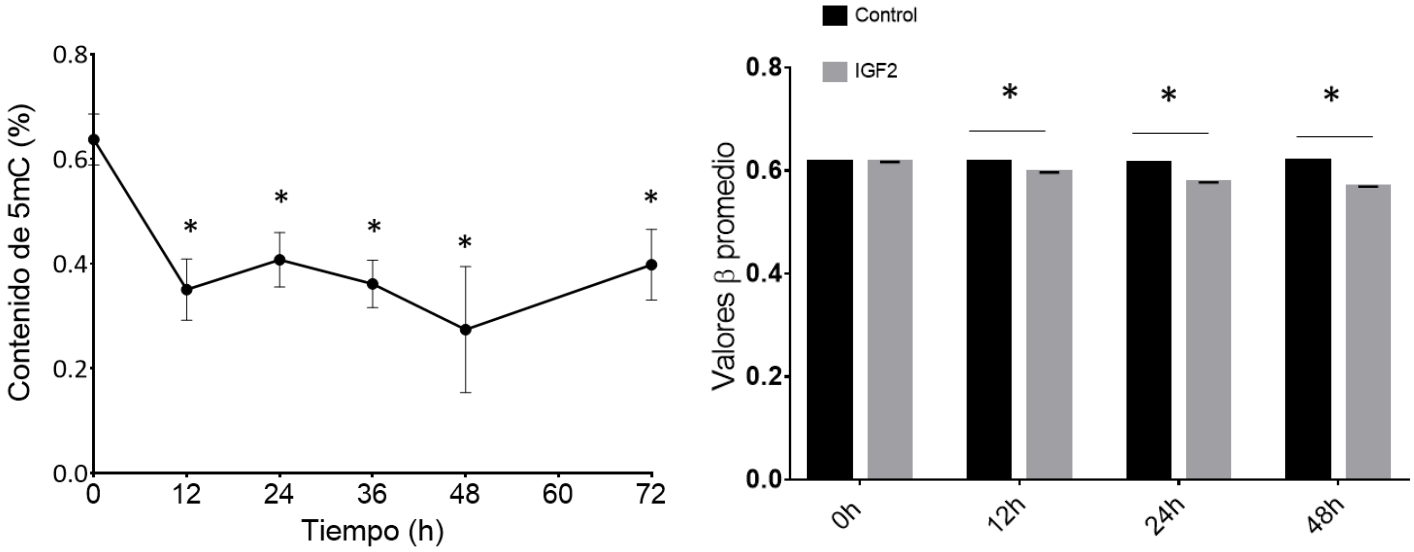

Figura 9. Cambio en los niveles de metilación de la línea celular HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2 10 nM.

A) Determinación de los niveles de 5mC en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 10 mM desde 0 a 72 horas (n = 3) (t vs 0h, * = $p < 0.05$) **B)** Distribución de los valores β promedio a nivel genómico para cada muestra, determinados con el módulo de metilación del software GenomeStudio® de Illumina. Los valores se presentan como el promedio de todos los valores β de cada muestra ± SEM (IGF2 vs Control, * = $p < 0,05$)

Para evaluar el efecto del tratamiento con el péptido IGF2 sobre las células de HTR-8/SVneo, interrogamos el estado de metilación de todos los sitios CpG disponibles en el microarreglo Infinium MethylationEPIC BeadChip de Illumina, encontrando 184, 209 y 246 sitios CpG diferencialmente metilados para 12, 24 y 48 horas respectivamente (Tabla suplementaria S4).

El nivel de metilación promedio a nivel genómico fue ligeramente menor en todos los tiempos evaluados en las células estimuladas con IGF2 (Figura 9B), El cambio en los niveles de metilación en células estimuladas con HTR8 que muestra la figura 9 es de suma importancia ya que evidencia la adquisición de un panorama característicamente maligno con una clara hipometilación a nivel genómico global, que se acentúa con el tiempo de estímulo (Figura 9B).

Los sitios CpG interrogados en este microarreglo han sido previamente anotados con respecto a distintas regiones genómicas y a distintas islas CpG (CGI) (85). Las regiones anotadas incluyen TSS1500 (la región 1500 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción), TSS200, 5'UTR, primer exón, cuerpo del gen, 3' UTR y regiones intergénicas (Figura 10). Esta anotación de Illumina también incluye una anotación con relación a islas CpG (Figura 10); las regiones de 2 kb directamente corriente arriba y corriente debajo de las islas CpG se denominan orilla norte y orilla sur, respectivamente. Las regiones de 2 kb inmediatamente adyacentes a estas regiones se denomina plataformas norte y sur, respectivamente, y las regiones por fuera de estas anotaciones se denominan como "mar abierto". Por lo tanto, determinamos si el estímulo con IGF2 afectaba los niveles de metilación (panorama de metilación) en estas regiones. Observamos que el tratamiento con el péptido promueve un aumento generalizado en los niveles de metilación de las regiones TSS1500, TSS200 y 5'UTR desde 12h de tratamiento, de forma paralela con una disminución en las regiones cuerpo del gen, 3'UTR e intergénicas (Figura 10). Adicionalmente, se evaluó el cambio en el estado de metilación de las regiones anotadas con respecto a islas CpG y encontramos que el tratamiento con el péptido IGF2 promovió un cambio en el estado de metilación de las regiones anotadas como islas a partir de 12 horas de tratamiento, acompañado de una disminución en los niveles de metilación de las regiones anotadas como mar abierto (Figura 11). Los resultados presentados en las figuras 11 y 12 son fundamentales ya que muestran cómo, por efecto del estímulo con IGF2, el metiloma de la línea celular adquiere una configuración maligna, caracterizada por la hipermetilación de regiones promotoras (TSS1500, TSS200, 5'UTR, Islands) y por la hipometilación a nivel genómico global (intergenic, open sea).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de metilación de estas regiones, es claro que el cambio en el panorama de metilación a nivel genómico para la línea celular HTR-8/SVneo exhibe una transición hacia un panorama característico de las células malignas, caracterizado por una hipometilación global acompañada de un aumento en los niveles de metilación de las regiones correspondientes a islas CpG. Las islas CpG frecuentemente coinciden con regiones promotoras génicas. Tanto el grupo anotado como Islas CpG como aquellos anotados como TSS1500, TSS200 y 5'UTR (que generalmente coinciden con la ubicación de las regiones promotoras corriente arriba de las regiones codificantes de los genes) resultaron con un aumento en los niveles de metilación,, mientras que las regiones anotadas como "intergénicas" y "mar abierto", que correspondes a las ubicaciones genómicas por fuera de las anotaciones mencionadas previamente, resultaron

con niveles de metilación disminuidos. Además, teniendo en cuenta que el número de sitios CpG que se encuentran en las categorías “intergénico” y “mar abierto” son muchos más que los anotados a las diferentes categorías, un pequeño cambio en el nivel de metilación de estas regiones implica un cambio muy grande a nivel de genoma.

Respecto al cambio en el estado de metilación por efecto del tratamiento con IGF a nivel de sitio CpG, encontramos que a 12 horas se observa un cambio en el estado de metilación de 184 sitios, de los cuales 96 son hipometilados y 88 son hipermetilados. A 24 horas de tratamiento , el número de sitios CpG cuyo estado de metilación cambia correspondió a 209, de los cuales 111 son hipometilados y 98 son hipermetilados. Finalmente, a 48 horas de tratamiento se identificaron 246 sitios diferencialmente metilados, de los cuales 125 resultaron hipometilados y 121 resultaron hipermetilados.

Por último se realizó un análisis de anotación funcional biológica usando la lista de genes identificados como diferencialmente metilados para explorar aquellos procesos biológicos que podrían estar comprometidos por el cambio en el panorama de metilación descrito (Tabla Suplementaria S5) usando la herramienta online Enrichr. La figura 12 muestra las rutas significamente enriquecidas con estos sets de genes. Destaca el enriquecimiento de vías como Pathways in cancer, Human papilloma virus infection e IGF signaling pathway, que también se habían identificado como enriquecidas en el análisis de enriquecimiento de vías con los genes diferencialmente expresados (Figuras 5 y 6). De acuerdo con estos resultados, de forma similar a como se había observado con los resultados de la expresión génica, el péptido no promueve el establecimiento de un panorama de alteración de vías biológicas claro que se mantenga a lo largo del tiempo (Figura 12), sin embargo, es claro que el efecto del péptido se evidencia de manera más clara a nivel genómico,

Estos resultados muestran que aunque el efecto del péptido no es claro a nivel biológico teniendo en cuenta los genes diferencialmente metilados en cada caso, lo que sí es claro es el efecto a nivel de metilación genómica, que como se mencionó promueve la transición hacia un panorama de metilación maligno, que tienen imporantes implicaciones a nivel regulatorio de la expresión génica y en particular, a nivel de estabilidad genómica.

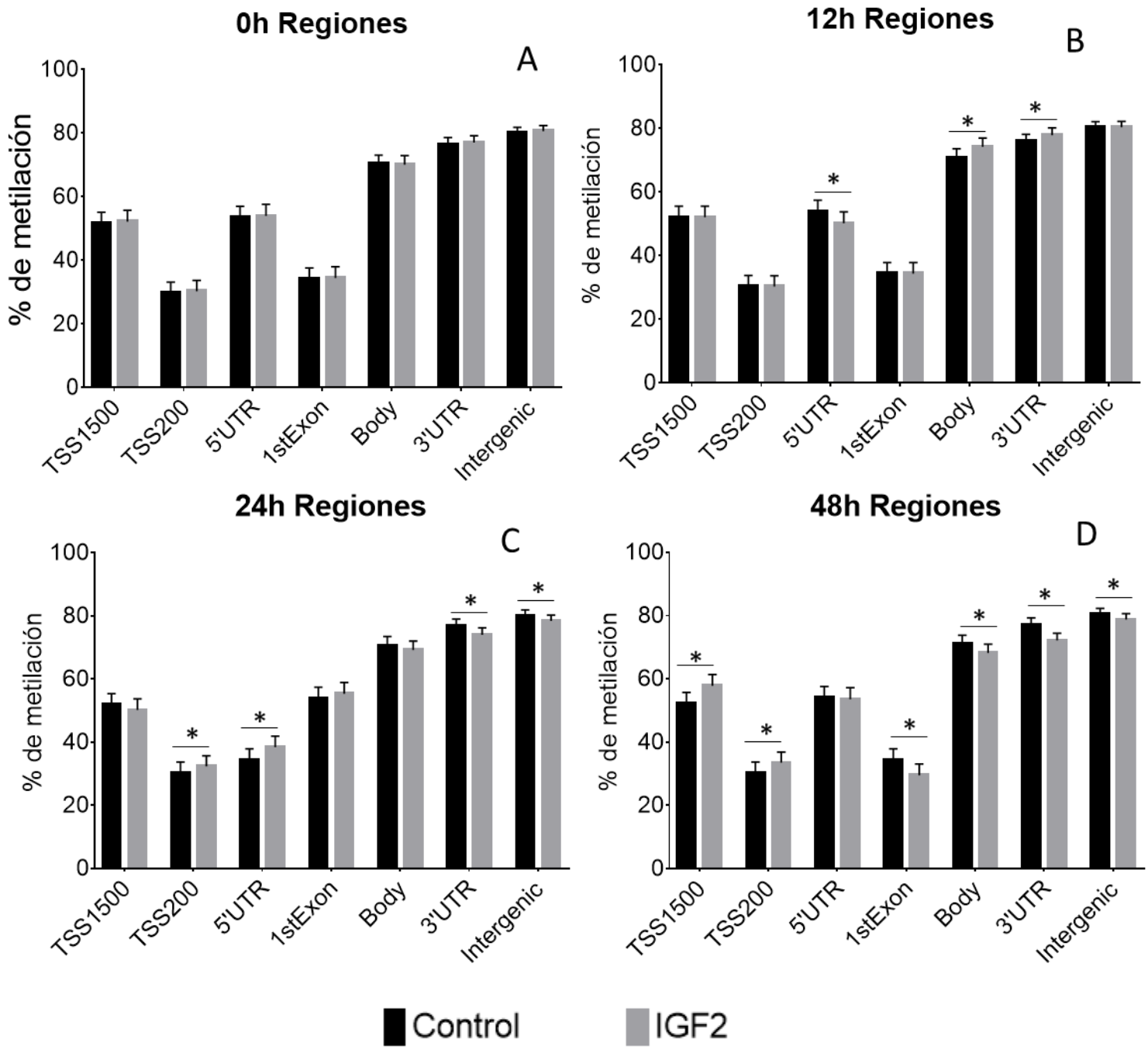

Figura 10. Impacto del tratamiento con IGF2 sobre el panorama global de metilación de las regiones genómicas en la línea celular htr-8/SVneo a 24 y 48 horas.
Variación en los niveles de metilación para los grupos anotados con respecto a regiones génicas en el genoma. Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de metilación para cada grupo ± SD (* = $p < 0,05$).

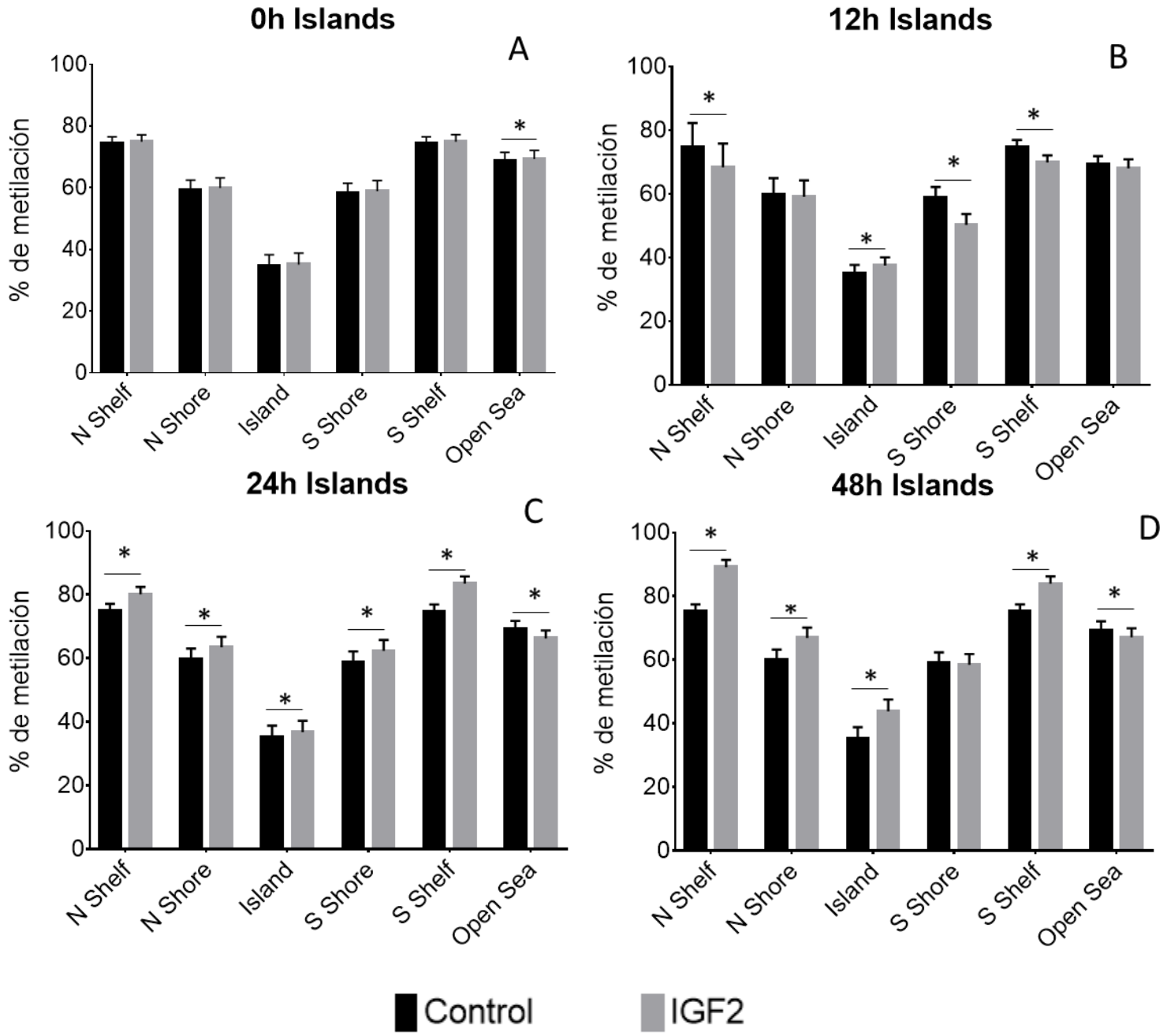

Figura 11. Impacto del tratamiento con IGF2 sobre el panorama global de metilación en las regiones asociadas a islas CpG en la línea celular HTR-8/SVneo.

Variación en los niveles de metilación para los grupos anotados con respecto a islas CpG en el genoma. Los datos se presentan como el promedio del porcentaje de metilación para cada grupo ± SD. (* = $p < 0,05$).

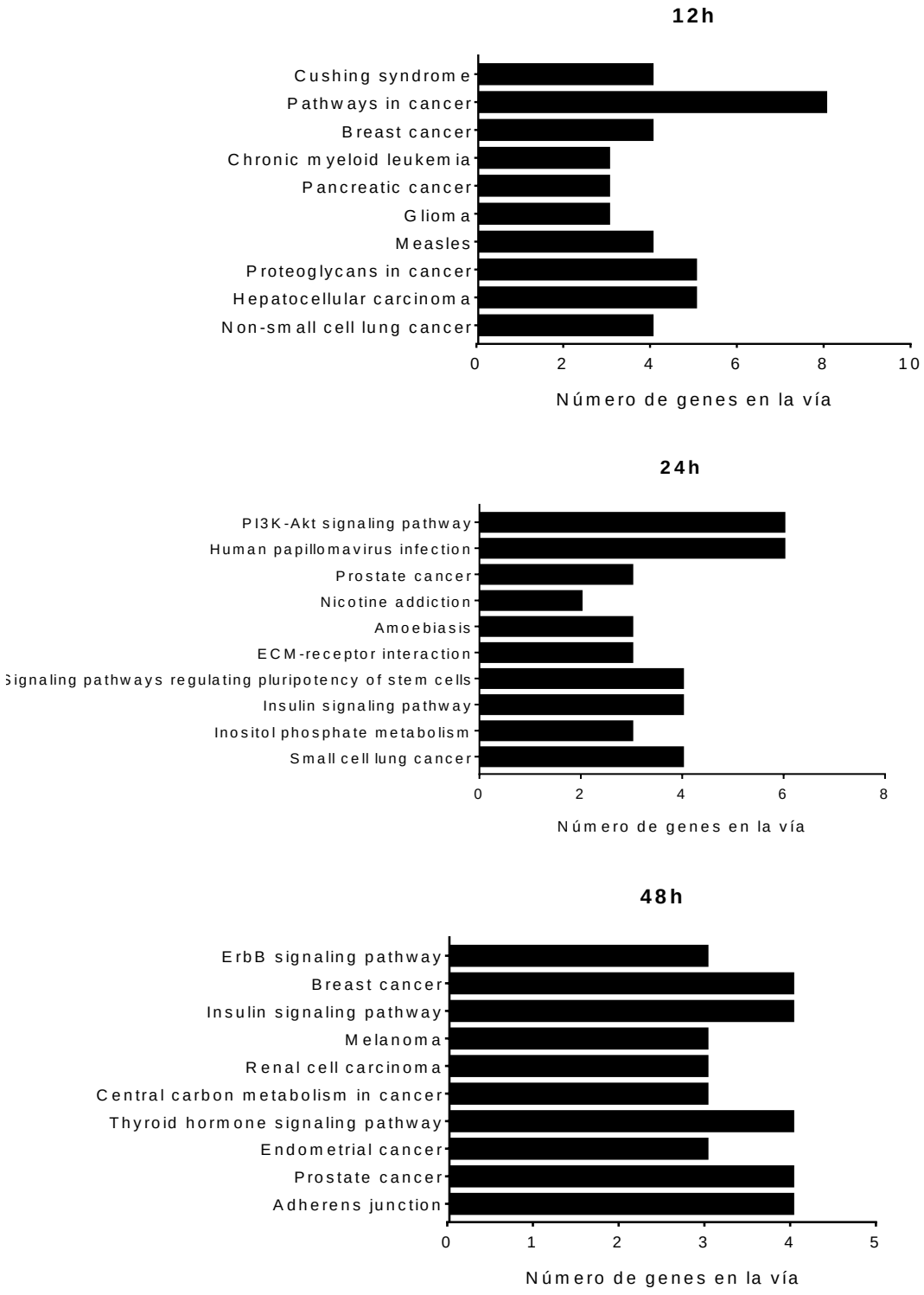

Figura 12. Análisis de rutas biológicas enriquecidas con los sets de genes diferencialmente metilados en la línea celular HTR-8/SVneo estimulada con IGF2 10 nM.

Número de genes involucrados en cada una de las vías top 10 identificadas para A) 12h, B) 24h y C) 48h.

CAMBIOS COINCIDENTES EN LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE mRNA Y LA METILACIÓN DIFERENCIAL DE DNA EN LA LÍNEA CELULAR HTR-8/SVneo TRATADA CON IGF2

Las modificaciones epigenéticas pueden regular la expresión de mRNA a distintos niveles (97, 98). Por lo tanto uno de los propósitos de este estudio fue determinar si el cambio en el panorama de metilación de la línea celular HTR-8/SVneo se correlacionaba con los cambios en los niveles de expresión génica que aparecían por efecto del tratamiento con IGF2 a una concentración de 10 nM. Para ello, evaluamos si alguno de los genes que encontramos como diferencialmente expresados coincidían con aquellos genes que mostraron cambios en su estado de metilación del DNA. Los datos de expresión diferencial de RNA ($q < 0.05$) fueron contrastados con los datos de metilación diferencial ($|\beta| > 0.2$) para cada tiempo evaluado. La tabla 1 muestra la lista de los genes que cumplieron las dos condiciones. De estos 7 genes, 6 presentan una hipometilación relacionada con el estímulo y solamente uno presenta una metilación elevada. Este único gen hipermetilado además muestra una expresión disminuida con respecto al control sin tratamiento. De los 6 genes hipometilados, cuatro presentan una expresión disminuida y dos presentan una expresión aumentada (Tabla 1).

Gen	Delta β	Ubicación CpG	FC Expresión
AGRN	-0.37	5'UTR	1.33
CAMTA1	-0.39	Gene Body	0.85
MORN1	-0.21	Gene Body	0.92
NPHP4	-0.89	Gene Body	0.85
PARK7	-0.40	TSS200	1.025
PLCH2	0.21	5'UTR	0.76
UBE2J2	-0.45	Gene Body	0.94

Tabla 1. Lista de los genes que se identificaron como diferencialmente metilados y diferencialmente expresados. La segunda columna indica la ubicación del dinucleótido CpG diferencialmente metilado y la tercera columna indica el Fold-Change del nivel de expresión del gen asociado.

DISCUSIÓN

El desarrollo de este trabajo muestra que la estimulación de células HTR-8/SVneo con IGF2 altera la expresión a nivel de mRNA de varios genes, y que esta alteración ocurre de forma simultánea con un aumento en las propiedades funcionales de la línea celular relacionadas con la adquisición de un fenotipo maligno, habitualmente observado en tejidos cancerosos de diversos tipos.

De manera sobresaliente, este trabajo es además el primer reporte del que tenemos noticia de que el panorama de metilación del DNA en células de la línea celular HTR-8/SVneo es afectado por el estímulo con el péptido IGF2. A este respecto, varias regiones genómicas mostraron niveles alterados de metilación en células tratadas con IGF2 con respecto al tratamiento control, a pesar de que los sitios identificados como diferencialmente metilados fueron relativamente pocos. Este hecho puede ser el resultado de que los tiempos de estímulo evaluados fueron relativamente cortos (iguales o inferiores a 48h) y que los cambios en la metilación del DNA de mayor magnitud por efecto de estímulos hormonales podrían requerir tiempos de exposición más prolongados (99, 100), una condición frecuentemente observada en los pacientes con cáncer.

Dado que el cáncer es una enfermedad multifactorial y compleja, y que además es poligénica, es posible que una suma de varios cambios sutiles en el panorama de metilación del genoma tenga efectos sinérgicos entre sí o con otros mecanismos de regulación epigenética (101–103), que en conjunto podrían contribuir a la aparición de alteraciones importantes que finalmente conllevan a la génesis de la enfermedad. En apoyo a esta hipótesis, algunos estudios previos han mostrado diferencias relativamente pequeñas en la metilación global del DNA en diferentes tipos celulares (104, 105). Adicionalmente, es importante tener en cuenta que las alteraciones en el panorama de metilación a nivel de región genómica tienen implicaciones importantes para la estabilidad del genoma, de la que depende tanto la identidad como la función celular, de manera que el cambio en el panorama de metilación que observamos en este trabajo puede estar más relacionado con los fenómenos a nivel genómico (a nivel regulatorio y de estabilidad) que con la alteración de rutas biológicas puntuales. También es importante tomar en consideración que de acuerdo con el origen tisular de esta línea celular y con trabajos realizados previamente (106), el panorama de metilación de la línea tiene una configuración inherentemente pseudomaligna y los eventos que aquí encontramos como promovidos por el estímulo IGF2 podrían ser indicadores de un desequilibrio de este panorama hacia la malignidad (20).

Nuestro estudio muestra que el tratamiento con IGF2 en células de trofoblasto afecta la expresión de genes que también se encuentran alterados en la versión tumoral de ciertos tejidos somáticos. Particularmente, algunos de los genes con mayor variación a nivel de expresión incluyen a *TMEM23A, WBP1, RNF223, TNFRSF, NDUFB4P8, SLC2A7, HES3, MMP23A, FNDC10, UTS2, MMEL1 Y ACOT7,* entre otros. La familia de proteínas transmembranales TMEM incluye miembros cuya función es en su mayoría, desconocida, pero cuyas alteraciones a nivel transcripcional han sido reportada en varios tipos de cáncer (107).

WBP1 es una proteína de unión a WWOX, que actúa como supresor tumoral, aunque los mecanismos a través los cuales consigue esta actividad supresora no se conocen en detalle. Sin embargo, se conoce que las proteínas WBP1 y WBP2 interactúan con WWBOX como proteínas de andamiaje para permitir la interacción con sus blancos moleculares y ejercer control sobre las actividades de proliferación, invasión y migración. En nuestro estudio se observó a estos dos genes como fuertemente regulados a la baja en células HTR-8/SVneo con relación al control sin estímulo, de manera que podría estar comprometida la capacidad de WWOX para ejercer como supresor tumoral, favoreciendo así la adquisición de un fenotipo maligno (108, 109).

Por su parte, RNF223 se identificó en un estudio reciente basado en RNAseq como marcador de pobre prognosis en pacientes de sarcoma uterino cuando se encuentra sobreexpresado, a pesar que ningún otro estudio ha explorado su importancia a nivel funcional en cáncer (110).

NDUFB4 es una proteína que corresponde a una subunidad no catalítica del complejo proteico NADH-deshidrogenasa que se ha asociado con una pobre prognosis en cáncer de colon y cáncer gástrico.

ACOT7 codifica para un miembro de la familia de las acil-coenzimas. Esta enzima cataliza la hidrólisis del tioésteres del palmitoil-coA y su sobreexpresión ha sido asociada a la pobre prognosis de pacientes con leucemia con y sin tratamiento de quimioterapia (111). Recientemente se descubrió que esta enzima está sobreexpresada en cáncer gástrico y que su expresión está regulada por un mecanismo epigenético mediada por RNA no codificante (112).

MMEL1 es una endopeptidasa con función importante a nivel cerebral que se encarga de la degradación del exceso de β amiloide (Aβ) y cuya desregulación está involucrada con la progresión de la enfermedad de Alzheimer (113).

Además, se ha encontrado que ejerce acciones fundamentales a nivel de la función de los espermatozoides, posiblemente mediante la modulación de procesos como la fertilización y la invasión durante la embriogénesis temprana (114), sin embargo su función en cáncer todavía no ha sido estudiada.

FNDC es un activador de proteínas G independiente de receptores. Se cree que sus productos hacen parte de varios complejos proteicos en diferentes tejidos y ha sido relacionado al desarrollo de varios tumores (115). UST2 es un ligando peptídico que es el vasoconstrictor más poderoso conocido y producido en el cerebro. La evidencia disponible muestra que contribuye en la angiogénesis y en la proliferación de células tumorales (116).

Por su parte, HES3 es un factor de transcripción perteneciente a la familia Hes/Hey, cuyos miembros se encargan de reprimir la expresión de factores de transcripción en una forma tejido-específica para facilitar la función celular. Específicamente, Fang y sus colaboradores describieron recientemente que HES3 es un blanco específico de la vía de señalización NOTCH no canónica y que además promueve el fenotipo maligno de células de cáncer de pulmón a través de regulación al alta de las ciclinas D1 y D3 y la expresión de MMP7 (117). Al respecto, las proteínas MMP hacen parte de las moléculas efectoras del fenotipo invasivo mediante la remodelación de la matriz extracelular en múltiples tejidos y condiciones. Específicamente, MMP23 es expresada en tejidos de ovario, testículo y próstata, lo que sugiere que podría tener un papel especial en procesos reproductivos (118), pero ha sido también encontrada como sobreexpresada en cáncer de vejiga, permitiendo ser usada como marcador para la clasificación y la graduación de los tumores (119).

SLC2A7 es un transportador de glucosa también conocido como GLUT7. A pesar que la importancia de la familia de transportadores de glucosa en cáncer está documentada y es grande (120), hasta el momento no hay reportes que describan la función de este transportador específico en cáncer, sin embargo se encontró sobreexpresado en un estudio que analizó la expresión de transportadores glucosa en cáncer de tiroides (121).

También encontramos la alteración de varios miembros de TNFRSF, que es una superfamilia de receptores que se encargan de funciones inmunoregulatorias clave en múltiples tejidos y sus miembros incluyen receptores de muerte que activan los procesos de apoptosis en células tumorales así como receptores que proveen señales coestimulatorias para células T antitumorales (122). La expresión disminuida de los miembros TNFRSF18 y TNFRSF4 puede estar asociado a una disminución en la susceptibilidad de las células a estímulos de control de la proliferación. De manera inesperada también encontramos una sobreexpresión de TNFRSF14, que ha sido previamente asociada a una buena prognosis y al aumento de la

apoptosis en células de cáncer de vejiga (123) y cuyas mutaciones provocan alteraciones a nivel funcional que implican aumento de la agresividad tumoral en pacientes con linfoma folicular (124). La expresión altamente alterada de estos y otros genes (Tabla suplementaria S1) constituyen un panorama de expresión génica podría explicar la tendencia de la línea celular hacia la adquisición de un fenotipo maligno a través de la implicación de vías metabólicas y de señalización, y la expresión de moléculas efectoras de este fenotipo.

También se identificó algunos genes con una diferencia en la expresión de mRNA y un cambio correspondiente en su estado de metilación de DNA. Este hallazgo puede sugerir que una alteración en el panorama de metilación del DNA podría implicar cambios en la expresión de los genes correspondientes, como se ha encontrado previamente en numerosos estudios (125–129). Se ha reportado que estos genes tienen implicaciones para el cáncer (130–135), lo cual sugiere que las alteraciones epigenéticas resultantes de la señalización extracelular podrían tener un efecto sobre el riesgo de desarrollar cáncer, y que la trasformación maligna podría ser consecuencia de la señalización extracelular (136). El hecho de que algunos de los genes cuya expresión se encontró regulada al alta tienen un nivel correspondiente de metilación disminuido puede corresponder con la ubicación de estas hipometilaciones en regiones promotoras del gen, patrón que además se ha relacionado con la inestabilidad genómica. Asimismo, la regulación a la baja de los demás genes puede corresponder al hecho de que estas hipometilaciones se encuentran en el cuerpo del gen. De hecho, se considera que la hipermetilación del DNA en los cuerpos del gen tiene un efecto positivo en la actividad transcripcional (137).

Las regiones génicas con expresión diferencial pero sin ningún cambio significativo en su nivel de metilación pueden estar sujetas a otras formas de regulación transcripcional epigenética como modificaciones post traduccionales de las histonas asociadas , remodelación de la estructura de la cromatina local mediada por complejos proteicos remodeladores de la cromatina (138–141), o no epigenéticas como activación mediada por factores de transcripción (142, 143). Además, la variación genética y la variación epigenética pueden interactuar para afectar la expresión génica y así contribuir al desarrollo de condiciones complejas como el cáncer. Por ejemplo, previamente se ha mostrado que aquellos SNPs que introducen o remueven un sitio CpG (CpG-SNPs) pueden tener una influencia sobre la actividad transcripcional mediante la interacción con ciertas proteínas (144), y que el número de sitios CpG en el genoma puede estar relacionado con ciertas condiciones de capacidad de modular el nivel de metilación de la región genómica (145).

La alteración del panorama de metilación identificado en regiones intergénicas puede tener un papel de regulación muy importante. Esta regulación podría ocurrir de forma directa, favoreciendo la interacción de ciertas ubicaciones del genoma con otras espacialmente cercanas o con complejos proteicos ubicados preferencialmente en estas ubicaciones (146, 147) o a nivel transcripcional mediante la represión/activación génica o mediante la transcripción de productos no codificantes que ejercen control a nivel de RNA sobre los transcritos de genes codificantes.

Es bien sabido que varios factores asociados con el estilo de vida, como dieta, consumo de licor y tabaco, y actividad física, pueden influir en el riesgo de una persona de desarrollar cáncer y estudios realizados en modelos de roedores demuestran que un ambiente intrauterino alterado podría dar lugar a alteraciones epigenéticas de la progenie, que durante su vida adulta podría predisponer al individuo a condiciones deletéreas (148–153). Esta información sugiere que las alteraciones epigenéticas contribuyen a la patogénesis del cáncer desde los estadíos más tempranos de la enfermedad y basados en los resultados de este estudio, proponemos que la exposición a niveles hormonales alterados podría promover la adquisición de panoramas epigenéticos asociados a la expresión/represión de genes importantes para el desarrollo del cáncer.

Nuestros resultados acerca del aumento de las propiedades funcionales de la línea celular HTR-8/SVneo hacia un fenotipo más maligno están en concordancia con estudios previos de nuestro grupo de investigación y de otros grupos en los cuales se encontró que el tratamiento con IGF2 promueve el fenotipo invasivo de las células de trofoblasto (73, 154, 155). La transición hacia un fenotipo maligno a través de señales extracelulares implica una correcta sincronización en el funcionamiento de varias vías de señalización y el aumento de la capacidad migratoria e invasiva de la célula depende de la activación o sobreexpresión de vías metabólicas relacionadas con la motricidad celular. La estimulación con IGF2 en células de trofoblasto humano resultó en la alteración de la expresión de genes relacionados en vías importantes como Human papilloma virus infection, breast cancer y glioma y numerosas vías de señalización como Notch, neurotrofina, relaxina y hippo. De manera importante, muchas de estas vías de señalización enriquecidas coinciden a 24 y 48h, lo que sugiere que el programa estimulado se mantiene lo largo del tiempo.

La vía que resultó más enriquecida con los genes diferencialmente expresados fue absorción y metabolismo de la glucosa. Es sabido que las células cancerosas presentan un mayor consumo de glucosa que las células normales por cuanto su metabolismo energético se basa en la glucólisis principalmente, y en el caso de tumores metastásicos, las células

invasoras tienen que suplir las demandas energéticas relacionadas con una mayor actividad metabólica de los procesos de invasión y proliferación.

Aunque varios estudios relacionan la transición hacia un fenotipo maligno con la evasión de la muerte celular por apoptosis, esa vía no resultó enriquecida con los genes expresados a la baja como resultado del tratamiento con IGF2 en células HTR-8/SVneo. En este estudio, la estimulación de células HTR-8/SVneo con el péptido IGF2 no tuvo un efecto aparente en la apoptosis con ningún set de genes y por lo tanto consideramos probable que el péptido IGF2 no promueva la evasión de la apoptosis en este tipo celular. Teniendo en cuenta que la apoptosis es un mecanismo de muerte de gran importancia para la regulación de las poblaciones celulares, es preciso determinar el efecto del péptido IGF2 sobre la actividad apoptótica en células normales y cancerosas.

Por otro lado, la vía de señalización de la insulina resultó significativamente enriquecida en el análisis realizado con los genes diferencialmente expresados. Esta vía tiene una fuerte relación con la vía de señalización de los factores de IGF y es importante en cáncer por activar las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK a través de cuya activación corresponde a la adquisición de un fenotipo proliferativo e invasivo (156, 157), y es de especial importancia por ser a través de esta y de los receptores del sistema IGF que procede el estímulo externo promovido por IGF2. Incluye la participación de *PIK3CD,* que durante mucho tiempo se consideró como específicamente expresado en leucocitos pero cuya sobreexpresión se encontró en múltiples líneas celulares cancerosas y en tejidos primarios de cáncer de pulmón (158). Su sobreexpresión también ha sido encontrada en cáncer de colon, condición en la que es un fuerte promotor de proliferación, migración e invasión celular mediante la activación de la vía de señalización AKT/GSK-3β/β catenina (159). Incluye a *TP73* cuya expresión es mediada por metilación del DNA en cáncer gastrointestinal y carcinoma hepatocelular (160), y cuyas funciones en cáncer son complejas y en algunos casos contradictorias (161), y a *CALML6,* cuyo papel en cáncer no ha sido estudiado .

La vía de señalización de la insulina también resultó enriquecida al realizar los análisis de vías de los genes diferencialmente metilados involucrando a AKT, BRAF, SH2B2 y GCK. AKT hace parte de la vía de señalización PI3K/AKT, ubicuamente activada por señales externas como factores de crecimiento y que regula diversos efectos sobre el metabolismo celular (162), y que es activada en múltiples tipos de cáncer para conseguir un fenotipo maligno (163). El importante papel de *BRAF* en múltiples tipos de cáncer a nivel de reconocimiento de señales externas y regulación de respuestas metabólicas también ha sido reconocido desde hace años (164), mientras que el papel de *SH2B"* y *GCK* todavía no es claro en cáncer.

Los genes cuyo estado de metilación encontramos alterado también resultan enriquecidos en rutas de señalización importantes como PI3K/AKT y vías de señalización que regulan la pluripotencia de células madre, y rutas biológicas importantes para el funcionamiento de la maquinaria molecular involucrada en el fenotipo canceroso como metabolismo central del carbono.

Finalmente, es importante resaltar que nuestros resultados refuerzan la idea de que los cambios observados durante la adquisición de los fenotipos asociados con la transformación maligna de tipos celulares somáticos puede ser consecuencia de una alteración de la regulación epigenética de las células, alteración que se ha reportado ocurre de manera independiente de alteraciones a nivel mutacional en el DNA (136).

Este trabajo respalda la noción cada vez más evidente del papel que tiene la regulación epigenética en todos los fenotipos celulares, especialmente en el mantenimiento de la identidad celular y por lo tanto en la transición maligna hacia el cáncer. Juntos, estos y otros cambios podrían contribuir hacia el aumento observado de las propiedades funcionales de la línea celular, que hacen parte de la transición hacia un fenotipo característicamente más maligno.

CONCLUSIÓN

Este trabajo muestra por primera vez que la estimulación de la línea celular derivada de trofoblasto humano HTR-8/SVneo con el péptido IGF2 en concentración 10 nM promueve una remodelación del panorama de metilación de la línea celular a nivel puntual y regional. Esta remodelación tiende hacia la adquisición de un metiloma característicamente maligno, y ocurre de forma simultánea con el aumento en la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de las células. Además, la alteración a nivel epigenético coincide con una variación en la actividad transcripcional de genes importantes en la invasión celular presente en algunos tipos de cáncer. También se identificaron genes que presentaron tanto metilación como transcripción alterada, lo que sugiere que en esos casos, la alteración en los niveles de expresión podría estar relacionada con los cambios a nivel epigenético.

PERSPECTIVAS

Esta investigación, al igual que casi todas las investigaciones acerca de la epigenética del cáncer genera más interrogantes que respuestas, por lo que se abre todo un repertorio de posibilidades de investigación. Consideramos, por ejemplo, la implementación de una estrategia de análisis menos astringente que permita encontrar otras alteraciones importantes no detectadas en este estudio.

Además, consideramos que es necesario evaluar la actividad a nivel de transcriptoma, redes de interacción metabólica a nivel de RNA-proteína, proteína-proteína y vías de señalización activadas en respuesta al estímulo, así como aquellos mecanismos a través de los cuales puede estar procediendo el estímulo extracelular para afectar el perfil de actividad nuclear. Para ello sería importante evaluar la interacción del estímulo o de la maquinaria de señalización con los otros mecanismos de regulación epigenética para descubrir otros efectos epigenéticos que podrían ocurrir en los primeros estadios de la aparición del cáncer.

Como se discutió previamente, es claro que la aparición del cáncer es un proceso multifactorial y complejo que tarda varios años en completarse y que tiene varias etapas de progresión de manera que no es consecuencia de una única alteración ni de un único estímulo. Es probable que la transformación tumoral sea consecuencia de varias alteraciones o señales extracelulares que tienen efectos deletéreos en la regulación epigenética de la actividad transcripcional y por lo tanto es importante evaluar el efecto de otros estímulos de forma individual o en conjunto, y el efecto que tienen estos estímulos sobre la promoción de capacidades menos estudiadas como la angiogénesis o la evasión del sistema inmune del hospedero.

De forma complementaria a este trabajo es necesario corroborar que las alteraciones observadas en el fenotipo celular y que podrían estar mediadas por los cambios en el panorama de metilación no son consecuencia de alteraciones mutaciones en el DNA. Es necesario validar los resultados obtenidos en la expresión diferencial de ciertos genes mediante otra técnica para verificar los hallazgos. También sería pertinente verificar que los cambios identificados en la expresión de RNA no sean consecuencia de alteraciones mutacionales en regiones regulatorias ocasionadas por el tratamiento con el estímulo. Para tal fin se puede evaluar la alteración a nivel de secuencia de ciertas regiones específicas susceptibles a mutaciones por estímulos extracelulares o a nivel de genoma.

Además, de acuerdo con nuestros resultados, es posible que el establecimiento de panorama de metilación malignos requiera estímulos durante tiempos más prolongados

que los evaluados, para conseguir una remodelación de la cromatina más evidente y que muchos de los cambios a nivel de fenotipo observados a tiempos cortos sean independientes de la reestructuración del metiloma y se deban a la activación de factores de transcripción de respuesta rápida y otros mecanismos de activación génica. Para comprobar esta hipótesis sería necesario estudiar la remodelación de la estructura de la cromatina por efecto de IGF2 a tiempos tanto cortos como largos y la correlación que podría tener esta reestructuración de la cromatina con la metilación del DNA, ya que es posible que incluso al detectar cambios en la estructura de la cromatina, estos sean independientes de la remodelación del metiloma y más debidos al papel de complejos proteicos remodeladores de la cromatina y complejos modificadores de las histonas.

Esperamos que el conocimiento generado en este trabajo pueda contribuir al entendimiento de las bases moleculares de las primeras etapas del cáncer, y que, al futuro, puedan aportar a su prevención y tratamiento. Además, esperamos haber logrado un fortalecimiento en la investigación acerca de la epigenética del cáncer como herramienta fundamental para la comprensión y la predicción del comportamiento tumoral y generación de nuevo conocimiento acerca de la biología de las células trofoblásticas y cancerosas, en especial el efecto de la señalización a través del sistema IGF sobre la desregulación temprana de las células tumorales. El desarrollo de este y otros trabajos que de él se deriven contribuirán a la producción académica en el campo de la epigenética y del estudio del trofoblasto como modelo de progresión tumoral

FINANCIACIÓN

El desarrollo de este trabajo de maestría se enmarco en el proyecto *El trofoblasto como modelo de progresión tumoral,* financiado por el Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación bajo la convocatoria 844 de 2019. Además, conto con el apoyo de la Dirección de investigación de la Sede Bogotá por financiación del proyecto *Impacto de la remodelación del metiloma mediada por IGF-2 sobre la respuesta funcional de HTR-8/SVneo*, Convocatoria para el apoyo a proyectos de investigación y creación artística de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia-2019.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burrows, T. D., King, A., and Loke, Y. W. (1996) *Trophoblast migration during human placental implantation*
2. Jauniaux, E., Moffett, A., and Burton, G. J. (2020) Placental Implantation Disorders. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **47**, 117–132
3. Ferretti, C., Bruni, L., Dangles-Marie, V., Pecking, A. P., and Bellet, D. (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum. Reprod. Update*. **13**, 121–141
4. De La Chapelle, A. (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 769–780
5. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Ab1 tyrosine kinase on the growth of Bcr-Ab1 positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566
6. Lynch, J. P., and Hoops, T. C. (2002) The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **16**, 775–810
7. Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. **61**, 759–767
8. Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., and Goel, A. (2020) Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 111–130
9. Tubiana, M. (2009) To cite this article: Maurice Tubiana (1989) Tumor Cell Proliferation Kinetics and Tumor Growth Rate. *Acta Oncol. (Madr).* **28**, 113–121
10. Moore, L. D., Le, T., and Fan, G. (2013) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. **38**, 23–38
11. Smith, Z. D., and Meissner, A. (2013) DNA methylation : roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204–220
12. Lewis, J., and Bird, A. (1991) DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett.* **285**, 155–159
13. Ng, H.-H., and Adrian, B. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 158–163
14. Feinberg, A. P., and Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 143–153
15. Eden, A. (2003) Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science (80-.).* **300**, 455–455
16. Ehrlich, M. (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. **1**, 239–259

17. Wilson, A. S., Power, B. E., and Molloy, P. L. (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. **1775**, 138–162

18. Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., and Feinberg, A. P. (1993) Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*. **362**, 747–749

19. Paksa, A., and Rajagopal, J. (2017) The epigenetic basis of cellular plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **49**, 116–122

20. Smith, Z. D., Shi, J., Gu, H., Donaghey, J., Clement, K., Cacchiarelli, D., Gnirke, A., Michor, F., and Meissner, A. (2017) Epigenetic restriction of extraembryonic lineages mirrors the somatic transition to cancer. *Nature*. **549**, 543–547

21. Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010) Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*. **25**, 85–101

22. Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U., and Taylor, H. (2009) The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 062–079

23. Weroha, S. J., and Haluska, P. (2012) The Insulin-Like Growth Factor System in Cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **41**, 335–350

24. Bowman, C. J., Streck, R. D., and Chapin, R. E. (2010) Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* **89**, 339–349

25. Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., and Reik, W. (2002) Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. **417**, 945–948

26. Chao, W., and D'Amore, P. A. (2008) IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 111–120

27. Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Maw, M. A., Smith, P. J., and Reeve, A. E. (1993) Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*. **362**, 749–751

28. Xu, W., Fan, H., He, X., Zhang, J., and Xie, W. (2006) LOI of IGF2 is associated with esophageal cancer and linked to methylation status of IGF2 DMR. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **25**, 543—547

29. Murphy, S. K. (2006) Frequent IGF2/H19 Domain Epigenetic Alterations and Elevated IGF2 Expression in Epithelial Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Res.* **4**, 283–292

30. Byun, H.-M., Wong, H.-L., Birnstein, E. A., Wolff, E. M., Liang, G., and Yang, A. S. (2007) Examination of IGF2 and H19 Loss of Imprinting in Bladder Cancer. *Cancer Res.* **67**, 10753–10758

31. Cui, H. (2003) Loss of IGF2 Imprinting: A Potential Marker of Colorectal Cancer Risk. *Science (80-.).* **299**, 1753–1755

32. Lala, P. K., Lee, B. P., Xu, G., and Chakraborty, C. (2002) Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 142–149

33. Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., and Salamonsen, L. A. (2010) Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines? *Biol. Reprod.* **82**, 235–245

34. Graham, C. H., Hawley, T. S., Hawley, R. G., MacDougall, J. R., Kerbel, R. S., Khoo, N., and Lala, P. K. (1993) Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp. Cell Res.* **206**, 204–211

35. Zhang, W., Klinkebiel, D., Barger, C. J., Pandey, S., Guda, C., Miller, A., Akers, S. N., Odunsi, K., and Karpf, A. R. (2020) Global DNA Hypomethylation in Epithelial Ovarian Cancer: Passive Demethylation and Association with Genomic Instability. *Cancers (Basel).* **12**, 764

36. Sheaffer, K. L., Elliott, E. N., and Kaestner, K. H. (2016) DNA hypomethylation contributes to genomic instability and intestinal cancer initiation. *Cancer Prev. Res.* **9**, 534–546

37. Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (80-.).* **300**, 489–492

38. Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. (2005) Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.* **65**, 2115–2124

39. Sato, N., and Goggins, M. (2006) The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **13**, 286–295

40. Pogribny, I. P., and Beland, F. A. (2009) DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2249–2261

41. Guo, S. X., Taki, T., Ohnishi, H., Piao, H. Y., Tabuchi, K., Bessho, F., Hanada, R., Yanagisawa, M., and Hayashi, Y. (2000) Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk. Res.* **24**, 39–46

42. Zhang, J. C., Gao, B., Yu, Z. T., Liu, X. B., Lu, J., Xie, F., Luo, H. J., and Li, H. P. (2014) Promoter hypermethylation of p14 ARF, RB, and INK4 gene family in hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection. *Tumor Biol.* **35**, 2795–2802

43. Yeh, K. T., Chang, J. G., Lin, T. H., Wang, Y. F., Tien, N., Chang, J. Y., Chen, J. C., and Shih, M. C. (2003) Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol. Rep.* **10**, 659–663

44. Silva, A. L., Dawson, S. N., Arends, M. J., Guttula, K., Hall, N., Cameron, E. A., Huang, T. H. M., Brenton, J. D., Tavaré, S., Bienz, M., and Ibrahim, A. E. K. (2014) Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective

hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer*. **14**, 891

45. Hou, Y., Chen, K., Liao, R., Li, Y., Yang, H., and Gong, J. (2021) LINC01419-mediated epigenetic silencing of ZIC1 promotes metastasis in hepatocellular carcinoma through the PI3K/Akt signaling pathway. *Lab. Investig.* 10.1038/s41374-021-00539-z

46. Ju, J., Chen, A., Deng, Y., Liu, M., Wang, Y., Wang, Y., Nie, M., Wang, C., Ding, H., Yao, B., Gui, T., Li, X., Xu, Z., Ma, C., Song, Y., Kvansakul, M., Zen, K., Zhang, C.-Y., Luo, C., Fang, M., Huang, D. C. S., Allis, C. D., Tan, R., Zeng, C. K., Wei, J., and Zhao, Q. (2017) NatD promotes lung cancer progression by preventing histone H4 serine phosphorylation to activate Slug expression. *Nat. Commun.* **8**, 928

47. Yusufova, N., Kloetgen, A., Teater, M., Osunsade, A., Camarillo, J. M., Chin, C. R., Doane, A. S., Venters, B. J., Portillo-Ledesma, S., Conway, J., Phillip, J. M., Elemento, O., Scott, D. W., Béguelin, W., Licht, J. D., Kelleher, N. L., Staudt, L. M., Skoultchi, A. I., Keogh, M.-C., Apostolou, E., Mason, C. E., Imielinski, M., Schlick, T., David, Y., Tsirigos, A., Allis, C. D., Soshnev, A. A., Cesarman, E., and Melnick, A. M. (2021) Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature*. **589**, 299–305

48. Li, J., Galbo, P. M., Gong, W., Storey, A. J., Tsai, Y.-H., Yu, X., Ahn, J. H., Guo, Y., Mackintosh, S. G., Edmondson, R. D., Byrum, S. D., Farrar, J. E., He, S., Cai, L., Jin, J., Tackett, A. J., Zheng, D., and Wang, G. G. (2021) ZMYND11-MBTD1 induces leukemogenesis through hijacking NuA4/TIP60 acetyltransferase complex and a PWWP-mediated chromatin association mechanism. *Nat. Commun.* **12**, 1045

49. Silva-Fisher, J. M., Dang, H. X., White, N. M., Strand, M. S., Krasnick, B. A., Rozycki, E. B., Jeffers, G. G. L., Grossman, J. G., Highkin, M. K., Tang, C., Cabanski, C. R., Eteleeb, A., Mudd, J., Goedegebuure, S. P., Luo, J., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ley, T. J., Lockhart, A. C., Fields, R. C., and Maher, C. A. (2020) Long non-coding RNA RAMS11 promotes metastatic colorectal cancer progression. *Nat. Commun.* **11**, 2156

50. Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., and Cedar, H. (2016) DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res.* **76**, 3446–3450

51. Saghafinia, S., Mina, M., Riggi, N., Hanahan, D., and Ciriello, G. (2018) Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. *Cell Rep.* **25**, 1066-1080.e8

52. Ahmed, M., Soares, F., Xia, J.-H., Yang, Y., Li, J., Guo, H., Su, P., Tian, Y., Lee, H. J., Wang, M., Akhtar, N., Houlahan, K. E., Bosch, A., Zhou, S., Mazrooei, P., Hua, J. T., Chen, S., Petricca, J., Zeng, Y., Davies, A., Fraser, M., Quigley, D. A., Feng, F. Y., Boutros, P. C., Lupien, M., Zoubeidi, A., Wang, L., Walsh, M. J., Wang, T., Ren, S., Wei, G.-H., and He, H. H. (2021) CRISPRi screens reveal a DNA methylation-mediated 3D genome dependent causal mechanism in prostate cancer. *Nat. Commun.* **12**, 19

53. Ando, M., Saito, Y., Xu, G., Bui, N. Q., Medetgul-Ernar, K., Pu, M., Fisch, K., Ren, S., Sakai, A., Fukusumi, T., Liu, C., Haft, S., Pang, J., Mark, A., Gaykalova, D. A., Guo, T.,

Favorov, A. V., Yegnasubramanian, S., Fertig, E. J., Ha, P., Tamayo, P., Yamasoba, T., Ideker, T., Messer, K., and Califano, J. A. (2019) Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nat. Commun.* **10**, 2188

54. Ulrey, C. L., Liu, L., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2005) The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum. Mol. Genet.* **14**, R139–R147

55. Mehrmohamadi, M., Mentch, L. K., Clark, A. G., and Locasale, J. W. (2016) Integrative modelling of tumour DNA methylation quantifies the contribution of metabolism. *Nat. Commun.* **7**, 1–13

56. Cuyàs, E., Fernández-Arroyo, S., Verdura, S., García, R. Á. F., Stursa, J., Werner, L., Blanco-González, E., Montes-Bayón, M., Joven, J., Viollet, B., Neuzil, J., and Menendez, J. A. (2018) Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism. *Oncogene*. **37**, 963–970

57. Ali, A., Sina, I., Carrascosa, L. G., Liang, Z., Grewal, Y. S., Wardiana, A., Shiddiky, M. J. A., Gardiner, R. A., Samaratunga, H., Gandhi, M. K., Scott, R. J., Korbie, D., and Trau, M. (2018) Epigenetically reprogrammed methylation serves as a universal cancer biomarker. *Nat. Commun.* 10.1038/s41467-018-07214-w

58. Bates, S. E. (2020) Epigenetic Therapies for Cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 650–663

59. Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., and Wei, X. (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **4**, 1–39

60. Jones, P. A., Ohtani, H., Chakravarthy, A., and De Carvalho, D. D. (2019) Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nat. Rev. Cancer*. **19**, 151–161

61. Bronchud, M. H., Tresserra, F., and Zantop, B. S. (2018) Epigenetic changes found in uterine decidual and placental tissues can also be found in the breast cancer microenvironment of the same unique patient: description and potential interpretations. *Oncotarget*. **9**, 6028–6041

62. Tai, B.-J., Yao, M., Zheng, W.-J., Shen, Y.-C., Wang, L., Sun, J.-Y., Wu, M.-N., Dong, Z.-Z., and Yao, D.-F. (2019) Alteration of oncogenic IGF-II gene methylation status associates with hepatocyte malignant transformation. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **18**, 158–163

63. Malik, A., Pal, R., and Gupta, S. K. (2020) EGF-mediated reduced miR-92a-1-5p controls HTR-8/SVneo cell invasion through activation of MAPK8 and FAS which in turn increase MMP-2/-9 expression. *Sci. Rep.* **10**, 12274

64. Malik, A., Pal, R., and Gupta, S. K. (2017) Interdependence of JAK-STAT and MAPK signaling pathways during EGF-mediated HTR-8/SVneo cell invasion. *PLoS One*. **12**, e0178269

65. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D. S. (2006) Epidermal

growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. **366**, 2–16

66. Wen, Z., Chen, Y., Long, Y., Yu, J., and Li, M. (2018) Tumor necrosis factor-alpha suppresses the invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells through microRNA-145-5p-mediated downregulation of Cyr61. *Life Sci.* **209**, 132–139

67. Cabezas-Perez, R., Vallejo-Pulido, A., Freyre-Bernal, S., Umaña-Perez, A., and Sanchez-Gomez, M. (2011) IGF-II y la Gonadotropina Coriónica regulan la proliferación, migración e invasión de células de trofoblasto humano. *Acta Biol. Colomb.* **16**, 143–152

68. Sánchez-gómez, M. (2014) Entendiendo el papel del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la regulación funcional del trofoblasto humano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **38(Supl.)**, 118–28

69. Espelund, U., Cold, S., Frystyk, J., Ørskov, H., and Flyvbjerg, A. (2008) Elevated free IGF2 levels in localized, early-stage breast cancer in women. *Eur. J. Endocrinol.* **159**, 595–601

70. Wu, L.-P., Wang, N.-C., Chang, Y.-H., Tian, X.-Y., Na, D.-Y., Zhang, L.-Y., Zheng, L., Lan, T., Wang, L.-F., and Liang, G.-D. (2007) Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1562–1564

71. Tian, D., Mitchell, I., and Kreeger, P. K. (2015) Quantitative analysis of insulin-like growth factor 2 receptor and insulin-like growth factor binding proteins to identify control mechanisms for insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylation. *BMC Syst. Biol.* **10**, 15

72. Kushlinskii, N. E., Gershtein, E. S., Nikolaev, A. A., Delektorskaya, V. V., Korotkova, E. A., Dvorova, E. K., and Kostyleva, O. I. (2014) Insulin-like growth factors (IGF), IGF-binding proteins (IGFBP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood serum of patients with colorectal cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* **156**, 684–688

73. Novoa-herrán, S. S., and Sánchez de Gómez, M. (2011) El IGF-II estimula la actividad de MMP-9 y MMP-2 en un modelo de trofoblasto humano. *Acta Biológica Colomb.* **16**, 121–131

74. Freyre Bernal, S. I. (2010) *Papel del Sistema de Factores de Crecimiento Similares a la Insulina (IGF) en la Regulacion y Diferenciación Trofoblastica*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia

75. Cabezas Pérez, R. J. (2010) *Implicaciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) en el desarrollo de la enfermedad trofoblástica gestacional*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia

76. Harris, L. K., Crocker, I. P., Baker, P. N., Aplin, J. D., and Westwood, M. (2011) IGF2 Actions on Trophoblast in Human Placenta Are Regulated by the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor, Which Can Function as Both a Signaling and Clearance Receptor1. *Biol. Reprod.* **84**, 440–446

77. McKinnon, T., Chakraborty, C., Gleeson, L. M., Chidiac, P., and Lala, P. K. (2001)

Stimulation of Human Extravillous Trophoblast Involving Inhibitory G Protein (s) and Phosphorylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 3665–3674

78. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006) The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**, 1–14

79. Zhang, X., and Jonassen, I. (2020) RASflow: An RNA-Seq analysis workflow with Snakemake. *BMC Bioinformatics*. **21**, 110

80. Andrews, S. (2010) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]

81. TrimGalore

82. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., and Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods*. **14**, 417–419

83. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 10.1186/s13059-014-0550-8

84. Moran, S., Arribas, C., and Esteller, M. (2016) Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*. **8**, 389–399

85. Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., Van Djik, S., Muhlhausler, B., Stirzaker, C., and Clark, S. J. (2016) Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol.* **17**, 208

86. Müller, F., Scherer, M., Assenov, Y., Lutsik, P., Walter, J., Lengauer, T., and Bock, C. (2019) RnBeads 2.0: Comprehensive analysis of DNA methylation data. *Genome Biol.* **20**, 55

87. Perrier, F., Novoloaca, A., Ambatipudi, S., Baglietto, L., Ghantous, A., Perduca, V., Barrdahl, M., Harlid, S., Ong, K. K., Cardona, A., Polidoro, S., Nøst, T. H., Overvad, K., Omichessan, H., Dollé, M., Bamia, C., Huerta, J. M., Vineis, P., Herceg, Z., Romieu, I., and Ferrari, P. (2018) Identifying and correcting epigenetics measurements for systematic sources of variation. *Clin. Epigenetics*. **10**, 38

88. McCartney, D. L., Walker, R. M., Morris, S. W., McIntosh, A. M., Porteous, D. J., and Evans, K. L. (2016) Identification of polymorphic and off-target probe binding sites on the Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip. *Genomics Data*. **9**, 22–24

89. AE, T., F, M., M, L., T, B., J, T., D, G.-C., and S, B. (2013) A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. **29**, 189–196

90. Du, P., Zhang, X., Huang, C. C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., and Lin, S. M. (2010)

Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. **11**, 587

91. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., and Smyth, G. K. (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47

92. Illumina Illumina MethylationEPIC Manifiest file

93. Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., and Ma'ayan, A. (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97

94. Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P., and Detmar, M. (2018) TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *https://doi.org/10.2144/000113083*. **46**, 265–274

95. Forbes, K., Westwood, M., Baker, P. N., and Aplin, J. D. (2008) Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am. J. Physiol. Physiol.* **294**, C1313–C1322

96. Umana-Perez, A., Novoa-Herran, S., Castro, J., Correa-Sanchez, A., Guevara, V., Lopez-Gonzalez, D., and Sanchez-Gomez, M. (2020) Role of the Insulin-like growth factor axis and the Transforming growth factor-β in the regulation of the placenta and the pathogenesis of Gestational Trophoblastic Diseases. *Med. Res. Arch.* 10.18103/mra.v8i10.2247

97. Li, E., and Zhang, Y. (2014) DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.1101/cshperspect.a019133

98. Lowdon, R. F., Jang, H. S., and Wang, T. (2016) Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes. *Trends Genet.* **32**, 269–283

99. Zhang, X., and Ho, S. M. (2011) Epigenetics meets endocrinology. *J. Mol. Endocrinol.* **46**, R11

100. Houshdaran, S., Oke, A. B., Fung, J. C., Vo, K. C., Nezhat, C., and Giudice, L. C. (2020) Steroid hormones regulate genome-wide epigenetic programming and gene transcription in human endometrial cells with marked aberrancies in endometriosis. *PLoS Genet.* **16**, e1008601

101. Li, J.-Y., Pu, M.-T., Hirasawa, R., Li, B.-Z., Huang, Y.-N., Zeng, R., Jing, N.-H., Chen, T., Li, E., Sasaki, H., and Xu, G.-L. (2007) Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of Oct4 and Nanog. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8748–8759

102. Wang, G., Weng, R., Lan, Y., Guo, X., Liu, Q., Liu, X., Lu, C., and Kang, J. (2017) Synergetic effects of DNA methylation and histone modification during mouse induced pluripotent stem cell generation. *Sci. Rep.* **7**, 1–12

103. Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2001) DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*. **20**, 3156–3165

104. Varley, K. E., Gertz, J., Bowling, K. M., Parker, S. L., Reddy, T. E., Pauli-Behn, F., Cross, M. K., Williams, B. A., Stamatoyannopoulos, J. A., Crawford, G. E., Absher, D. M., Wold, B. J., and Myers, R. M. (2013) Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* **23**, 555–567

105. Blake, L. E., Roux, J., Hernando-Herraez, I., Banovich, N. E., Perez, R. G., Hsiao, C. J., Eres, I., Cuevas, C., Marques-Bonet, T., and Gilad, Y. (2020) A comparison of gene expression and DNA methylation patterns across tissues and species. *Genome Res.* **30**, 250–262

106. Nordor, A. V., Nehar-Belaid, D., Richon, S., Klatzmann, D., Bellet, D., Dangles-Marie, V., Fournier, T., and Aryee, M. J. (2017) The early pregnancy placenta foreshadows DNA methylation alterations of solid tumors. *Epigenetics*. **12**, 793–803

107. Schmit, K., and Michiels, C. (2018) TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Front. Pharmacol.* **9**, 1345

108. Abu-Odeh, M., Bar-Mag, T., Huang, H., Kim, T. H., Salah, Z., Abdeen, S. K., Sudol, M., Reichmann, D., Sidhu, S., Kim, P. M., and Aqeilan, R. I. (2014) Characterizing WW domain interactions of tumor suppressor WWOX reveals its association with multiprotein networks. *J. Biol. Chem.* **289**, 8865–8880

109. Ludes-Meyers, J. H., Kil, H., Bednarek, A. K., Drake, J., Bedford, M. T., and Aldaz, C. M. (2004) WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: Identification of candidate interacting proteins. *Oncogene*. **23**, 5049–5055

110. Zhou, J. G., Zhao, H. T., Jin, S. H., Tian, X., and Ma, H. (2019) Identification of a RNA-seq-based signature to improve prognostics for uterine sarcoma. *Gynecol. Oncol.* **155**, 499–507

111. Zhang, X., Liu, B., Zhang, J., Yang, X., Zhang, G., Yang, S., Wang, J., Shi, J., Hu, K., Wang, J., Jing, H., Ke, X., and Fu, L. (2019) Expression level of ACOT7 influences the prognosis in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Biomarkers*. **26**, 441–449

112. Feng, H., and Liu, X. (2020) Interaction between ACOT7 and LncRNA NMRAL2P via methylation regulates gastric cancer progression. *Yonsei Med. J.* **61**, 471–481

113. Natunen, T., Helisalmi, S., Vepsäläinen, S., Sarajärvi, T., Antikainen, L., Mäkinen, P., Herukka, S. K., Koivisto, A. M., Haapasalo, A., Soininen, H., and Hiltunen, M. (2012) Genetic analysis of genes involved in amyloid-β degradation and clearance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **28**, 553–559

114. Pinto, F. M., Ravina, C. G., Subiran, N., Cejudo-Román, A., Fernández-Sánchez, M., Irazusta, J., Garrido, N., and Candenas, L. (2010) Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 104

115. Ren, J., Niu, G., Wang, X., Song, T., Hu, Z., and Ke, C. (2018) Overexpression of FNDC1 in gastric cancer and its prognostic significance. *J. Cancer*. **9**, 4586–4595

116. Yumrutas, O., Oztuzcu, S., Büyükhatipoglu, H., Bozgeyik, I., Bozgeyik, E., Igci, Y. Z., Bagis, H., Cevik, M. O., Kalender, M. E., Eslik, Z., and Arslan, A. (2015) The role of the UTS2 gene polymorphisms and plasma Urotensin-II levels in breast cancer. *Tumor Biol.* **36**, 4427–4432

117. Fang, C., Jiang, B., Shi, X., and Fan, C. (2019) Hes3 enhances the malignant phenotype of lung cancer through upregulating cyclin D1, cyclin D3 and MMP7 expression. *Int. J. Med. Sci.* **16**, 470–476

118. Velasco, G., Pendás, A. M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G., and López-Otín, C. (1999) Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem.* **274**, 4570–4576

119. Allione, A., Pardini, B., Viberti, C., Giribaldi, G., Turini, S., Di Gaetano, C., Guarrera, S., Cordero, F., Oderda, M., Allasia, M., Gontero, P., Sacerdote, C., Vineis, P., and Matullo, G. (2018) MMP23B expression and protein levels in blood and urine are associated with bladder cancer. *Carcinogenesis*. **39**, 1254–1263

120. Barron, C. C., Bilan, P. J., Tsakiridis, T., and Tsiani, E. (2016) Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism.* **65**, 124–139

121. Chai, Y. J., Yi, J. W., Oh, S. W., Kim, Y. A., Yi, K. H., Kim, J. H., and Lee, K. E. (2017) Upregulation of SLC2 (GLUT) family genes is related to poor survival outcomes in papillary thyroid carcinoma: Analysis of data from The Cancer Genome Atlas. in *Surgery (United States)*, pp. 188–194, Mosby Inc., **161**, 188–194

122. Idriss, H. T., and Naismith, J. H. (2000) TNFα and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* **50**, 184–195

123. Yu-Di, Z., and Ming-Yue, L. (2018) Increased expression of TNFRSF14 indicates good prognosis and inhibits bladder cancer proliferation by promoting apoptosis. *Mol. Med. Rep.* **18**, 3403–3410

124. Kotsiou, E., Okosun, J., Besley, C., Iqbal, S., Matthews, J., Fitzgibbon, J., Gribben, J. G., and Davies, J. K. (2016) TNFRSF14 aberrations in follicular lymphoma increase clinically significant allogeneic T-cell responses. *Blood*. **128**, 72–81

125. Chai, P., Yu, J., Ge, S., Jia, R., and Fan, X. Genetic alteration, RNA expression, and DNA methylation profiling of coronavirus disease 2019 (COVID-19) receptor ACE2 in malignancies: a pan-cancer analysis. 10.1186/s13045-020-00883-5

126. Razin, A., and Kantor, B. (2005) DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **38**, 151–167

127. Lindner, M., Verhagen, I., Viitaniemi, H. M., Laine, V. N., Visser, M. E., Husby, A., and van Oers, K. (2021) Temporal changes in DNA methylation and RNA expression in a small song bird: within- and between-tissue comparisons. *BMC Genomics*. **22**, 36

128. Motwani, J., Rodger, E. J., Stockwell, P. A., Baguley, B. C., Macaulay, E. C., and

Eccles, M. R. (2021) Genome-wide DNA methylation and RNA expression differences correlate with invasiveness in melanoma cell lines. *Epigenomics*. 10.2217/epi-2020-0440

129. Siegfried, Z., and Simon, I. (2010) DNA methylation and gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2**, 362–371

130. Wang, Z. Q., Sun, X. L., Wang, Y. L., and Miao, Y. L. (2020) Agrin promotes the proliferation, invasion and migration of rectal cancer cells via the WNT signaling pathway to contribute to rectal cancer progression. *J. Recept. Signal Transduct.* 10.1080/10799893.2020.1811325

131. Henrich, K. O., Bauer, T., Schulte, J., Ehemann, V., Deubzer, H., Gogolin, S., Muth, D., Fischer, M., Benner, A., König, R., Schwab, M., and Westermann, F. (2011) CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **71**, 3142–3151

132. Habbig, S., Bartram, M. P., Müller, R. U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J. G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M. C., Reinhardt, H. C., Benzing, T., and Schermer, B. (2011) NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* **193**, 633–642

133. Jin, W. (2020) Novel Insights into PARK7 (DJ-1), a Potential Anti-Cancer Therapeutic Target, and Implications for Cancer Progression. *J. Clin. Med.* **9**, 1256

134. Holm, M., Joenväärä, S., Saraswat, M., Tohmola, T., Ristimäki, A., Renkonen, R., and Haglund, C. (2020) Plasma protein expression differs between colorectal cancer patients depending on primary tumor location. *Cancer Med.* **9**, 5221–5234

135. Chen, S., Tan, Y., Deng, H., Shen, Z., Liu, Y., Wu, P., Tan, C., and Jiang, Y. (2017) UBE2J2 promotes hepatocellular carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and invasion in vitro. *Oncotarget*. **8**, 71736–71749

136. Oo, A. K. K., Calle, A. S., Nair, N., Mahmud, H., Vaidyanath, A., Yamauchi, J., Khayrani, A. C., Du, J., Alam, M. J., Seno, A., Mizutani, A., Murakami, H., Iwasaki, Y., Chen, L., Kasai, T., and Seno, M. (2018) Up-Regulation of PI 3-Kinases and the Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway in Cancer Stem-Like Cells Through DNA Hypomethylation Mediated by the Cancer Microenvironment. *Transl. Oncol.* **11**, 653–663

137. Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 10.1038/nrg3230

138. Borodinova, A. A., Kuznetsova, M. A., Alekseeva, V. S., and Balaban, P. M. (2019) Histone acetylation determines transcription of atypical protein kinases in rat neurons. *Sci. Rep.* **9**, 1–12

139. Rymen, B., Kawamura, A., Lambolez, A., Inagaki, S., Takebayashi, A., Iwase, A., Sakamoto, Y., Sako, K., Favero, D. S., Ikeuchi, M., Suzuki, T., Seki, M., Kakutani, T., Roudier, F., and Sugimoto, K. (2019) Histone acetylation orchestrates wound-

induced transcriptional activation and cellular reprogramming in Arabidopsis. *Commun. Biol.* **2**, 1–15

140. Glasow, A., Barrett, A., Petrie, K., Gupta, R., Boix-Chornet, M., Zhou, D. C., Grimwade, D., Gallagher, R., Von Lindern, M., Waxman, S., Enver, T., Hildebrandt, G., and Zelent, A. (2008) DNA methylation-independent loss of RARA gene expression in acute myeloid leukemia. *Blood*. **111**, 2374–2377

141. Zhou, J.-D., Zhang, T.-J., Li, X.-X., Ma, J.-C., Guo, H., Wen, X.-M., Yao, D.-M., Zhang, W., Lin, J., and Qian, J. (2018) Methylation-independent CHFR expression is a potential biomarker affecting prognosis in acute myeloid leukemia. *J. Cell. Physiol.* **233**, 4707–4714

142. Navasa, N., Martin-Ruiz, I., Atondo, E., Sutherland, J. D., Angel Pascual-Itoiz, M., Carreras-González, A., Izadi, H., Tomás-Cortázar, J., Ayaz, F., Martin-Martin, N., Torres, I. M., Barrio, R., Carracedo, A., Olivera, E. R., Rincón, M., and Anguita, J. (2015) Ikaros mediates the DNA methylation-independent silencing of MCJ/DNAJC15 gene expression in macrophages. *Sci. Rep.* **5**, 14692

143. Kim, J., Lee, Y., Lu, X., Song, B., Fong, K. W., Cao, Q., Licht, J. D., Zhao, J. C., and Yu, J. (2018) Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Rep.* **25**, 2808-2820.e4

144. Mumtaz Taqi, M., Bazov, I., Watanabe, H., Sheedy, D., Harper, C., Alkass, K., Druid, H., Wentzel, P., Nyberg, F., Yakovleva, T., and Bakalkin, G. (2011) Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: elevated methylation in the brain of human alcoholics. *Wiley Online Libr.* **16**, 499–509

145. Samy, M. D., Yavorski, J. M., Mauro, J. A., and Blanck, G. (2016) Impact of SNPs on CpG Islands in the MYC and HRAS oncogenes and in a wide variety of tumor suppressor genes: A multi-cancer approach. *Cell Cycle*. **15**, 1572–1578

146. Schoenfelder, S., and Fraser, P. (2019) Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 437–455

147. Zheng, H., and Xie, W. (2019) The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 535–550

148. de Moraes Salgado, C., da Silva Miyaguti, N. A., de Oliveira, S. C. P., Favero-Santos, B. C., Viana, L. R., de Moraes Santos Oliveira, M., and Gomes-Marcondes, M. C. C. (2021) Cancer during pregnancy. Maternal, placenta, and fetal damage. Nutrition, antioxidant defenses, and adult offspring tumor-bearing. in *Cancer*, pp. 121–129, Elsevier, 10.1016/b978-0-12-819547-5.00012-2

149. Maghbooli, Z., Hossein-nezhad, A., Adabi, E., Asadollah-pour, E., Sadeghi, M., Mohammad-nabi, S., Zakeri Rad, L., Malek Hosseini, A., Radmehr, M., Faghihi, F., Aghaei, A., Omidifar, A., Aghababei, Y., and Behzadi, H. (2018) Air pollution during pregnancy and placental adaptation in the levels of global DNA methylation. *PLoS One*. **13**, e0199772

150. Santos, H. P., Bhattacharya, A., Martin, E. M., Addo, K., Psioda, M., Smeester, L., Joseph, R. M., Hooper, S. R., Frazier, J. A., Kuban, K. C., O'Shea, T. M., and Fry, R. C. (2019) Epigenome-wide DNA methylation in placentas from preterm infants: association with maternal socioeconomic status. *Epigenetics*. **14**, 751–765

151. Tekola-Ayele, F., Zeng, X., Ouidir, M., Workalemahu, T., Zhang, C., Delahaye, F., and Wapner, R. DNA methylation loci in placenta associated with birthweight and expression of genes relevant for early development and adult diseases. 10.1186/s13148-020-00873-x

152. Rousseaux, S., Seyve, E., Chuffart, F., Bourova-Flin, E., Benmerad, M., Charles, M. A., Forhan, A., Heude, B., Siroux, V., Slama, R., Tost, J., Vaiman, D., Khochbin, S., and Lepeule, J. (2020) Immediate and durable effects of maternal tobacco consumption alter placental DNA methylation in enhancer and imprinted gene-containing regions. *BMC Med.* **18**, 306

153. Radhakrishna, U., Vishweswaraiah, S., Uppala, L. V., Szymanska, M., Macknis, J., Kumar, S., Saleem-Rasheed, F., Aydas, B., Forray, A., Muvvala, S. B., Mishra, N. K., Guda, C., Carey, D. J., Metpally, R. P., Crist, R. C., Berrettini, W. H., and Bahado-Singh, R. O. (2021) Placental DNA methylation profiles in opioid-exposed pregnancies and associations with the neonatal opioid withdrawal syndrome. *Genomics*. **113**, 1127–1135

154. Kinnon, T. M. C., Chakraborty, C., Gleeson, L. M., Chidiac, P., Lala, P. K., Anatomy, D., M, C. B. T., and Pathology, C. C. (2001) Stimulation of Human Extravillous Trophoblast Migration by IGF-II Is Mediated by IGF Type 2 Receptor Involving Inhibitory G Protein (s) and Phosphorylation of MAPK. **86**, 3665–3674

155. Crosley, E. J., Dunk, C. E., Beristain, A. G., and Christians, J. K. (2014) IGFBP-4 and -5 are expressed in first-trimester villi and differentially regulate the migration of HTR-8/SVneo cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 1–7

156. Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2011) The IGF system. *Acta Diabetol.* **48**, 1–9

157. Weroha, S. J., and Haluska, P. (2013) IGF System in Cancer. *Endocinol Metab Clin North Am*. **41**, 1–15

158. Nakamura, H., Dan, S., Akashi, T., Okui, M., Egawa, S., Ishikawa, Y., Unno, M., and Yamori, T. (2007) Ectopic expression of PIK3CD in human cancer cell lines and human lung carcinoma. *Cancer Res.*

159. Chen, J. S., Huang, J. Q., Luo, B., Dong, S. H., Wang, R. C., Jiang, Z. kun, Xie, Y. K., Yi, W., Wen, G. M., and Zhong, J. F. (2019) PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3β/β-catenin signaling in colorectal cancer. *Cancer Sci.* **110**, 997–1011

160. Yao, Z., Di Poto, C., Mavodza, G., Oliver, E., Ressom, H. W., and Sherif, Z. A. (2019) DNA Methylation Activates TP73 Expression in Hepatocellular Carcinoma and Gastrointestinal Cancer. *Sci. Rep.* **9**, 1–10

161. Costanzo, A., Pediconi, N., Narcisi, A., Guerrieri, F., Belloni, L., Fausti, F., Botti, E., and Levrero, M. (2014) TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett.* **588**, 2590–2599

162. Franke, T. F. PI3K/Akt: getting it right matters. 10.1038/onc.2008.313

163. Jiang, N., Dai, Q., Su, X., Fu, J., Feng, X., and Peng, J. (2020) Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 4587–4629

164. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W. C., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. **417**, 949–954