

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



*Estudio de la metilación de los genes *FLNc* y *POLE* en cáncer de mama.*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Rocío García Serra

TUTORAS: Pilar Eroles Asensio y Begoña Pineda Merlo

TUTOR ACADÉMICO: Rafael Sirera Pérez

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, 10 Julio de 2017

Título del TFG

Estudio de la metilación de los genes FLNc y POLE en cáncer de mama.

Autora

Rocío García Serra

Titulación

Grado en Biotecnología

Tutoras

Pilar Eroles Asensio y Begoña Pineda Merlo

Fecha y localidad de lectura

Valencia, julio de 2017

ABSTRACT

Epigenetics comprise the study of gene expression modifications different from DNA sequence alterations. One of this modifications is DNA methylation, which may alter gene expression in cellular processes and contribute to breast cancer development and progression. Tumour cells are characterized by a massive loss of methylation and also a hypermethylated pattern in certain promoters.

In DNA repair genes, certain abnormal methylations may cause gene silencing, and therefore damaged DNA would not be repaired. Alterations in methylation levels may be involved in tumour etiology and also in some resistance mechanisms of current treatments.

Structural and cell adhesion proteins coding genes have a pivotal role in metastasis and progression, since it is facilitated by the interaction between tumor cells and distant tissue cells. In the same way as before, certain modifications in these genes may be related with differences in levels of metastization.

In this project, methylation of certain regions of a DNA repair gene (FLNc) and a gene involved in the cell structure and adhesion (POLE) have been studied by means of Sequenom technology. Cell lines from different breast cancer subtypes (HER2+, luminal and triple negative) and the non-tumoral cell lines MCF10A and MCF12A have been used in order to find a methylation pattern related with the presence and development of breast cancer, and therefore a possible diagnostic or prognosis marker. This is particularly important in triple negative cancer, which lacks of an effective specific anti-target treatment.

KEYWORDS

Methylation – breast cáncer – FLNc – POLE – cell repair – cell damage – cell structure– adhesion – Sequenom

RESUMEN

La epigenética comprende el estudio de modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a alteraciones en la secuencia de ADN. Entre estas modificaciones se encuentra la metilación del ADN, que puede alterar anormalmente la expresión de genes en procesos celulares y contribuir al desarrollo y progresión del cáncer de mama. Las células tumorales se caracterizan por una pérdida masiva de metilación y al mismo tiempo por la adquisición de un patrón de hipermetilación en islas CpG de ciertos promotores.

En el caso de genes reparadores del ADN, ciertas metilaciones anormales podrían causar un silenciamiento del gen, por lo que se dejaría de realizar correctamente esta función reparadora. Alteraciones en los niveles normales de metilación de estos genes podrían estar implicadas en la etiología del tumor, así como en los mecanismos de resistencia a alguno de los tratamientos actuales.

Por otra parte, los genes codificantes de proteínas de adhesión y estructura celular desempeñan un papel fundamental en la progresión y metástasis, debido a que pueden facilitar la interacción de las células tumorales con células de tejidos lejanos. De la misma manera, ciertas modificaciones en estos genes podrían relacionarse con diferencias en la capacidad de los tumores de producir una metástasis.

En este proyecto se ha estudiado la metilación de regiones concretas de POLE, un gen reparador del ADN; y FLNc, gen relacionado con la estructura y adhesión celular, mediante la tecnología Sequenom. Se han utilizado líneas celulares de diferentes subtipos de cáncer de mama (HER2+, luminales y triple negativo) y las líneas no tumorales de mama MCF10A y MCF12A, con el objetivo de encontrar un posible patrón de metilación relacionado con la existencia de la enfermedad y su desarrollo y por lo tanto, un posible marcador de diagnóstico y/o pronóstico. Esto es de especial importancia en el subtipo triple negativo, el cual actualmente carece de un tratamiento anti- diana específico efectivo.

PALABRAS CLAVE

Metilación – cáncer de mama – FLNc – POLE – reparación celular – daño celular – estructura celular – adhesión– Sequenom

AGRADECIMIENTOS

Lo primero agradecer a Pilar Eroles por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de TFG con ellos. Desde que me enseñó en qué iban a consistir mis prácticas hace un año, me encantó el tema de estudio en el laboratorio, y nunca pensé durante la carrera que iba a poder participar en un proyecto tan bonito.

Gracias también por ponerme a cargo de Begoña Pineda, creo que para mí no hay ejemplo mejor a seguir en un laboratorio: minuciosa en su trabajo, eficaz, ordenada y exigente, pero también una persona muy humana, que siempre está para ayudarte, apoyarte o darte una sonrisa cuando lo necesitas. Gracias a las dos porque se han volcado en mi trabajo, planteándolo, supervisándolo y corrigiendo las mil versiones que he hecho durante mañanas enteras en el despacho. Ha sido un placer trabajar con vosotras.

Cómo no, también he de dar las gracias al resto del laboratorio 2 del UCIM: Paula, Anna, Iris, Birlipta y Edu, porque me han resuelto todas las dudas que una y otra vez iba a preguntarles y por aguantar que retrasara todos los turnos de la campana de cultivos cuando iba más lenta de lo que tocaba. Y que no se me olviden todas las comidas y conversaciones en el laboratorio que han hecho mi estancia allí mucho más amena.

También agradecer al laboratorio 1, que aunque no fue mi laboratorio, fue mi segunda casa allí: Ray, Carlos, Paola y Pedro por animarme, darme conversación y poner buena música mientras estaba en cultivos. ¡Y también a Alba y Marta por hacer que los tiempos de espera de las extracciones fuesen mucho menos aburridos!

No puede faltar una mención especial a Birlipta y Carlos, porque ellos dos me han ayudado muchísimo estos meses, cuidándome las células cuando yo no estaba o dejándome la tarjeta y las llaves diez veces al día, entre muchas cosas. De verdad, no sé qué hubiese hecho sin ellos.

Por supuesto, gracias a mis amigos de la carrera y a Jordi, por escuchar todas mis batallitas en mi laboratorio, contarme las vuestras, y animarme en los peores momentos. Habéis sido un apoyo fundamental en todo este tiempo, y gracias a vosotros he sido más fuerte.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi familia por toda la educación que me han dado y me ha permitido llegar hasta donde estoy. Y por querer enterarse siempre de lo que hago con mis “bichitos”, aunque no se enteren de la mitad.

Gracias a todos. Mi TFG es vuestro.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Cáncer de mama	1
1.1.1	Historia	1
1.1.2	Impacto en la sociedad.....	1
1.2	Clasificación de los subtipos y tratamientos	2
1.3	Epigenética en cáncer de mama	6
1.4	Genes reparadores del ADN	7
1.5	Genes estructurales y de adhesión célula-célula	8
1.3.1	Filaminas.....	8
1.3.2	FLNc	8
2	Hipótesis y objetivos	9
3	3. Materiales y métodos.....	10
3.1	Cultivos celulares.....	10
3.1.1	Líneas celulares: características y condiciones de cultivo.....	10
3.1.2	Descongelación de las líneas celulares.....	12
3.1.3	Subcultivo de células	12
3.1.4	Obtención de un pellet de células.....	12
3.1.5	Congelación de líneas celulares	13
3.2	Extracción y cuantificación de ADN.....	13
3.3	Selección de las regiones de los genes a estudiar.....	13
3.4	Tratamiento con Bisulfito	15
3.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
3.6	Reacción de transcripción y escisión.....	16
3.7	Espectrometría de masas	16
3.8	Análisis estadístico	17
4	Resultados	18
4.1	Metilación en POLE	18
4.1.1	Amplificación POLE1	18
4.1.2	Amplificación POLE5	19
4.1.3	Amplificación POLE12	20
4.2	Metilación en FLNc.....	20
4.2.1	Amplificación FLNc2.....	20
4.2.2	Amplificación FLNc 6.....	25

5	Discusión	26
5.1	Marcadores epigenéticos en el ámbito clínico	26
5.2	4.2 Análisis de los resultados	26
5.2.1	Gen POLE.....	26
5.2.2	Gen FLNc.....	27
6	Conclusiones.....	30
7	Bibliografía	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama (Eroles et al., 2012). 2

Tabla 2: Características de las líneas celulares utilizadas en el estudio. 10

Tabla 3: Características de los amplicones utilizados en los genes FLNc y POLE y sus cebadores. 15

Tabla 4: CpGs estudiados para cada amplicón del gen POLE y posición que ocupan en su amplicón 18

Tabla 5: CpGs estudiados de cada amplicón del gen FLNc y posición que ocupan en su amplicón..... 20

Tabla 6: Porcentaje de metilación y P-valor para las líneas celulares AU565 y BT474 en los CpGs 10, 11 y 12..... 23

Tabla 7: Genes hipermetilados en la clínica. 26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia del cáncer de mama en la población mundial y española	1
Figura 2: Tasa de supervivencia y distribución de los receptores RE y HER2 en los subtipos de cáncer de mama.	5
Figura 3: Composición del subtipo Triple negativo (TN).....	5
Figura 4: Imágenes a microscopio óptico de algunas de las líneas celulares utilizadas en el estudio.).....	11
Figura 5: CpGs y amplicones del gen POLE obtenidos mediante Epidesigner (Agena).....	14
Figura 6: CpGs y amplicones del gen FLNc obtenidos mediante Epidesigner (Agena).	15
Figura 7: Proceso de transformación de la secuencia nucleotídica tras el tratamiento con bisulfito y la PCR.	15
Figura 8: Vista general del procedimiento del estudio de metilación.	17
Figura 9: Nivel de metilación en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama en el gen POLE.....	19
Figura 10: Nivel de metilación del CpG 1-4 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas	21
Figura 11: Nivel de metilación del CpG 5 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas.....	22
Figura 12: Nivel de metilación del CpG 6 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas.....	23
Figura 13: Nivel de metilación de los CpGs 13-14 y 15 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas.	24
Figura 14: Nivel de metilación del CpG 5 del amplicón FLNc6 en las líneas celulares estudiadas.....	25

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN; Ácido ribonucleico
BRCA1 y 2: genes “Cáncer de mama” 1 y 2
CO₂: Dióxido de carbono
Da: Daltons
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNMTs: ADN metiltransferasa
DTT: ditioneitol
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FLNc: gen “Filamina C”
G: constante de gravitación universal
HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
IA: Inhibidores de la aromatasa
MALDI-TOF: Espectrómetro de masas de desorción/ionización de matriz asistida por un láser – tiempo de vuelo
Min: Minutos
ml: Mililitro
mM: Milimolar
NHEJ: Non-homologous end joining
nm: Nanómetros
ng: Nanogramos
p: P-valor
PARP: Inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa
Pb: Pares de bases
PBS: Tampón fosfato alcalino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
POLE: ADN polimerasa ϵ
RE: Receptor de estrógenos
RP: Receptor de progesterona
Rpm: Revoluciones por minuto
RPMI: Medio del instituto Roswell Park
RPC: Respuesta patológica completa
SBF: suero bobino fetal
TA: Temperatura ambiente
TDM1: Trastuzumab-emtansine
TE: Tris-EDTA
Tm: Temperatura de fusión
TN: Triple negativo
 μ g: Microgramo
 μ l: Microlitros
 μ M: Micromolar
°C: Grados centígrados

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE MAMA

1.1.1 Historia

El cáncer de mama es una patología que se conoce desde tiempos ancestrales. Hace 4500 años, el Papiro quirúrgico de Edwin Smith ya nos describía la enfermedad. El papiro, cuya autoría se atribuye a Imhotep, padre de la medicina egipcia, consideraba a un paciente como incurable si la mama era fresca al tacto y abultada.

Ya en el año 400 a.C., Hipócrates afirma que anomalías en las relaciones entre los cuatro fluidos corporales (sangre, flema y bilis amarilla y negra) eran la causa del cáncer de mama (Donegan, 2006). La palabra carcinoma (del griego *karkinos*, cangrejo) proviene precisamente de escrituras helenísticas, puesto que el tumor parecía tener un cuerpo principal y extensiones que recuerdan a las patas de este animal (Ekmektzoglou et al., 2009).

Aunque la Edad Media supuso un freno en cualquier progreso en el campo de la medicina, en el renacimiento se profundiza en el estudio del cuerpo humano. En el siglo XIX, con el descubrimiento de la anestesia y el establecimiento de la microscopía; así como en el siglo XX, con el desarrollo de la quimioterapia, la radioterapia y la aparición de numerosos ensayos clínicos, se consiguen importantes avances científicos y conocimientos sobre esta patología (Ekmektzoglou et al., 2009).

Sin embargo, es en estos 20 últimos años cuando se han realizado enormes progresos, gracias al estudio de la biología molecular del cáncer de mama y los avances tecnológicos en el campo de la investigación. Es ahora cuando se habla de que el cáncer no es una enfermedad, sino que están englobadas varias patologías en ella. La identificación en los pacientes de rasgos característicos de un subtipo a partir de su perfil genético del tumor serán claves para conseguir una medicina personalizada y eficaz para cada uno de ellos (Eroles et al., 2012).

1.1.2 Impacto en la sociedad

El cáncer de mama es el segundo cáncer con mayor incidencia en todo el mundo (12% del total), y el primero en la población femenina, representando el 25% del total (Globocan, 2012) (Figura 1). Cada año se diagnostican 1.671.000 nuevos casos en todo el mundo. Es una enfermedad que afecta a mujeres, aunque existe un pequeño porcentaje de hombres (0,1%) que padecen también la enfermedad. Tan sólo en España se diagnostican 26000 nuevos casos cada año.

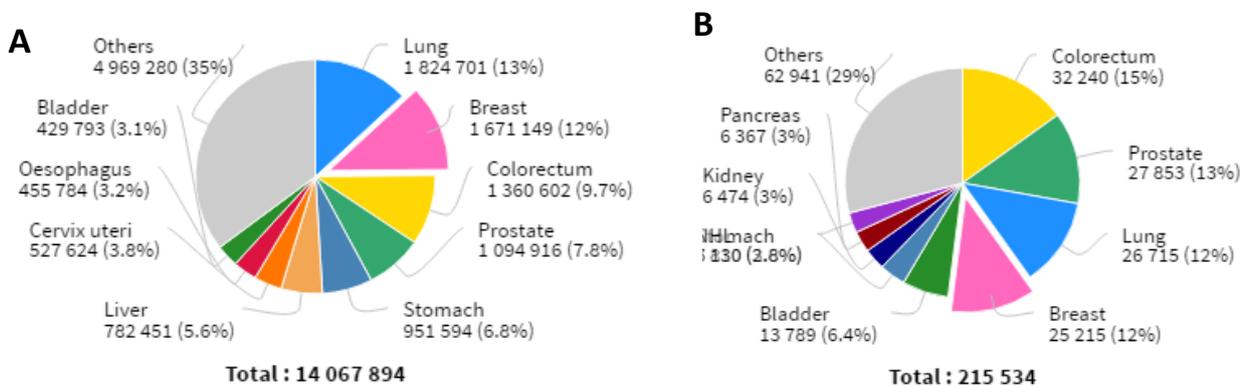


Figura 1: Incidencia del cáncer de mama en la población mundial y española. (A) Diagrama con el número estimado de casos de cáncer en ambos sexos, en la población mundial, en 2012. (B) Diagrama con el número estimado de casos de cáncer en ambos sexos, en España, en 2012 (Globocan, 2012).

La incidencia del cáncer de mama aumenta año tras año, probablemente debido al envejecimiento de la población y las campañas de cribado mamográfico que ayudan en el diagnóstico (Martín et al., 2015).

Constituye la causa de muerte más frecuente en mujeres de países subdesarrollados, mientras que en los países desarrollados es la segunda, después del cáncer de pulmón. La diferencia entre estas tasas de mortalidad de regiones del mundo es pequeña debido a que en las áreas donde hay una gran incidencia del cáncer (países desarrollados) la tasa de supervivencia también es mayor gracias a los avances en los tratamientos (Globocan, 2012).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS Y TRATAMIENTOS

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea en cuanto a histología, respuesta terapéutica, patrones de diseminación y pronóstico de la enfermedad (Prat & Perou, 2011).

Tradicionalmente, se ha estadificado un tumor a nivel histológico mediante la escala TMN, en la que se tiene en cuenta el tamaño del tumor (T), el número de nódulos linfáticos afectados (N) y el grado de diseminación (M). También se ha clasificado los tumores de los pacientes a nivel molecular, según la presencia de biomarcadores como el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) o el receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), habitualmente usados en el diagnóstico y elección de tratamiento para los pacientes.

Sin embargo, determinados pacientes adquieren resistencias al tratamiento, así como subtipos que no disponen de ninguna diana terapéutica específica actualmente. Es por ello que existe la necesidad de continuar investigando en la identificación y validación de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas (Eroles et al., 2012).

Aunque las dos clasificaciones anteriores sean utilizadas actualmente en la clínica, no son suficientes para explicar completamente la gran heterogeneidad dentro del cáncer de mama. Esta diversidad tumoral que existe se debe principalmente a las variaciones en los patrones de expresión génica celulares. Su estudio en los últimos años ha proporcionado las bases para conseguir una mejor clasificación de los subtipos de cáncer de mama (Perou et al., 2000).

En el año 2000, gracias a ensayos de expresión génica mediante microarrays, se definieron los subtipos luminal, HER2 positivo, normal breast y basal like (Perou et al., 2000). Posteriormente, se ampliaron los grupos y se pudo comprobar que cada subtipo estaba correlacionado con un pronóstico diferente (Tabla 1).

Tabla 1: Características de los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama (Eroles et al., 2012).

Subtipo molecular	Frecuencia	ER/PR/HER2	CK5/6 EGFR	Genes de proliferación	Grado histológico	Mutación en TP53	Pronóstico
Luminal A	50-60%	+ / + / -	-	Bajo	Bajo	Bajo	Excelente
Luminal B	10-20%	+ - / + - / - +	-	Alto	Intermedio - alto	Intermedio	Intermedio - malo
HER2 +	10-15%	- / - / +	+ / -	Alto	Alto	Alto	Malo
Basal-like	10-20%	- / - / -	+	Alto	Alto	Alto	Malo
Normal breast-like	5-10%	- + / / -	+	Bajo	Bajo	Bajo	Intermedio
Claudin low	12-14%	- / - / -	+ / -	Alto	Alto	Alto	Malo

Luminal A

Este subtipo es el más común, representando entre el 50-60% del total de tumores. Está caracterizado por la expresión de genes activados por el factor de transcripción RE y una baja expresión de genes proliferativos (Perou et al., 2000; Sotiriou et al., 2003). El perfil inmunohistoquímico se suele caracterizar por una expresión de RE, RP, Bcl-2 y citokeratina CK8/18, ausencia de expresión de HER2, una baja proliferación medida por Ki67 (proteína asociada a proliferación celular) y bajo grado histológico (Figura 1).

Su pronóstico es bueno, y la tasa de recaída (27,8%) es más baja que en otros subtipos (Kennecke et al., 2010) (Figura 2). El tratamiento para los pacientes del subtipo luminal A se realiza mediante inhibidores de la aromatasa (IA) de tercera generación, moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERMs, por sus siglas en inglés), como tamoxifeno, y reguladores de RE como fulvestrant (Guarneri & Conte, 2009).

Luminal B

Este subtipo engloba del 10 al 20% del total de tumores. Es similar en cuanto a expresión con respecto a luminal A, salvo con una mayor expresión en genes de proliferación, como Ki67 y ciclina B1. Generalmente son RE+ y/o RP+, y HER2+ y/o Ki67+.

El fenotipo luminal B es mucho más agresivo en comparación con el A, tiene un grado histológico mayor y peor pronóstico (Figura 2). La supervivencia libre de enfermedad es menor, en torno a 1,6 años. Al igual que en luminal A, el órgano más común de recaída es el hueso, con un 30%, aunque en luminal B es común también en otras localizaciones, como el hígado (18%) (Kennecke et al., 2010).

El mejor tratamiento disponible actualmente para este subtipo es la quimioterapia neoadyuvante (terapia cuyo objetivo es reducir el tamaño del tumor antes de una operación quirúrgica), mediante la cual se consigue que el 17% de los tumores luminales B adquieran una respuesta patológica completa (RPC). Los tratamientos que se utilizan para luminal A, tamoxifeno y IA, no consiguen tan buenos resultados en luminal B. Sin embargo, la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en luminal B no es tan buena como en HER2+ y basal-like (con un 36% y 43% de respuesta respectivamente), por lo que el tratamiento en estos pacientes es todavía un desafío (Eroles et al., 2012).

HER2 positivo

A este subtipo pertenecen entre el 15 y 20% del total de tumores de mama. Tienen una alta expresión del gen HER2, así como genes relacionados con la ruta de HER2. Se caracterizan por una baja expresión de genes característicos del grupo luminal (RE y RP), y sobreexpresión de genes proliferativos.

Este subtipo tiene un mal pronóstico, sin embargo, recientemente los tratamientos anti HER2 han mejorado mucho la esperanza de vida. También se caracteriza por tener una alta tasa de respuesta frente a la quimioterapia.

Actualmente, la terapia disponible es Trastuzumab (Herceptin®), un anticuerpo monoclonal que inhibe la proliferación y supervivencia de tumores HER2 positivo. Se trata de una terapia dirigida, es decir, que afecta a una molécula específica de las células cancerosas, siendo inefectivo o prácticamente inefectivo en otras células. Por ello, es menos tóxica que otras terapias.

Sin embargo, se ha observado que algunos tumores tienen resistencia intrínseca o adquirida a este anticuerpo (Slamon et al., 2001). Por tanto, aún se debe mejorar la estratificación de los pacientes dentro de este grupo (Staaf et al., 2010). La segunda opción de tratamiento es trastuzumab-emtansine (TDM1), para pacientes en los que trastuzumab no sea efectivo.

Normal breast

Se trata de tumores poco caracterizados que representan el 5-10% del total. Se caracteriza por la expresión de genes propios del tejido adiposo, la ausencia de los tres receptores claves en cáncer de mama (RE, RP y HER2) y ausencia también de CK5 y EGFR. Su pronóstico es intermedio entre luminales y basal-like (Eroles et al., 2012). Sin embargo, existe una hipótesis de que este grupo podría no existir en realidad, y ser consecuencia de una contaminación de tejido normal en la muestra (Weigelt et al., 2010).

Basal-like

El 10-20% de los carcinomas de mama pertenecen a este subtipo, el cual se considera el más agresivo. Presentan genes codificantes para citokeratinas de alto peso molecular (CK5 y CK17), P-caderina, caveolina 1y 2, nestina, CD44 y EGFR. Todos ellos están presentes en células mamarias mioepiteliales normales, de ahí que se llamen *basal-like*. Otra característica es la ausencia de los tres receptores más importantes implicados en el cáncer de mama: RE, RP y HER2. Para identificar a este grupo mediante inmunohistoquímica se usan los marcadores de RE, RP, HER2, EGFR y CK5/6.

A pesar de presentar gran respuesta ante quimioterápicos, este grupo posee un peor pronóstico que el subtipo luminal y una mayor recaída (Figura 2). Esto puede ser debido a la gran tasa de mutaciones en p53 (Sorlie et al., 2001). Además, una mutación en la línea germinal en el gen BRCA1 predispone a los pacientes a desarrollar tumores basal-like, y está asociado a una falta de expresión de RE y un peor pronóstico (Sorlie et al., 2003).

Este subgrupo se podría confundir con el subgrupo triple negativo (TN), puesto que carece de los tres receptores hormonales (ver apartado triple negativo). Sin embargo, no son términos equivalentes, puesto que existe una discordancia del 30% entre tumores basal-like y TN (Kreike et al., 2007) (Figura 3).

Claudin-low

El subtipo claudin-low corresponde entorno al 12% del total de tumores de mama. Su nombre se debe a que se caracterizan por una baja expresión en claudinas, así como otras proteínas relacionadas con las uniones estrechas y la adhesión intercelular: ocludina, cingulina y E-cadherina (Herschkowitz et al., 2007). También es característica una baja expresión de genes proliferativos, y la sobreexpresión de 40 genes relacionados con la respuesta inmune.

En cuanto a inmunohistoquímica, generalmente son TN, puesto que carecen de RE, RP y HER2 (ver apartado triple negativo). Sin embargo, igual que en el subtipo basal-like, no todos los tumores son TN, puesto que el 20% son positivos para algún receptor hormonal (Prat & Perou, 2011). Tienen mal pronóstico a largo plazo, y una respuesta a quimioterápicos insuficiente, con valores entre el subtipo basal-like y el luminal (Sotiriou et al., 2006).

Triple negativo

Se acuña el término triple negativo (TN) a aquellos tumores que no expresan ninguno de los tres receptores claves en el cáncer de mama: RE, RP y HER2. Esta clasificación, a diferencia de

la anterior que se distribuían según la expresión génica observada mediante microarrays, se realiza mediante inmunohistoquímica. Si en dicho ensayo se obtiene un resultado negativo para los tres receptores hormonales, el tumor será TN.

Los tumores TN se caracterizan por desarrollarse en edades más tempranas, tener un grado histológico mayor, un mayor tamaño de tumor y ser más frecuentes en pacientes de origen africano. En cuanto al diagnóstico, suelen mostrar un perfil de expresión más agresivo con una baja expresión de Bcl-2, y alta expresión de p53 y Ki67 (De Ruijter et al., 2011).

Presenta una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad menores, y es más probable que se produzca una recaída en los siguientes tres años después del tratamiento comparado con otros subtipos. Además, la metástasis suele ser más agresiva, afectando principalmente al hígado, sistema nervioso central y pulmones. Los pacientes que recaen tienen una supervivencia muy baja (Bosch et al., 2010).

Los tratamientos para este subtipo suelen ser citotóxicos, cuya función es causar daños en el ADN de células en división. Como las células cancerosas se dividen muy rápidamente, son más susceptibles al citotóxico, aunque existen otras células de rápida división no tumorales, como los folículos pilosos y la médula ósea, que también se pueden ver afectadas por el tratamiento. Es por eso que la terapia citotóxica tiene numerosos efectos secundarios. Los tumores TN responden bien al tratarse con estos quimioterápicos, como son taxanos en combinación con antraciclinas, cisplatino, carboplatino, pero a pesar de todo, existen pacientes que no responden al tratamiento.

Un futuro tratamiento son los inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), que han mostrado resultados positivos en ensayos clínicos (De Ruijter et al., 2011). Pese a ello, no existe una diana terapéutica efectiva para este subgrupo, por lo que es uno de los campos de investigación más importantes.

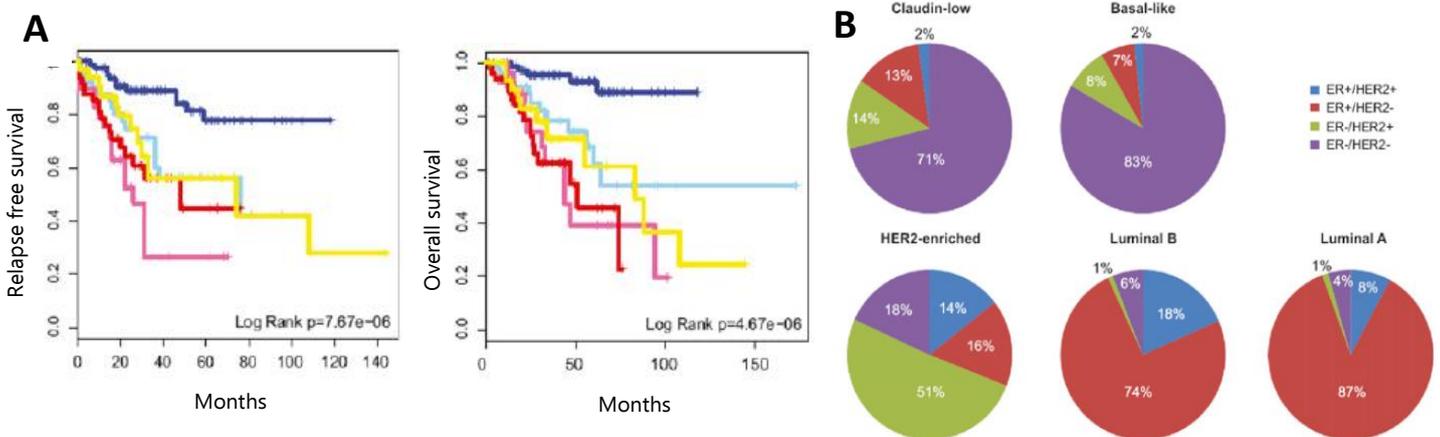


Figura 2: Tasa de supervivencia y distribución de los receptores RE y HER2 en los subtipos de cáncer de mama. (A) Curvas de Kaplan–Meier a partir de la tasa de supervivencia basadas en la base de datos de tumores UNC337. Azul oscuro, luminal A; azul claro, luminal B; rojo, basal-like; rosa, HER2-enriched; amarillo, claudin-low. (B) Distribución de RE y HER2 en los diferentes subtipos de cáncer de mama basados en datos de expresión (Eroles et al., 2012)

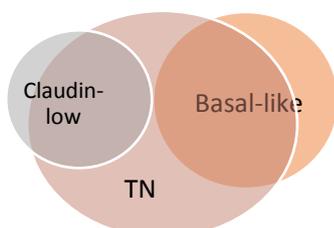


Figura 3: Composición del subtipo Triple negativo (TN).

1.3 EPIGENÉTICA EN CÁNCER DE MAMA

Hasta ahora, siempre se le había dado una gran importancia a la genética a la hora de estudiar la etiología de las enfermedades. Sin embargo, actualmente se sabe que influyen otros factores, como los ambientales, que modulan la expresión de genes mediante modificaciones epigenéticas.

La epigenética (cuyo significado es más allá de la genética) comprende el estudio de modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a alteraciones en la secuencia de ADN. Entre estas modificaciones, se encuentra la metilación del ADN, que puede alterar anormalmente la expresión de genes importantes en procesos celulares y contribuir al desarrollo y progresión de enfermedades como es el cáncer de mama.

La metilación consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5' de una citosina, gracias a la acción de una ADN metiltransferasa (DNMTs). Estas citosinas suelen estar seguidas de una guanina, por lo que se denomina metilación de un sitio CpG (Citosina-grupo fosfato-Guanina) (Szyf, 2012). Una región del genoma con gran densidad de sitios CpG constituye una isla CpG. Estas islas son frecuentes en la región promotora de los genes.

Los patrones de metilación del ADN están relacionados con la estructura de la cromatina. Las regiones activas de la cromatina, que permiten la expresión de genes, suelen estar asociadas con la hipometilación, mientras que las regiones hipermetiladas están compactadas y forman parte de la cromatina inactiva (Razin & Cedar, 1977). Por tanto, mayoritariamente hay una relación inversa entre la metilación del ADN y la expresión génica, puesto que la metilación en el promotor puede silenciar la expresión del gen.

Desde el inicio de los estudios en metilación se pudo observar que los patrones de metilación del ADN eran diferentes entre tejidos, y entre tumor y tejido adyacente. Las células no tumorales muestran una hipermetilación global e hipometilación en islas CpG (Robertson, 2001). Sin embargo, las células tumorales se caracterizan por una pérdida masiva de metilación y al mismo tiempo por la adquisición de un patrón de hipermetilación en islas CpG de ciertos promotores (Szyf, 2012).

En primer lugar, está bien documentado que en cáncer de mama, así como en el resto de cánceres, existe una hipometilación global (Soares et al., 1999). Esta hipometilación permite la activación de proto-oncogenes y genes prometastáticos (Szyf, 2012).

En segundo lugar, se sabe que la hipermetilación de islas CpG se relaciona con la inhibición de genes supresores de tumores, lo que impide la expresión del gen y favorece la aparición del cáncer. Esta hipermetilación de ciertas islas CpG en una célula cancerosa es una combinación única que se ha relacionado con el estadio del cáncer de mama y se ha propuesto como potencial marcador pronóstico y/o predictivo de respuesta. Actualmente se están probando inhibidores de la metilación del ADN como agentes anticancerígenos, puesto que reduciendo la metilación en genes supresores de tumores se puede inducir su expresión y entrar en el desarrollo de la enfermedad (Szyf et al., 2004).

1.4 GENES REPARADORES DEL ADN

En una célula son frecuentes los daños en el ADN, y para corregirlos existen mecanismos de reparación de los mismos. Estos mecanismos de reparación de la célula son cruciales en la vida de una célula, puesto que en su ausencia se producen mutaciones que no son reparadas, las cuales pueden dar lugar a una muerte celular programada o cáncer (Sancar et al., 2004).

Los mecanismos de reparación del ADN se pueden dividir en 5 categorías: reparación directa, reparación de escisión de base, reparación por escisión de nucleótido, reparación de roturas de doble hebra y reparación de uniones cruzadas entre hebras (Sancar et al., 2004).

1.4.1 BRCA1 y 2

Un claro ejemplo de cómo un fallo en un mecanismo de reparación del ADN da lugar a cáncer es el caso de los genes Breast Cancer 1 y 2 (BRCA1 y 2). Ambos codifican proteínas que forman parte del proceso de recombinación homóloga, en el cual se reparan roturas de doble hebra. En ausencia de alguna de las proteínas, este mecanismo no se puede llevar a cabo, por lo que la célula activa una ruta alternativa llamada non-homologous end joining (NHEJ). Este mecanismo tiene una alta tasa de error y provoca numerosas mutaciones (De Ruijter et al., 2011; Turner et al., 2005).

Una alteración en este gen da lugar a un déficit de proteína codificante, que finalmente resulta en una aparición del cáncer de mama. Es importante señalar que tanto la metilación como la mutación en este gen producen el mismo efecto, y lo mismo podría suceder en otros genes.

Otro gen implicado en la reparación del ADN es PARP, que codifica una proteína cuya función es reparar roturas de una sola hebra. Si estos errores persisten en células deficientes en BRCA, al llegar a la replicación se producirán roturas de doble hebra. Estas roturas tampoco se reparan de manera eficiente, lo que resulta en una inestabilidad genómica y una muerte celular programada o apoptosis. Es por esto que los inhibidores de PARP están siendo una buena terapia en tumores con alteraciones en BRCA, pues muestran una regresión del tumor y menor supervivencia de células tumorales deficientes en BRCA respecto a las que no lo son (Bosch et al., 2010; Lord & Ashworth, 2008).

1.4.2 POLE

El gen ADN polimerasa ϵ (POLE) se sitúa en el cromosoma 12, concretamente en 12q24.33, y está comprendido por 51 exones. Codifica para la subunidad catalítica ϵ de la ADN polimerasa. Este enzima tiene como función la reparación del ADN por escisión de base o reparación por escisión de nucleótido y la replicación de los cromosomas ("Genecards" n.d.-a; Pospiech & Syväoja, 2003).

Mutaciones en este gen se han visto asociadas a la predisposición de padecer melanoma cutáneo (Aoude et al., 2015) y cáncer colorrectal (Palles et al., 2013; Robles et al., 2016). Datos preliminares de nuestro laboratorio (aún no publicados) indican que existe una relación entre mutaciones en este gen y el cáncer de mama. Por tanto, metilaciones en ciertas islas CpGs del gen POLE podrían causar el mismo efecto que una mutación, es decir, causar un silenciamiento del gen y deficiencia de la proteína codificante, pudiendo dar lugar a la aparición del cáncer.

1.5 GENES ESTRUCTURALES Y DE ADHESION CÉLULA-CÉLULA

Las moléculas de adhesión celular desempeñan un papel crucial en la progresión del cáncer y la metástasis, hasta el punto de que las interacciones célula-célula determinan su extensión. Modificaciones en los procesos de adhesión pueden facilitar la salida de células del nicho tumoral y su propagación a órganos distantes, donde de nuevo las alteraciones en su capacidad de adhesión pueden determinar la generación o no de un nuevo tumor. Por tanto, una inhibición de estas interacciones una vez se alcanza el órgano distante representa una terapia efectiva para atenuar dicha metástasis (Bendas et al., 2012).

1.3.1 Filaminas

Las filaminas son proteínas cuya función es el entrecruzamiento de los filamentos de actina, a los cuales se unen. Estas proteínas tienen tres isoformas, la filamina A, B y C, que están codificadas por los genes FLNa, FLNb y FLNc, respectivamente. Estos genes tienen un 60-80% de homología e interaccionan con más de 30 proteínas. Sus función principal es participar en la unión célula-célula, célula-matriz y la organización de los polímeros de actina (Feng & Walsh, 2004), aunque también están vinculadas al cáncer.

La filamina A tiene dos funciones en cáncer: si está localizada en el citoplasma, puede promover la metástasis del tumor debido a que interacciona con moléculas señalizadoras. Sin embargo, si se encuentra en el núcleo, puede unirse a factores de transcripción, lo que inhibe la metástasis y actúa como supresor tumoral. La función, por tanto, no depende tanto de la filamina en sí sino de la proteína a la que se una (Shao et al., 2016). Para la filamina B, sin embargo, no se ha descrito ninguna relación con la aparición de cáncer.

1.3.2 FLNc

El gen filamina C (FLNc) está localizado en el cromosoma 7, concretamente en 7q32.1 y está compuesto por 48 exones. Codifica para la filamina C, que se expresa fundamentalmente en músculo cardíaco y esquelético (Fujita et al., 2012). La filamina se encarga de entrecruzar los filamentos de actina en redes ortogonales, y también está relacionada con la reorganización del citoesqueleto en respuesta a diferentes señales ("Genecards" n.d.-b).

Se ha descrito que una metilación en islas CpG del gen FLNc tiene como consecuencia un silenciamiento del gen. Esta metilación es característica en cáncer gástrico (Kaneda et al., 2002; Kim et al., 2009; Qu et al., 2013), de próstata (Aakula et al., 2016; Mahapatra et al., 2012; Sun et al., 2011) y ovario (Imura et al., 2006). Por tanto, estos datos sugieren que podría existir una metilación anormal en cáncer de mama de la misma manera que sucede en los tumores de los órganos ya mencionados.

Si existe una diferencia de grado de metilación entre células tumorales y no tumorales, entre células tumorales de diferentes subtipos de cáncer de mama, o bien entre células sensibles y resistentes a determinados tratamientos, el patrón de metilación podría ser un buen marcador de diagnóstico y/o pronóstico. Por tanto, el objetivo de este trabajo se basa en estudiar el perfil de metilación de los genes POLE y FLNc en líneas celulares de cáncer de mama de diferentes subtipos, ya que podrían utilizarse como marcadores epigenéticos de diagnóstico/pronóstico en cáncer de mama. En concreto, un hallazgo así sería un gran avance en la clínica para el subtipo triple negativo, pues actualmente carece de un tratamiento anti- diana específico efectivo.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Datos previos de la bibliografía relacionan FLNc y POLE con cáncer de mama sugiriendo un posible papel como marcador de la enfermedad. La hipótesis de nuestro trabajo es que modificaciones en los niveles de metilación de estos genes pueden tener un papel diagnóstico o pronóstico en cáncer de mama o ser indicador de resistencia a tratamientos concretos.

El objetivo principal del presente estudio es por tanto la identificación de diferencias en la metilación de los genes FLNc y POLE en de cáncer de mama que nos permita evaluar su implicación en diagnóstico, pronóstico y resistencia.

Los objetivos concretos fueron:

1. Evaluar si la metilación de las zonas estudiadas de los genes FLNc y POLE puede ser marcadores diferenciales entre células tumorales y no tumorales.
2. Evaluar mediante estudio de la metilación de FLNc y POLE en diferentes subtipos de cáncer de mama (luminal, HER2 y triple negativo), si los niveles de metilación de zonas concretas pueden ser marcadores de pronóstico.
3. Evaluar si la metilación de estas zonas en los genes FLNc y POLE en líneas celulares sensibles y resistentes a un fármaco (doxorubicina o trastuzumab) pueden ser un marcador de resistencia a éste.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES

Como modelo de estudio se utilizaron líneas celulares de diferentes subtipos de cáncer de mama y líneas celulares no tumorales (control) para poder usar su ADN en el posterior estudio de metilación.

3.1.1 Líneas celulares: características y condiciones de cultivo

Las líneas celulares usadas en este estudio fueron de diferentes subtipos: MDA-MB 231, MDA-MB-468, MDA-MB-436, MDA-MB-157, HCC38, HCC1143, HCC1936 (triple negativo); AU565, BT474, SKBR-3, HCC1954 (HER2+); MCF7 (luminal A) y MCF10 y MCF12 (no tumorales) (Tabla 2 y figura 4).

Tabla 2: Características de las líneas celulares utilizadas en el estudio ("ATCC: The Global Bioresource Center," n.d.; Neve et al., 2006).

Subtipo	Línea celular	Origen	Tipo de tumor	Morfología	P53	Medio de cultivo
TN	MDA-MB-231	Derrame pleural	Adenocarcinoma	Epitelial	++, M	DMEM F12
	MDA-MB-468	Derrame pleural	Adenocarcinoma	Epitelial	[+]	DMEM F12
	MDA-MB-157	Derrame pleural	Carcinoma metastático	Epitelial	-	DMEM glutaMAX™
	MDA-MB-436	Derrame pleural	Carcinoma ductal invasivo	Pleomórficas con componentes polinucleados	[-]	DMEM glutaMAX™
	HCC-38	Tumor primario	Carcinoma ductal	Epitelial	++, M	RPMI-1640
	HCC-1143	Tumor primario	Carcinoma ductal	Epitelial	++, M	RPMI-1640
	HCC-1937	Derrame pleural	Carcinoma ductal	Epitelial	-	RPMI-1640
HER2+	AU565	Derrame pleural	Adenocarcinoma	Epitelial	+ , WT	RPMI-1640 + glutamina
	BT474	Tumor primario	Carcinoma ductal invasivo	Epitelial	+	DMEM F12
	SKBR-3	Derrame pleural	Adenocarcinoma	Epitelial	+	DMEM F12
	HCC1954	Tumor primario	Carcinoma ductal	Epitelial	[+ / -]	RPMI-1640 + glutamina
Luminal A	MCF7	Derrame pleural	Carcinoma ductal invasivo	Epitelial	+ / -, WT	DMEM low
No tumorales	MCF-10A	Enfermedad quística	-	Epitelial	+ / -, WT	DMEM F12
	MCF-12A	Enfermedad quística	-	Epitelial	+	DMEM F12

M: mutante; WT: no mutante, +: expresión de P53; ++: alta expresión de P53; - : ausencia de expresión de P53. La información entre corchetes ([]) ha sido obtenida a partir de mRNA en vez de proteína.

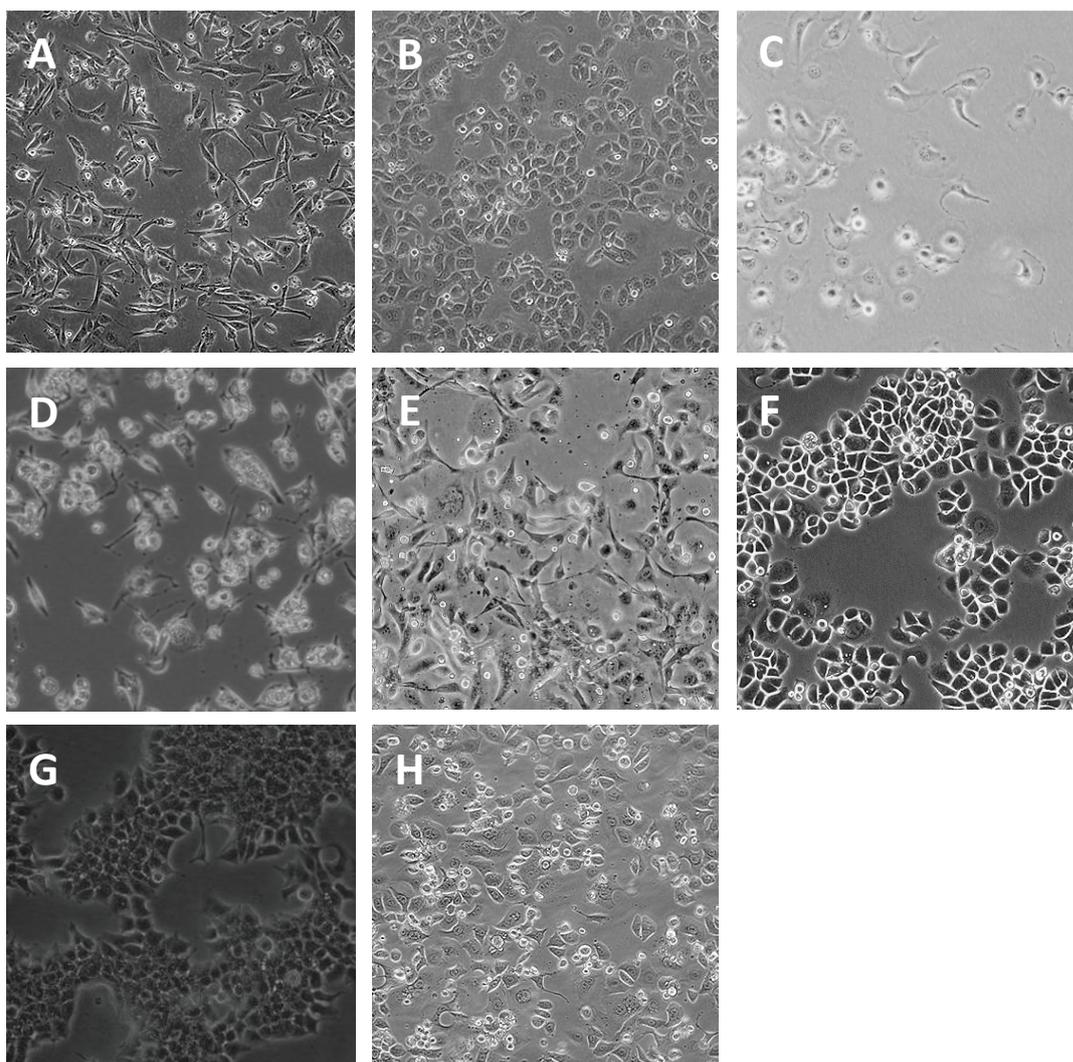


Figura 4: Imágenes a microscopio óptico de algunas de las líneas celulares utilizadas en el estudio. (A) MDA-MB-231. (B) MDA-MB-468. (C) MDA-MB-157. (D) MDA-MB-436. (E) HCC 38. (F) AU-565. (G) BT-474. (H) SK-BR-3 ("ATCC: The Global Bioresource Center," n.d.).

Todas las líneas del estudio estaban disponibles en el laboratorio, y originalmente fueron obtenidas de la compañía ATCC. Las líneas MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-7 son tumorigénicas en ratón nude, mientras que la MDA-MB-436 y la SKBR-3 no lo son, o muy débilmente (Cailleau et al., 1978; Lacroix & Leclercq, 2004).

El medio utilizado para cada línea fue el recomendado por la casa comercial (ver Tabla 2), suplementado por un 10% de SBF y un 1% de antibiótico ampicilina-estreptomicina. Cualquier trabajo realizado con cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

También se usó la línea celular MDA-MB-231 resistente a doxorubicina. Ésta se generó mediante ciclos de exposición creciente al fármaco, en los que se trataba con 1 μ M de doxorubicina, intercalando periodos de descanso sin fármaco. Tras realizar repetidas veces el proceso, se dejaba que la confluencia llegase al 80-90% para posteriormente doblar la concentración de doxorubicina. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar una concentración final de doxorubicina de 128 μ M.

Otras líneas celulares resistentes utilizadas en este trabajo fueron SKBR-3, BT474 y AU565, en este caso, con resistencia a trastuzumab. Se generaron por exposición continua al fármaco a

concentración de 15µg/ml, renovando el medio con fármaco cada tres días. El tiempo de generación fue variable, entre 6 y 12 meses para cada línea. Con el fin de mantener la resistencia, en cada subcultivo se les añadió 0,7µl de trastuzumab/ml de medio de cultivo completo. La línea HCC1954 presenta una resistencia innata a trastuzumab, por lo que no necesitó de este proceso de exposición al fármaco.

3.1.2 Descongelación de las líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en el estudio se mantuvieron en criopreservación con 90% suero bovino fetal (SBF) y 10% dimetil sulfóxido (DMSO) en tanques de nitrógeno líquido a -196 °C. Para una correcta descongelación, siguieron los siguientes pasos:

En primer lugar se descongeló el criotubo en un baño de agua a 37 °C y, una vez descongelado, rápidamente se cambió su contenido a un tubo Falcon de 15 ml. Se resuspendió con 6-7 ml de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 24 °C. Después, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en 3 ml de tampón fosfato salino (PBS) para retirar los restos de DMSO y se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 24 °C. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Por último, se tomó una alícuota del resuspendido para calcular la concentración de células mediante recuento en una cámara Neubauer y se añadió el volumen necesario para conseguir una concentración aproximada de 5×10^4 células/cm². Finalmente, se sembraron las células en un frasco T-25 y se incubó a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

3.1.3 Subcultivo de células

Las líneas celulares se subcultivaron dos o tres veces por semana, dependiendo de su confluencia y su velocidad de crecimiento. El subcultivo de las líneas celulares se realizó de la siguiente manera:

- Se retiró todo el medio de cultivo del frasco
- Se lavó con PBS para eliminar cualquier resto del medio anterior, ya que contiene inhibidores de tripsina (1 ml para T-25 o 3 ml para T-75)
- Se añadió tripsina para despegar las células del frasco (1 ml para T-25 o 3 ml para T-75)
- Se incubó a 37 °C durante 3-6 minutos
- Se añadió medio para inactivar la tripsina (3 ml para T-25 o 5 ml para T-75)
- Se recogió en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 24 °C
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 ml de medio de cultivo
- Se sembró una fracción del pellet resuspendido en un frasco nuevo, en el que se introdujo el medio de cultivo (5 ml para un T-25 y 15 ml para un T-75). Generalmente se subcultiva de ½ a ¼ de la cantidad inicial, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la línea celular y el tiempo deseado hasta el siguiente subcultivo.

3.1.4 Obtención de un pellet de células

Para obtener un pellet de células a partir del cual realizar la extracción del ADN, se siguieron los mismos pasos que para realizar un subcultivo, y una vez resuspendido el pellet, se cambió a un tubo de 1,5 ml, se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 24 °C, se eliminó el sobrenadante y se reservó a -80 °C.

3.1.5 Congelación de líneas celulares

Durante el desarrollo del trabajo se realizó la congelación de todas las líneas celulares para obtener un stock para futuros usos. El procedimiento a seguir fue el mismo que un subcultivo hasta la centrifugación. Después, el pellet de células obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de congelación (90% SBF, 10% DMSO) en un criotubo. El criotubo se puso en un recipiente con isopropanol a -80 °C durante dos días. Una vez pasado este tiempo, se procedió a cambiarlo a un tanque de nitrógeno líquido para una mejor conservación.

3.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se procedió a extraer el ADN de las 18 líneas celulares mediante el protocolo de extracción con trizol a partir de los pellets obtenidos en pasos anteriores.

Se añadió 1 ml de trizol al tubo de 1,5 ml y se homogenizó con un vórtex. A continuación, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente (TA) y se añadió 200 µl de cloroformo. Después, se dejó 2-3 minutos a TA y se centrifugó 15 minutos a 12000 G y 4 °C. Se obtuvieron dos fases: la acuosa, en la que está el ARN, y la orgánica, donde está el ADN; ambas fases separadas por una fase intermedia de proteínas. Se puso en hielo y se descartó la parte superior (fase acuosa) y se mantuvieron la intermedia y la orgánica para continuar la extracción del ADN.

Se añadieron 300 µl de etanol 100% y se mezcló por inversión. Se dejó a TA 2-3 minutos y más tarde se centrifugó 5 minutos a 4 °C y 2000 G. Después, se eliminó el sobrenadante fenol-etanol y se añadió 1 ml de citrato sódico 0,1M en 10% de etanol. Se dejó 30 minutos a TA, mezclando el tubo de vez en cuando por inversión.

Más tarde, se centrifugó 5 minutos a 4 °C y 2000 G, se volvió a lavar con 1 ml de citrato sódico 0,1M en 10% de etanol y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se añade 1,5 ml de etanol 75%. A continuación, se dejó el tubo 10-20 minutos a TA, mezclando cada cierto tiempo por inversión. Se volvió a centrifugar 5 minutos a 4 °C y 2000 G, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo en el tubo un pellet de ADN. El tubo se dejó secar al aire durante 5-15 minutos para que el etanol se evaporase completamente, y se resuspendió en 50 µl de tampón TE.

El ADN de cada línea celular se cuantificó usando Nanodrop™ (Thermofisher) a 260nm. Se aceptó un ADN como puro y de calidad cuando el ratio de la absorbancia A_{260}/A_{280} está entre 1,7 y 2,0.

Nota: todos los pasos que no se especifica la temperatura se realizaron en hielo.

3.3 SELECCIÓN DE LAS REGIONES DE LOS GENES A ESTUDIAR

Para realizar el estudio de metilación en los genes POLE y FLNc, y puesto que ambos son genes extensos, se seleccionaron las regiones de los genes cuya metilación podría afectar más a su expresión. La región promotora y el inicio del gen suelen contener numerosas CpGs cuyo estado de metilación es importante en la regulación de la expresión en dicho gen. Por tanto, en ambos genes se seleccionó desde 500 pb aguas arriba del inicio de la transcripción hasta el final del primer exón. La secuencia concreta para FLNc abarcaba de la base 128828877 a la 128837075 del cromosoma 7, hebra directa, y para POLE de la base 132622253 a la 132627818 del cromosoma 12 y hebra reversa (Obtenido de la base de datos Ensembl el 2 de marzo de 2017).

Dentro de ambas regiones se estudió su contenido en dinucleótidos CpG mediante el programa Epidesigner (Agena, anteriormente Sequenom, Inc.), el cual también genera todos los amplicones analizables mediante la plataforma MassARRAY (Agena) y sus cebadores correspondientes. Se estableció 375 pb como longitud máxima de los amplicones para asegurar una correcta amplificación de todos los fragmentos. De los amplicones obtenidos, se seleccionaron aquellos con mayor contenido en CpGs y próximos al inicio del gen.

Mediante Epidesigner se obtuvieron 43 amplicones para el gen POLE (Figura 5) y se seleccionaron los amplicones 1, 5 y 12 para el estudio por los motivos descritos anteriormente. En cuanto a FLNc, de los 44 amplicones obtenidos (Figura 6) se decidió estudiar los amplicones 2 y 6 siguiendo los mismos criterios. Las características de estos amplicones, así como los cebadores que los amplifican, se muestran en la Tabla 3.

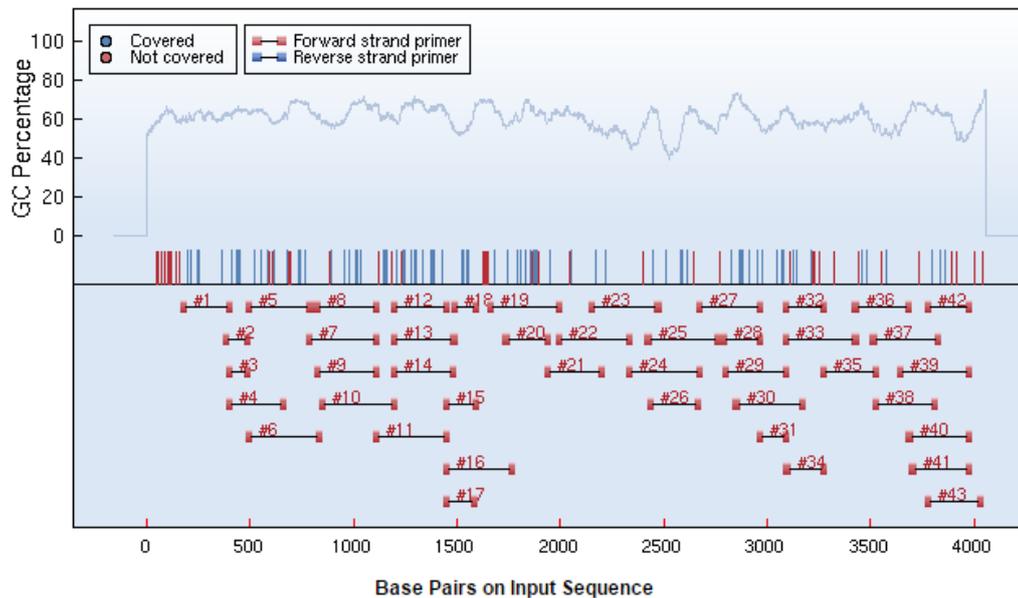


Figura 5: CpGs y amplicones del gen POLE obtenidos mediante Epidesigner (Agena). El fragmento de POLE analizado mediante este programa fue desde 500 pb aguas arriba del inicio de la transcripción hasta el final del primer exón. Las líneas verticales azules indican CpGs analizables. Las líneas verticales rojas indican CpGs no analizables, bien porque están demasiado juntas o demasiado aisladas. Para este gen, se seleccionaron los amplicones 1, 5 y 12.

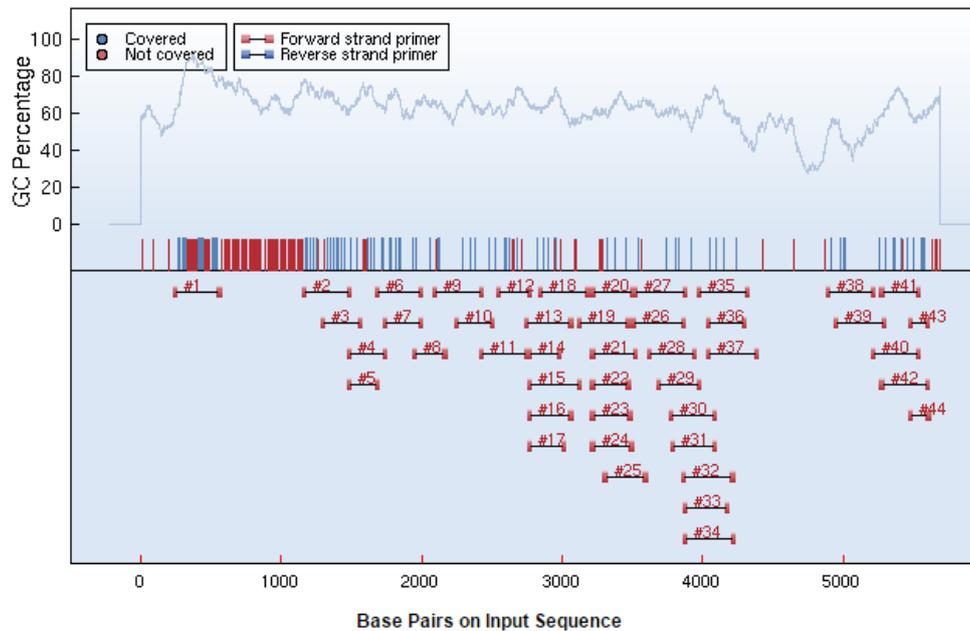


Figura 6: CpGs y amplicones del gen FLNc obtenidos mediante Epidesigner (Agena). El fragmento de FLNc analizado mediante este programa fue desde 500 pb aguas arriba del inicio de la transcripción hasta el final del primer exón. Las líneas verticales azules indican CpGs analizables. Las líneas verticales rojas indican CpGs no analizables, bien porque están demasiado juntas o demasiado aisladas.

Tabla 3: Características de los amplicones utilizados en los genes FLNc y POLE y sus cebadores.

Gen	Amplicón	Cebador directo	Cebador reverso	Tamaño (pb)	Nº CpGs	CpGs analizables
FLNc	2	GTTTTATGGGGTAGGGGTATAGGT	AAAAAATACCCCCAAAAATCAATAA	345	17	15
	6	GGGGTTAGGATAGGTAGGGTTTAG	TAAAACAAAACAACCTCCTACCAC	342	11	10
POLE	1	TTGGATTTGTGTAAGATTTTTTTT	CACTCTAACCTCCCACCTACTTA	247	5	5
	5	TGTTTATGGTATTGTGGTTGGAG	ACAAAACAACCCCTTAAAAACAC	315	12	8
	18	TGGGGTTTTATTGTGTTGTTTATT	AAATTCTTCTACAACAACCACTCCA	130	4	4

Para cada cebador reverso se añadió una cola adicional T7 para la transcripción, así como una cola de 10 nucleótidos en los cebadores directos para equilibrar la diferencia de temperatura de fusión (Tm).

3.4 TRATAMIENTO CON BISULFITO

El bisulfito tiene la capacidad de cambiar citosinas no metiladas por uracilo en el ADN de una hebra. Por tanto, después de una PCR, tanto el uracilo como la timina se amplificarán como timina, y únicamente las citosinas metiladas permanecerán como citosina (Figura 7).

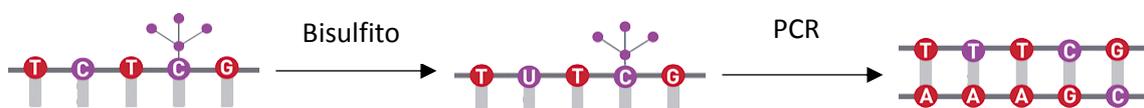


Figura 7: Proceso de transformación de la secuencia nucleotídica tras el tratamiento con bisulfito y la PCR. En el tratamiento con bisulfito, las citosinas no metiladas se desaminan, dando lugar a uracilo, mientras que las metiladas permanecen inalteradas. Tras la reacción de amplificación (PCR), la timina reemplaza al uracilo.

Para el tratamiento con bisulfito, se utilizó el kit EZ-96 de metilación de ADN (Zymo Research), siguiendo el protocolo que se proporciona y 1µg de ADN genómico.

3.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El objetivo de esta reacción fue amplificar las regiones seleccionadas de los genes de interés de todo el material genético gracias a los cebadores proporcionados por el programa Epidesigner (Figura 8).

Los reactivos que se utilizaron para la PCR fueron: 10 ng/ml de ADN tratado con bisulfito, 0,2 unidades de ADN polimerasa Taq, una unidad de tampón Taq y 200 mM de los primers de PCR, en un volumen total de 5 µl. La amplificación de la PCR se realizó como sigue:

- Preactivación de 95 °C durante 15 min
- 45 ciclos de: desnaturalización de 20 segundos a 95 °C, alineamiento de 56 °C durante 30 segundos y extensión de 30 segundos a 72 °C
- Incubación de 4 min a 72 °C.

3.6 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN Y ESCISIÓN

Esta reacción tiene como objetivo transcribir el ADN a ARN y fragmentarlo específicamente a la altura de cada uracilo que exista, para dar lugar a pequeños fragmentos de ARN que puedan ser analizados mediante MassARRAY. Se espera que en cada fragmento únicamente exista un dinucleótido CpG, sin embargo, si existen varios, su grado de metilación se analizará de manera conjunta (Figura 8).

Para la transcripción y escisión se necesitó 27 unidades de ADN y ARN polimerasa T7, 0,64 unidades de tampón de la polimerasa T7, 0,22 µl de "Mix Cleavage" (AGENA), 3,14 mM DTT, 3,21 µl de H₂O y 0,09 mg/ml de RNAsa A (AGENA). Esta mezcla se diluyó en 20 ml de H₂O y se añadieron 6 mg de resina CLEAN (AGENA) para eliminar restos de sales y garantizar un análisis del espectro óptimo.

3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La diferencia de masa entre la citosina y una timina que nos proporciona el tratamiento con bisulfito nos facilita la cuantificación de las hebras metiladas mediante técnicas de separación según la masa (espectrometría de masas).

La plataforma MassARRAY analyzer 4 (Sequenom biosystem) se compone de un espectrómetro de masas de desorción/ionización de matriz asistida por un láser – tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Este instrumento contiene un chip recubierto de una matriz que permite la cristalización del producto de la reacción de escisión. Un láser incide sobre esta matriz, ionizando las moléculas presentes. La superficie irradiada se calienta, dando lugar a la desorción de las moléculas, que pasan de estado sólido a gas. Estas moléculas viajan a lo largo de un tubo al vacío hasta un detector de iones basado. Las moléculas viajarán a mayor velocidad cuanto menor masa tengan, y por tanto, alcanzarán antes el detector. Una vez detectadas, el software es capaz de calcular la masa de la molécula y su cantidad. Estos datos se traducen en un porcentaje de metilación individual para cada CpG de cada amplicón (Figura 8).

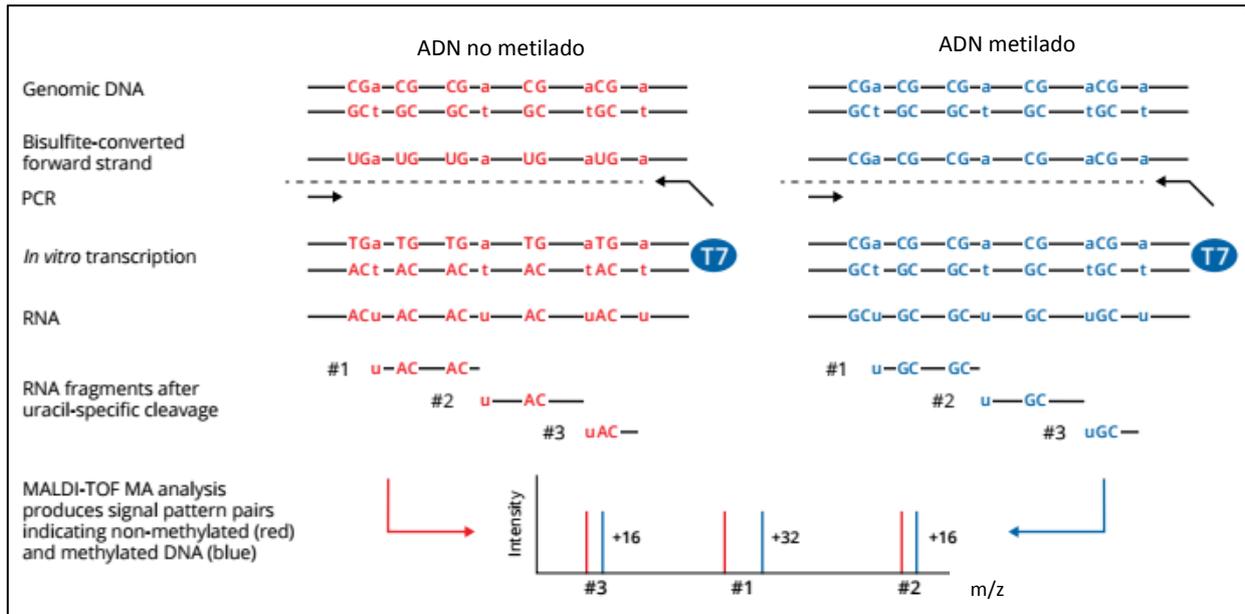


Figura 8: Vista general del procedimiento del estudio de metilación. Los nucleóticos en minúscula son los puntos de corte específicos. La diferencia de masa entre una adenina y una guanina es de 16 Da (Agena Biosystems, n.d.).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada CpG de cada amplicón, se procedió a agrupar los resultados de cada línea celular según el subtipo de cáncer de mama al cual pertenecían. Cada subtipo se comparó frente a los resultados del grupo no tumoral mediante la prueba t-Student, que se utiliza para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal.

Del mismo modo se compararon las líneas celulares tumorales frente a las no tumorales. En cuanto a la diferencia entre celulares sensibles y resistentes, se comparó cada línea resistente con su homóloga sensible, así como todas las sensibles a un mismo tratamiento frente a sus resistentes.

Se utilizó la función "PRUEBA.T" del programa Microsoft Excel 2013. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el P-valor (p) fuese inferior a 0,05. Además, se establecieron otros dos niveles de significancia, en 0,01 y 0,001.

4 RESULTADOS

4.1 METILACIÓN EN POLE

Para el gen POLE se estudió la metilación de los CpGs mostrados en la tabla 4 para cada amplicón seleccionado.

4.1.1 Amplicón POLE1

Tabla 4: CpGs estudiados para cada amplicón del gen POLE y posición que ocupan en su amplicón. Los CpGs 3 y 10 del amplicón POLE5 comparten los mismos resultados debido a que tienen una masa idéntica, y por tanto son indistinguibles en un espectrómetro de masas (*: CpG con diferencias significativas).

Amplicón	CpG	Posición	Analizable
POLE 1	1	47	Sí
	2	61	Sí
	3	89	Sí
	4	100	Sí
	5	209	Sí
POLE 5	1	53	Sí
	2	80	Sí
	3 *	116	Sí, idéntica masa a CpG10
	4	123	No, baja masa
	5	138	No, baja masa
	6	146	Sí
	7	205	Sí
	8-9	214-222	No, excesiva masa
	10 *	262	Sí, idéntica masa a CpG3
	11	269	Sí
	12	194	Sí
	POLE12	1	38
2		59	No, baja masa
3-4		70-72	Sí
5-6		108-110	Sí
7		122	Sí
8		129	Sí
9-10		163-165	Sí
11-12		204-206	Sí
13		216	Sí
14		260	Sí

El primer amplicón (POLE1) abarca 5 dinucleótidos CpGs, cuyas posiciones son la 47, 61, 89, 100 y 209 (Tabla 4). Este amplicón mostró una tasa de metilación alta (entorno al 96%) y homogénea, puesto que no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares estudiadas, independientemente de su tumorigenicidad y su subtipo. En la figura 9A se puede observar la metilación del CpG4, usado como ejemplo de una alta metilación en los CpGs de este amplicón. Sólo en el CpG3 la tasa de metilación disminuye de forma no significativa hasta valores cercanos al 80% (Figura 9B).

4.1.2 Amplicón POLE5

En el segundo amplicón del gen, POLE5, se estudiaron los CpGs mostrados en la Tabla 4. En este caso, los resultados son similares a los del primer amplicón, estando la mayoría de las líneas celulares permanentemente metiladas en todos los CpGs. Esto se puede observar en la Figura 9C, que muestra los resultados CpG6 como ejemplo representativo del resto de dinucleótidos.

Sin embargo, los CpG 3 y 10 de este amplicón mostraron una diferencia significativa en metilación entre la línea MDA-MB-231 sensible y resistente y la línea SKBR-3 sensible y resistente (Figura 9D). En ambas, el porcentaje de metilación de la línea sensible fue del 90%, mientras que las líneas resistentes presentaban un porcentaje del 70% para la línea MDA-MB-231 ($p = 0,00620$) y 79% para la línea SKBR-3 ($P = 0,04671$).

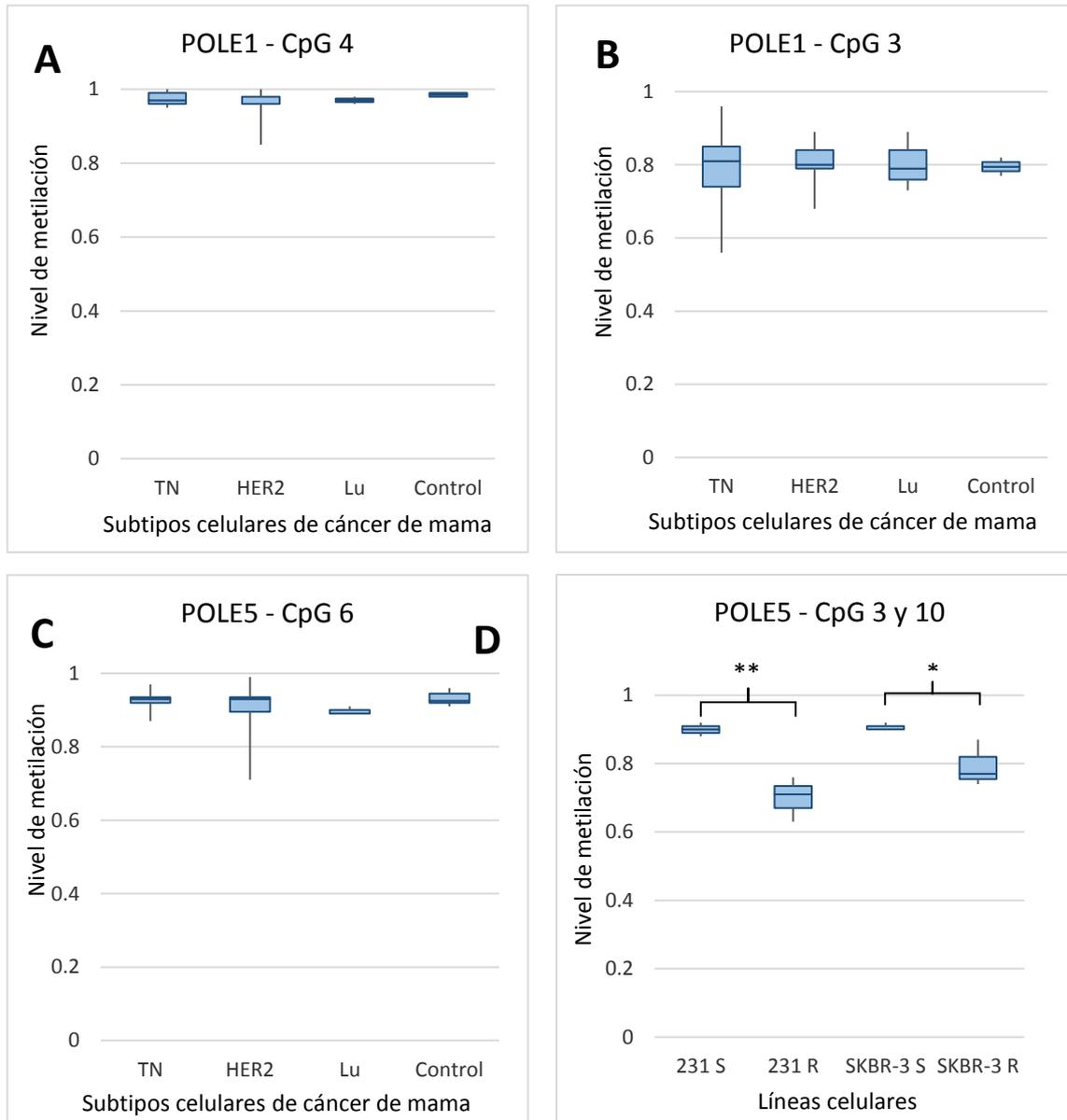


Figura 9: Nivel de metilación en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama en el gen POLE. (A) Nivel de metilación del CpG4 del amplicón POLE1. (B) Nivel de metilación del CpG3 del amplicón POLE1. En el amplicón POLE1 no se observan diferencias significativas entre los subtipos a nivel de metilación (C) Nivel de metilación del CpG6 del amplicón POLE5, en el cual no se observan diferencias significativas entre los subtipos de cáncer de mama. (D) Nivel de metilación de la línea MDA-MB-231 sensible y resistente y la línea SKBR-3 sensible y resistente en los CpGs 3 y 10. Entre las líneas sensibles y resistentes se puede observar una diferencia significativa en el nivel de metilación, estando las líneas sensibles más metiladas que las resistentes. (231: Línea MDA-MB-231, S: sensible, R: resistente, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

4.1.3 Amplicón POLE12

Las CpGs estudiadas para el amplicón POLE12 presentaron también unos niveles elevados de metilación, en torno al 80%, no mostrando diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares.

4.2 METILACIÓN EN FLNC

Para el gen FLNC se estudiaron los CpGs localizados en los dos amplicones seleccionados (Tabla 5).

Tabla 5: CpGs estudiados de cada amplicón del gen FLNC y posición que ocupan en su amplicón.

Amplicón	CpG	Posición	Analizable
FLNC2	1-4	26, 45, 47, 49	Sí
	5	69	Sí
	6	83	Sí
	7	108	Sí
	8	124	No, baja masa
	9	168	No, baja masa
	10	188	Sí
	11	213	Sí
	12	229	Sí
	13-14	256-261	Sí
	15	269	Sí
	16	287	Sí, idéntica masa a CpG17
	17	308	Sí, idéntica masa a CpG16
	FLNC6	1	61
2-3		65-67	Sí
4		111	Sí
5		127	Sí
6-7		162-195	Sí
8-9		183-195	Sí
10		278	Sí
11		309	Sí

Los CpGs 16 y 17 del amplicón FLNC2 comparten los mismos resultados debido a que tienen una masa idéntica, y por tanto son indistinguibles en un espectrómetro de masas.

4.2.1 Amplicón FLNC2

En este gen, los resultados del análisis de la metilación varían entre los diferentes CpGs, por tanto, se analizó cada dinucleótido por separado y se agruparon únicamente aquellos con rasgos similares.

En este amplicón se pudo observar un patrón general definido de metilación en los CpGs analizados, existiendo ciertas particularidades en algunos de ellos como se especifica a continuación. Este patrón se caracterizaba por una baja metilación en las líneas no tumorales usadas como control, con un porcentaje generalmente inferior al 10%. Las líneas del subtipo HER2 poseían los mismos valores de metilación que el grupo control, mientras que el grupo luminal mostraba un porcentaje de metilación muy alto, entorno al 90%, significativamente diferente del grupo control y HER2 ($2,8E-06 < p < 1E-10$). Además, el subtipo triple negativo presentaba unos resultados parecidos a los del luminal, con valores de metilación cercanos al 90%, y significativamente diferentes respecto del control y el subtipo HER2 ($p < 0,0002$). Sin

embargo, la línea MDA-MB-231 (tanto la sensible como la resistente) mostraba una menor metilación significativamente diferente al resto de líneas TN ($P < 10E-12$).

4.2.1.1 CpG 1-4

En este dinucleótido se encontraron diferencias significativas en el nivel de metilación entre los diferentes subtipos celulares, presentando grandes diferencias respecto al patrón descrito previamente. El subtipo luminal sí que ajusta al patrón general, con una metilación del 95%, así como el grupo control con una baja metilación (30%). Por el contrario, el subtipo HER2 presentó una metilación entorno al 70%, siendo significativamente diferente del grupo control ($p = 0,00041253$) (Figura 10A).

En la línea TN, aunque la mayoría de células mostraba una metilación entorno al 97%, la línea MDA-MB-231 sensible presentó una metilación del 28%, siendo significativamente diferente de su homólogo resistente ($p = 2,12E-05$) y el resto de líneas TN (Figura 10B). Esta línea celular tampoco cumple con el patrón explicado anteriormente, en el cual, tanto la línea sensible como la resistente presentan una metilación baja. De igual manera ocurrió con la línea AU565: la línea resistente se encontraba más metilada (85%) que la sensible (28%), siendo significativa la diferencia entre ambas ($p = 1,7087E-06$) (Figura 10C).

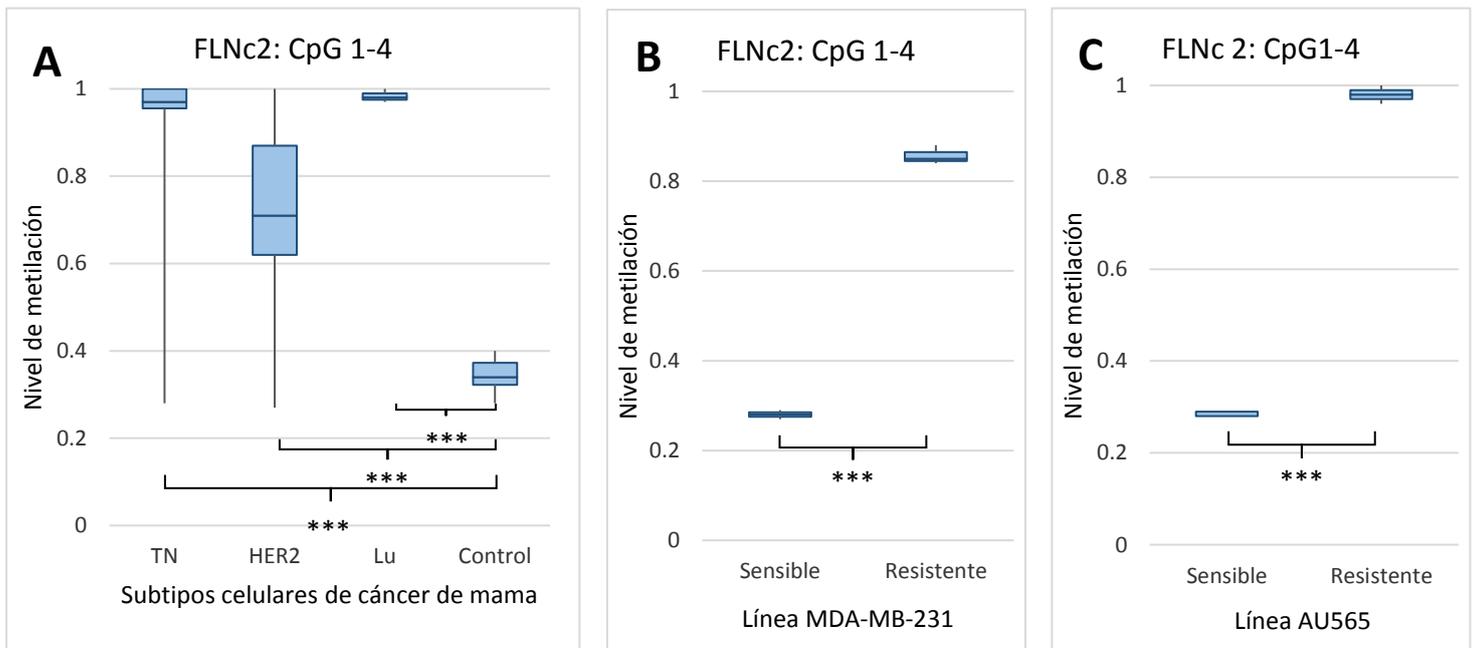


Figura 10: Nivel de metilación del CpG 1-4 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas. (A) Nivel de metilación del CpG 1-4 del amplicón FLNc2 en las de los diferentes subtipos de líneas celulares de cáncer de mama. Se observa una diferencia significativa entre cada uno de subtipos de cáncer de mama y el grupo control no tumoral. (B) Nivel de metilación de la línea MDA-MB-231 sensible y resistente en el CpG 1-4, existiendo una diferencia significativa entre ambas. (C): Nivel de metilación de la línea AU565 sensible y resistente en el CpG 1-4, existiendo una diferencia significativa entre ambas (***: $p < 0,001$).

4.2.1.2 CpG 5

Los valores de este CpG fueron similares al patrón general descrito anteriormente: la línea luminal (MCF7) presentaba una metilación del 100%, mientras que las líneas no tumorales mostraron el 20% de metilación, presentando una diferencia significativa con un $p = 1,261E-08$. La metilación de HER2 (40-60%) es ligeramente mayor que en el patrón descrito, por lo que existe también una diferencia significativa entre este subtipo y el subtipo no tumoral ($p = 1,843E-09$) (Figura 11A).

Las líneas TN continuaron mostrando una tasa de metilación alta, a excepción de la línea MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente) con una metilación del 25%, siendo igual que las líneas control pero significativamente diferente de las líneas TN restantes ($p = 2,459E-12$) (Figura 11B).

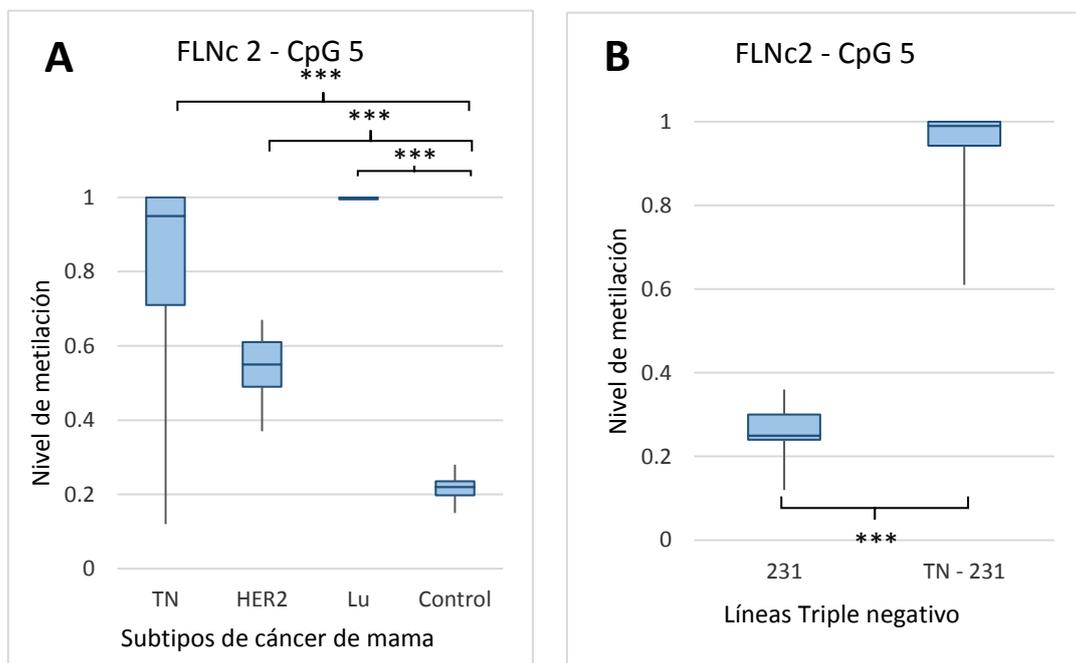


Figura 11: Nivel de metilación del CpG5 en las líneas celulares estudiadas. (A) Nivel de metilación del CpG5 del amplicón FLNc2 los diferentes subtipos de líneas celulares de cáncer de mama, existiendo una diferencia significativa entre cada uno de los subtipos de cáncer de mama y el grupo control. (B) Nivel de metilación de las líneas MDA-MB-231 sensibles y resistentes frente al resto de líneas triple negativo, existiendo una diferencia significativa entre ambas. (231: MDA-MB-231 sensibles y resistentes, TN-231: Todas las líneas triple negativo a excepción de MDA-MB-231 sensibles y resistentes, ***: $p < 0,001$).

4.2.1.3 CpG6

En esta CpG predomina una baja metilación de todos los subtipos (Figura 12A). Aun así, existe una diferencia significativa entre luminal y control (con un 30% y un 5% de metilación, respectivamente) con un $P = 4,296E-06$. La tasa de la metilación de las líneas HER2 también es del 5%, por lo que no existen diferencias significativas respecto al control. En cuanto a las líneas TN, el nivel de metilación se sitúa entorno al 10% no mostrando una diferencia significativa con el control. Sin embargo, dos líneas celulares (MDA-MB-436 y HCC1937) presentan una metilación más alta respecto al resto de líneas triple negativo (56% y 66%), existiendo una diferencia significativa ($p = 1,661E-10$ y $2,1734E-09$, respectivamente) (Figura 12B).

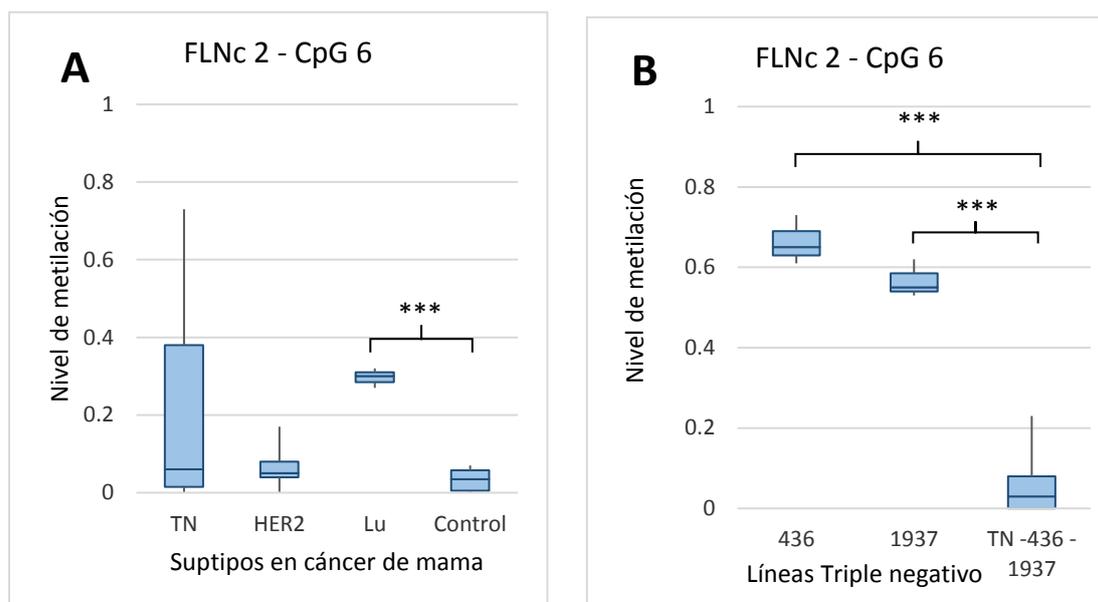


Figura 12: Nivel de metilación del CpG 5 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas. (A) Nivel de metilación del CpG6 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama, mostrando una diferencia significativa entre los subtipos TN y luminal frente al control. (B) Comparación del nivel del nivel de metilación de las líneas MDA-MB-436 y HCC1937 frente al resto de líneas triple negativo, existiendo una diferencia significativa entre las líneas 436 y 1937 frente al resto de líneas TN (436: MDA-MB-436, 1937: HCC1937, TN -436 -1937: Líneas triples negativo excluyendo a MDA-MB-436 y HCC1937 ***: $p < 0,001$).

4.2.1.4 CpG 7

En este CpG los resultados fueron similares a la CpG5 y al patrón general establecido: baja metilación de las líneas control y HER2 (6%), con una diferencia significativa respecto a las luminal ($p = 1,607E-07$), cuyo porcentaje de metilación fue de un 50%. Por otra parte, las líneas triple negativo presentaron una alta metilación (80%), siendo significativa frente al subtipo control ($p = 5,299E-05$), a excepción de las líneas MDA-MB-231 (tanto la sensible como la resistente), cuyo porcentaje de metilación estuvo al mismo nivel que el control, y fue significativamente diferente al resto de líneas triple negativo ($p = 8,6173E-10$).

4.2.1.5 CpG10, 11 y 12

En los tres dinucleótidos se obtuvieron resultados similares al patrón descrito: una alta metilación en la línea luminal y el subtipo triple negativo, existiendo una diferencia significativa entre cada una de las líneas y el control ($p = 1,274E-09$). El subtipo HER2 y el control continuaron presentando un bajo porcentaje, sin diferencias significativas entre ellos.

En estos tres CpGs las líneas celulares AU565 sensible y BT474 resistente se encontraban más metiladas que sus homólogas resistente y sensible (las cuales se sitúan en el 5%), aunque la magnitud de la significancia varía entre ellos (Tabla 6). En la CpG11 se pudo observar cómo la metilación es mayor en ambas líneas celulares, mientras que en los otros dos la diferencia entre sensible y resistente era menor.

Tabla 6: Porcentaje de metilación y P-valor para las líneas celulares AU565 y BT474 en los CpGs 10, 11 y 12.

CpG	Metilación BT474		P-valor	Metilación AU565		P-valor
	Sensibles	Resistentes		Sensibles	Resistentes	
10	4%	20%	0,00334	24%	5%	0,00012
11	2%	41%	2,8401E-05	38%	5%	1,5198E-05
12	2%	19%	0,00087	18%	4%	0,00629

4.2.1.6 CpG13-14

Este dinucleótido mostró el patrón típico descrito anteriormente: metilación inferior al 10% en los subtipos HER2 y control, así como un porcentaje elevado en el subtipo luminal (80%), existiendo una diferencia significativa respecto al control ($p = 1,015E-10$). En cuanto a las líneas celulares del subtipo triple negativo, se observó una alta metilación igual que las luminales, excepto en las líneas MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente), que fue significativamente diferente al resto de triples negativo ($p = 7,139E-18$) (Figura 13A).

4.2.1.7 CpG 15

El patrón de metilación general se mantuvo a grandes rasgos en este dinucleótido: porcentaje de metilación muy bajo en los controles, en el subtipo HER2 y la línea triple negativo MDA-MB-231 (inferior al 10%).

Sin embargo, en el subtipo luminal la metilación bajó hasta el 45% (respecto a CpGs anteriores), aunque la diferencia frente al control continuó siendo significativa ($p = 5,727E-10$). Las líneas triple negativo presentaron resultados muy heterogéneos, con porcentajes de metilación prácticamente nulos y cercanos al 90%. La líneas MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente), al igual que en el patrón general, mostró valores de metilación del 4%, significativamente diferente al resto de líneas triple negativo ($p = 8,157E-05$) (Figura 13B).

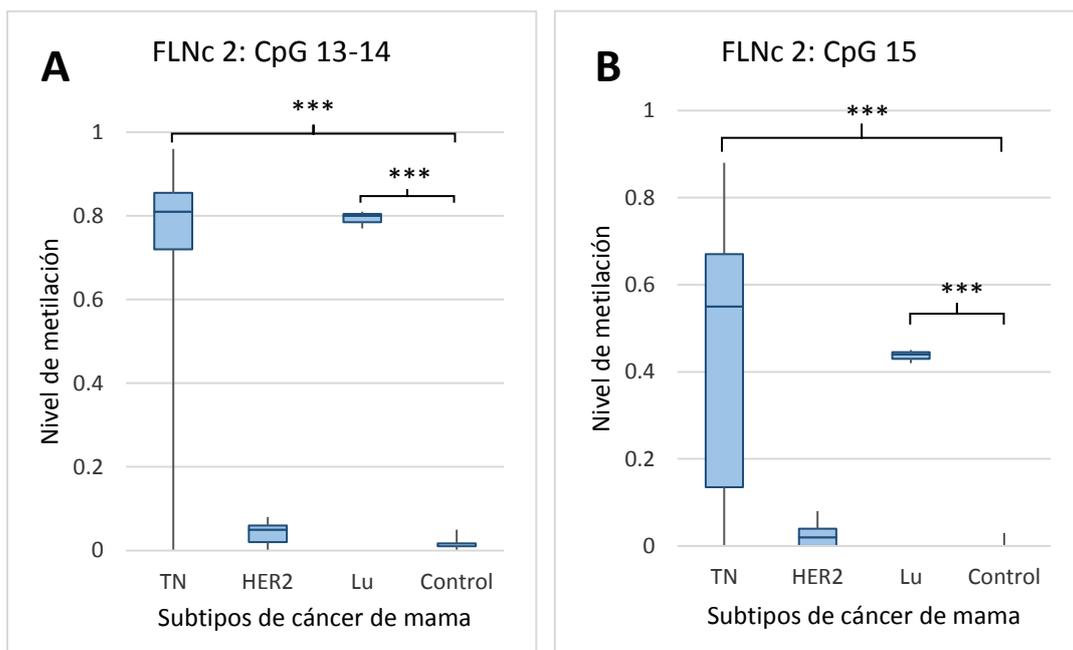


Figura 13: Nivel de metilación de los CpGs 13-14 y 15 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares estudiadas. (A) Nivel de metilación del CpG13-14 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama. (B) Nivel de metilación del CpG15 del amplicón FLNc2 en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama. En ambos se observa una diferencia significativa entre los subtipos TN y luminal frente al control. (***: $p < 0.001$)

4.2.1.8 CpG16 y 17

En estos dinucleótidos, el patrón general también se cumplió, presentando una alta metilación en subtipos luminal y triple negativo (entorno al 60-75%), mientras que el control, las líneas HER2 y la MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente) mostraron un porcentaje muy bajo (inferior al 10%). Las diferencias fueron significativas entre triple negativo y control ($p = 0,00014$) y luminal y control ($p = 2,372E-08$).

4.2.2 Amplicón FLNc 6

En este amplicón se estudiaron los CpGs mostrados en la tabla 5. Los resultados obtenidos de ellos fueron bastante homogéneos, por lo que se han estudiado en conjunto. En la figura 13 se muestran los resultados del CpG5 como ejemplo del amplicón en su conjunto.

Se pudo observar, de la misma manera que en FLNc2, que cada subtipo de cáncer de mama presentaba una tasa de metilación característica. Así, el luminal mostraba un alto grado de metilación, entorno al 80-90%, aunque en las CpGs del final del amplicón (CpGs 10 y 11) este porcentaje disminuye al 50-60%. Este subtipo presenta una diferencia significativa frente a las líneas usadas como control ($p = 5,136E-11$) (Figura 14A).

Por otra parte, el subtipo HER2 mostró un porcentaje muy bajo, inferior al 10%, al igual que las líneas no tumorales usadas como control. Sí que existe una excepción, la línea AU565 sensible en los CpGs 2-3, 5 y 8-9, tuvo un porcentaje de metilación de hasta un 50%, mostrándose significativamente diferente a su homóloga resistente ($p = 0,000991$).

Con respecto al subtipo triple negativo, la metilación fue alta (entre un 70-90%) excepto en el último CpG, que se sitúa en el 50-60%. Sin embargo, la línea MDA-MB-231 (tanto la sensible como la resistente) no presentó el mismo porcentaje que el resto, sino que su metilación se encontró a niveles de las líneas control y HER2, como ya ocurría en el amplicón FLNc2. La diferencia entre dicha línea y el resto de líneas TN fue significativa, presentando un $p = 2,543E-14$ (Figura 14B).

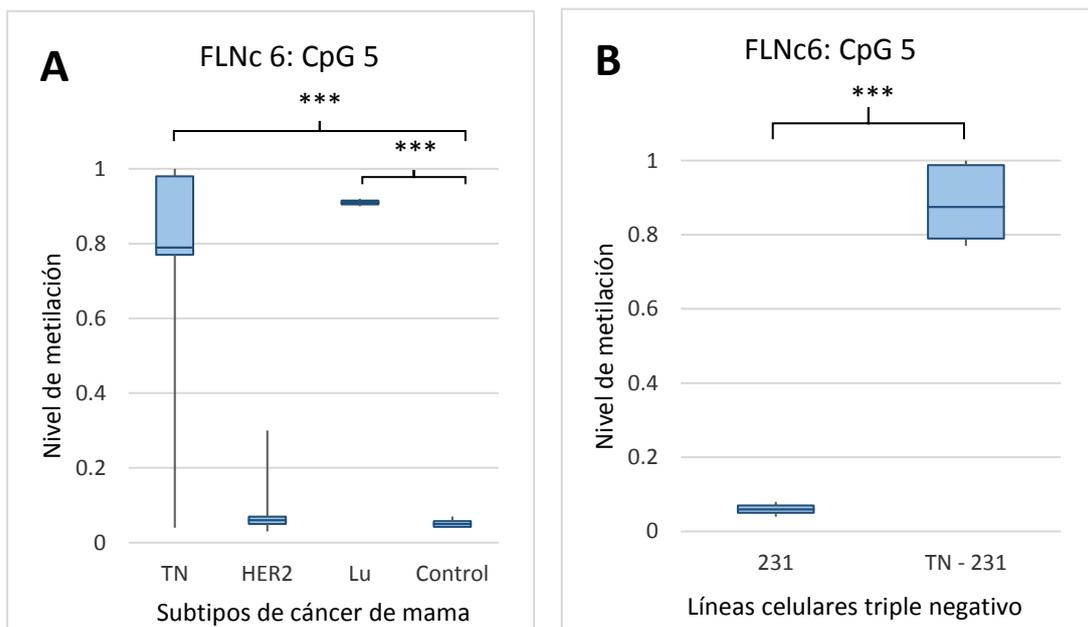


Figura 14: Nivel de metilación del CpG 5 del amplicón FLNc6 en las líneas celulares estudiadas. (A) Nivel de metilación del CpG5 del amplicón FLNc6 en las líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama, observándose una diferencia significativa entre cada uno de los subtipos de cáncer de mama y el grupo control. (B) Comparación del nivel de metilación entre las líneas celulares MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente) y el resto de líneas triple negativo, observándose una diferencia entre ambos grupos, (231: MDA-MB-231 sensibles y resistentes, TN-231: Todas las líneas triple negativo a excepción de MDA-MB-231 sensibles y resistentes, ***: $p < 0,001$).

5 DISCUSIÓN

5.1 MARCADORES EPIGENÉTICOS EN EL ÁMBITO CLÍNICO

La metilación del ADN se está consolidando como el mejor marcador epigenético para cáncer humano en los últimos años, y cada año el número de genes en los que se estudia la metilación incrementa (Tabla 7) (Mulero-Navarro & Esteller, 2008).

Tabla 7: Genes hipermetilados en la clínica.

Gen hipermetilado	Posibles usos clínicos
MGMT	Detección de células cancerosas en pulmón Respuesta a tratamiento en gliomas
APC	Detección en carcinoma colorrectal y cáncer de mama
BRCA1	Respuesta al tratamiento en mama y ovario
hMLH1	Evaluación de riesgo en cáncer gástrico, colon y endometrio
GSTP1	Detección de células cancerosas en cáncer de próstata
CDH1, CDH13, THBS-1	Relacionados con un pronóstico desfavorable
SFRP1	Relacionado con un pronóstico desfavorable en cáncer de mama

Este tipo de marcadores tiene numerosas ventajas en cuanto a su estudio. La primera, es que las células neoplásicas tienen como característica cambios en la metilación del ADN y en la modificación de la cromatina con respecto a las células no tumorales. En segundo lugar, el ADN es una molécula muy estable, fácil de obtener a partir de numerosas fuentes, y se puede utilizar tiempo después de haber tomado la muestra. Las fuentes de las que se puede obtener son células exfoliadas, plasma, tejido tumoral, saliva, tejido aspirado del pezón o lavados bronquioalveolares. En tercer lugar, las técnicas de detección de metilación en ADN son rápidas y sensibles (Mulero-Navarro & Esteller, 2008). Entre las técnicas que permiten analizar la metilación del ADN se encuentran el blotting, secuenciación genómica, inmunoprecipitación del ADN metilado, microarrays, PCR específica de metilación, PCR cuantitativa específica de metilación, ensayos fluorimétricos y secuenciación por bisulfito. De ellas, la secuenciación por bisulfito, la PCR específica de metilación y la PCR específica de metilación cuantitativa son las más comunes e importantes (Qu et al., 2013).

5.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

5.2.1 Gen POLE

Se estudiaron tres fragmentos del gen (POLE1, POLE5 y POLE12) mediante tratamiento con bisulfito y espectrometría de masas. Como modelo se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama de diferentes subtipos (triple negativo, HER2 y luminal), así como dos líneas no tumorales usadas como control. Se obtuvo como resultado una alta metilación en los tres fragmentos estudiados y en todas las líneas celulares, independientemente de su tumorigenicidad y su subtipo.

Estos resultados muestran que el gen POLE se encuentra metilado en las líneas celulares de mama tanto en ausencia como presencia de tumor, y esta metilación no varía entre los diferentes subtipos celulares. Por tanto, la metilación de las zonas estudiadas en este gen no sería un buen candidato como marcador epigenético de diagnóstico o pronóstico de cáncer de mama según este estudio, puesto que no nos permite distinguir los diferentes subtipos o la

presencia de tumor de la ausencia. Aunque los resultados de los amplicones parecen indicar que todo el gen se encuentra metilado por igual, se debería estudiar el gen en su totalidad para afirmarlo.

Sí que existe una diferencia significativa en los CpG3 y 10 del amplicón POLE5, concretamente entre las células sensibles y resistentes de las líneas MDA-MB-231 y SKBR-3. Las líneas resistentes tienen una metilación significativamente baja respecto a las homólogas sensibles, las cuales presentan una metilación igual al resto de líneas celulares. Estudios anteriores afirman que generalmente, la metilación del ADN está asociada a una inhibición de la expresión del gen, mientras que una hipometilación conlleva una mayor expresión (Razin & Cedar, 1977). Atendiendo a estos conceptos, una menor metilación del gen POLE podría estar asociado a una activación de la expresión del gen y la consecuente síntesis de la proteína codificada, la polimerasa ϵ .

Esta polimerasa está implicada en la reparación del ADN por escisión de base y escisión de apareamientos incorrectos (Stucki et al., 1998), por lo que una mayor expresión permitiría una mayor reparación del ADN celular, confiriendo una mayor resistencia frente a los tratamientos cuyo mecanismo citotóxico sea dañar el ADN de las células tumorales. La doxorubicina es uno de estos tratamientos, puesto que uno de sus modos de acción consiste en intercalarse entre las cadenas del ADN, impidiendo su transcripción y provocando en última instancia la muerte celular (Thorn et al., 2010).

Por tanto, la disminución en la metilación observada en la línea MDA-MB-231 resistente a doxorubicina podría estar implicada en la adquisición de esta resistencia, pues al expresar una polimerasa en mayor cantidad podría ser un mecanismo de defensa frente a los daños en la célula ocasionados por el fármaco.

Por otra parte, el fármaco trastuzumab actúa bloqueando los receptores HER2 de las células con sobreexpresión de este receptor. Sin embargo, este fármaco presenta otros mecanismos de acción, entre los cuales está inducir roturas en el ADN y defectos en su reparación (Mayfield et al., 2001), así como también modula la transcripción de genes reparadores del ADN (Kauraniemi et al., 2004). De esta manera, la expresión de la polimerasa ϵ podría reparar las roturas del ADN producidas por el trastuzumab, convirtiéndose en un mecanismo que facilita la resistencia frente al tratamiento.

No obstante, para confirmar dichas hipótesis se deberían realizar estudios futuros en ambas parejas de líneas celulares a nivel de expresión de la proteína, así como comprender mejor la implicación que puede tener la polimerasa ϵ en la resistencia a los tratamientos (doxorubicina y trastuzumab). También podría estudiarse en las células resistentes el efecto de inhibidores del PARP, como son cisplatino y olaparib.

5.2.2 Gen FLNc

Se estudiaron dos amplicones (FLNc2 y FLNc6) mediante la misma técnica utilizada para el gen POLE. En este gen, los resultados sí mostraron diferencias significativas entre las líneas celulares de diferentes subtipos, así como entre las líneas tumorales y no tumorales. Los CpGs estudiados muestran un patrón común a todas ellas, si bien cada una presenta sus excepciones o rasgos propios que la diferencian del resto. Estas características comunes que comparten la gran mayoría se pueden dividir en 5. Primero, una baja o nula metilación de las líneas no tumorales usadas como control, inferior al 10%. Segundo, una baja metilación en líneas del subtipo HER2, no mostrando una diferencia significativa con el control. Tercero: una metilación de las células de subtipo luminal, con un porcentaje de metilación sobre el 80-100% significativamente diferente al control y HER2 ($P < 0,001$). Cuarto: una baja metilación de la línea triple negativo

MDA-MB-231 (tanto la línea sensible como la resistente), con porcentajes similares al control y al subtipo HER2. Quinto: una alta metilación en el resto de líneas triple negativo, con una diferencia significativa respecto al grupo control y HER2 ($P < 0,001$), así como con la línea MDA-MB-231 ($P < 0,001$).

La mayoría de resultados (los correspondientes a los subtipos triple negativo, luminal y líneas no tumorales) son acordes con los de estudios anteriores en otros tipos de cáncer. En concreto, en cáncer gástrico, el gen FLNc se encuentra metilado en las líneas celulares cancerosas mientras que en la línea control no está metilado (Kaneda et al., 2002). Además, la metilación es mayor en pacientes con cáncer metastásico que en tumores primarios (Kim et al., 2009). En cuanto al cáncer de ovario, las líneas celulares tumorales también se encuentran metiladas en este gen (Imura et al., 2006). Para el cáncer de próstata se ha propuesto a FLNc como biomarcador de recurrencia, pues los tumores recurrentes están más metilados que los no recurrentes (Mahapatra et al., 2012).

Además, en estos tres tipos de cáncer se ha podido comprobar que la metilación del gen FLNc implica una menor expresión de la proteína, reafirmando que la hipermetilación de un gen conlleva la inhibición de su expresión. Esto mismo podría suceder en el caso del cáncer de mama, sin embargo, se requiere de futuros ensayos de expresión génica que lo demuestren.

Basándonos en estos resultados (y teniendo en cuenta que FLNc se encarga de entrecruzar los filamentos de actina que se han relacionado con la adhesión y migración celular), una ausencia de la expresión del gen FLNc podría estar relacionada con una polimerización aberrante de los filamentos de actina, promoviendo la migración celular y metástasis. En definitiva, la metilación del gen FLNc podría estar implicado en la progresión del cáncer. Para confirmar esta hipótesis, las futuras investigaciones deberán profundizar en el estudio de la función de FLNc en la progresión y metástasis de los tumores de mama.

En cuanto a la disparidad entre la línea MDA-MB-231 y el resto de líneas celulares triple negativo, se desconoce las causas por las que no presenta la misma metilación que las líneas de su mismo subtipo. Ya en estudios anteriores, esta línea ha presentado dificultades en cuanto a su clasificación según su expresión génica, puesto que no mostraba características claras de ninguno de los tres patrones en los que se clasificaban: basal, luminal y mesenquimal/estromal (Ross & Perou, 2001).

Apoyando nuestros resultados, Lacroix (2004) clasificó las líneas celulares de cáncer de mama en tres subgrupos según el fenotipo: células similares a las luminales epiteliales, células similares a las luminales epiteliales débiles, y células similares a las mesenquimales. Los primeros dos grupos se caracterizan por una baja o nula invasividad in vitro, mientras que el tercero presenta rasgos agresivos e invasivos característicos de las células mesenquimales. En este tercer grupo se incluye a la línea MDA-MB-231, mientras que clasifica como poco agresivas líneas como la MDA-MB-468 (triple negativo) y SKBR-3 (HER2). Este estudio remarca las diferencias que existen entre líneas celulares. Incluso siendo del mismo subtipo, pueden presentar fenotipos diferentes según los genes que expresen, por lo que la metilación de un gen no tendría por qué ser igual para todo el subtipo, como describe Lacroix para el caso de las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Por tanto, se deberían realizar estudios de expresión génica del gen FLNc en las líneas triple negativo, y comprobar si la expresión del gen es inversamente proporcional a su metilación o la expresión es uniforme en todo el subtipo.

A la luz de estos resultados, la metilación en el gen FLNc no puede servir como marcador de diagnóstico de la enfermedad, debido a que las líneas del subtipo HER2 muestran una metilación similar a las líneas no tumorales, haciendo imposible la diferenciación entre ambos grupos.

Sin embargo, podría utilizarse (tras estudios posteriores que lo corroboren) como marcador pronóstico del subtipo HER2, puesto que a diferencia de los otros subtipos de cáncer de mama estudiados, presenta una metilación baja. Estudiar los niveles de metilación de las células de cáncer puede ser una herramienta útil para definir más detalladamente los subtipos moleculares puesto que hay que tener en cuenta que los tumores presentan heterogeneidad celular y los tratamientos, bien por selección o por modificación, puede alterar el porcentaje de cada subtipo celular contenido en el tumor.

6 CONCLUSIONES

Los ensayos realizados han permitido extraer las siguientes conclusiones:

- El gen POLE se encuentra metilado en todas las líneas celulares estudiadas. En concreto, en los CpGs 3 y 10 del amplicón POLE5 existe una disminución significativa de la metilación en las líneas MDA-MB-231 resistente a doxorrubicina y SKBR-3 resistente a trastuzumab respecto a sus homólogas sensibles, por lo que esta menor metilación podría estar implicada en la adquisición de la resistencia por parte de estas líneas celulares.
- Las líneas celulares pertenecientes al subtipo HER2 y las líneas no tumorales presentan una baja metilación de los amplicones estudiados del gen FLNc, así como el subtipo luminal una alta metilación.
- Las líneas celulares del subtipo triple negativo presentan una alta metilación en los amplicones estudiados del gen FLNc, excepto las líneas celulares MDA-MB-231 (tanto sensible como resistente), las cuales tienen una metilación muy baja.
- La metilación en el gen FLNc podría ser en un futuro un posible marcador del subtipo HER2 en tumores, una vez se haya realizado un diagnóstico de la enfermedad, puesto que su metilación es significativamente diferente al resto de subtipos de cáncer de mama.

7 BIBLIOGRAFÍA

- AAKULA, A., KOHONEN, P., LEIVONEN, S. K., MÄKELÄ, R., HINTSANEN, P., MPINDI, J. P., ... ÖSTLING, P. (2016). Systematic Identification of MicroRNAs That Impact on Proliferation of Prostate Cancer Cells and Display Changed Expression in Tumor Tissue. *European Urology*, 69(6), 1120–1128. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.09.019>
- AGENA BIOSYSTEMS. (n.d.). High-Resolution Quantitative Methylation Profiling with EpiTYPER® and the MassARRAY® System. Retrieved July 1, 2017, from http://agenabio.com/wp-content/uploads/2015/06/51-20055R1.0-EpiTYPER-Brochure_WEB.pdf
- AOUDE, L. G., HEITZER, E., JOHANSSON, P., GARTSIDE, M., WADT, K., PRITCHARD, A. L., ... HAYWARD, N. K. (2015). POLE mutations in families predisposed to cutaneous melanoma. *Familial Cancer*, 14(4), 621–628. <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9826-8>
- ATCC: The Global Bioresource Center. (n.d.). Retrieved June 10, 2017, from <https://www.atcc.org/>
- BENDAS, G., BORSIG, L., BENDAS, G., & BORSIG, L. (2012). CANCER CELL ADHESION AND METASTASIS: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins, Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *International Journal of Cell Biology, International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012, e676731. <https://doi.org/10.1155/2012/676731>
- BOSCH, A., EROLES, P., ZARAGOZA, R., VIÑA, J. R., & LLUCH, A. (2010). Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*, 36(3), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.002>
- CAILLEAU, R., OLIVÉ, M., & CRUCIGER, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911–915. <https://doi.org/10.1007/BF02616120>
- CANCER, I. A. FOR R. ON. (2012). Cancer today - Globocan. Retrieved from http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default
- DE RUIJTER, T. C., RGEN, J., @BULLET, V., DE HOON, J. P. J., VAN, M., @BULLET, E., & TJAN-HEIJNEN, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0957-x>
- DONEGAN, W. L. (2006). History of Breast Cancer. *Breast Cancer*, 1–14. Retrieved from <http://books.google.ca/books?id=aHetwn61JigC>
- EKMEKTZOGLU, K. A., XANTHOS, T., GERMAN, V., & ZOGRAFOS, G. C. (2009). Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.03.017>
- EROLE, P., BOSCH, A., ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J., & LLUCH, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- FENG, Y., & WALSH, C. A. (2004). The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1034–1038. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1034>
- FUJITA, M., MITSUHASHI, H., ISOGAI, S., NAKATA, T., KAWAKAMI, A., NONAKA, I., ... KUDO, A. (2012). Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Developmental Biology*, 361(1), 79–89.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.008>

- GENECARDS - Human gene database. (n.d.-a). Retrieved May 13, 2017, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POLE&keywords=pole>
- GENECARDS - Human gene database. (n.d.-b). Retrieved May 14, 2017, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLNC&keywords=FLNC>
- GUARNERI, V., & CONTE, P. (2009). Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *The Oncologist*, *14*(7), 645–56. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0078>
- HERSCHKOWITZ, J. I., SIMIN, K., WEIGMAN, V. J., MIKAEIAN, I., USARY, J., HU, Z., ... PEROU, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, *8*(5), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>
- IMURA, M., YAMASHITA, S., CAI, L. YI, FURUTA, J. ICHI, WAKABAYASHI, M., YASUGI, T., & USHIJIMA, T. (2006). Methylation and expression analysis of 15 genes and three normally-methylated genes in 13 Ovarian cancer cell lines. *Cancer Letters*, *241*(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.010>
- KANEDA, A., KAMINISHI, M., YANAGIHARA, K., SUGIMURA, T., & USHIJIMA, T. (2002). Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. *Cancer Research*, *62*(22), 6645–6650.
- KAURANIEMI, P., HAUTANIEMI, S., AUTIO, R., ASTOLA, J., MONNI, O., ELKAHLOUN, A., & KALLIONIEMI, A. (2004). Effects of Herceptin treatment on global gene expression patterns in HER2-amplified and nonamplified breast cancer cell lines. *Oncogene*, *23*(4), 1010–1013. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207200>
- KENNECKE, H., YERUSHALMI, R., WOODS, R., CHEANG, M. C. U., VODUC, D., SPEERS, C. H., ... GELMON, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(20), 3271–3277. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820>
- KIM, J. H., JUNG, E. J., LEE, H. S., KIM, M. A., & KIM, W. H. (2009). Comparative analysis of DNA methylation between primary and metastatic gastric carcinoma. *Oncol Rep*, *21*(5), 1251–1259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360301>
- KREIKE, B., VAN KOUWENHOVE, M., HORLINGS, H., WEIGELT, B., PETERSE, H., BARTELINK, H., & VAN DE VIJVER, M. J. (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research*, *9*(5), R65. <https://doi.org/10.1186/bcr1771>
- LACROIX, M., & LECLERCQ, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc>
- LORD, C. J., & ASHWORTH, A. (2008). Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.06.016>
- MAHAPATRA, S., KLEE, E. W., YOUNG, C. Y. F., SUN, Z., JIMENEZ, R. E., KLEE, G. G., ... DONKENA, K. V. (2012). Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *18*(10), 2882–2895. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2090>
- MARTÍN, M., HERRERO, A., & ECHAVARRÍA, I. (2015). Breast cancer. *Arbor: Ciencia, Pensamiento Y Cultura*. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5202897&info=resumen&idioma=ENG>
- MAYFIELD, S., VAUGHN, J. P., & KUTE, T. E. (2001). DNA strand breaks and cell cycle perturbation in herceptin treated breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, *70*(2), 123–9. <https://doi.org/10.1023/A:1012999012192>
- MULERO-NAVARRO, S., & ESTELLER, M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is

- now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.03.001>
- NEVE, R. M., CHIN, K., FRIDLAND, J., YEH, J., BAEHNER, F. L., FEVR, T., ... GRAY, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, *10*(6), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>
- PALLES, C., CAZIER, J.-B., HOWARTH, K. M., DOMINGO, E., JONES, A. M., BRODERICK, P., ... TOMLINSON, I. (2013). Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature Genetics*, *45*(2), 136–44. <https://doi.org/10.1038/ng.2503>
- PEROU, C. M., SØRLIE, T., EISEN, M. B., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S. S., REES, C. A., ... BOTSTEIN, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- POSPIECH, H., & SYVÄÖJA, J. E. (2003). DNA polymerase ϵ - more than a polymerase. *TheScientificWorldJournal*, *3*, 87–104. <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.08>
- PRAT, A., & PEROU, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- QU, Y., DANG, S., & HOU, P. (2013). Gene methylation in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.002>
- RAZIN, A., & CEDAR, H. (1977). Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(7), 2725–2728. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2725>
- ROBERTSON, K. D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, *20*(24), 3139–3155. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204341>
- ROBLES, A. I., TRAVERSO, G., ZHANG, M., ROBERTS, N. J., KHAN, M. A., JOSEPH, C., ... PAPADOPOULOS, N. (2016). Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology*, *150*(4), 931–943. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.036>
- ROSS, D. T., & PEROU, C. M. (2001). A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Disease Markers*, *17*(2), 99–109. <https://doi.org/10.1155/2001/850531>
- SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., UNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S., ÜNSAL-KAÇMAZ, K., & LINN, S. (2004). MOLECULAR MECHANISMS OF MAMMALIAN DNA REPAIR AND THE DNA DAMAGE CHECKPOINTS. *Annual Review of Biochemistry*, *73*(1), 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- SHAO, Q. Q., ZHANG, T. P., ZHAO, W. J., LIU, Z. W., YOU, L., ZHOU, L., ... ZHAO, Y. P. (2016). Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathology and Oncology Research*. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9980-1>
- SLAMON, D. J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., ... NORTON, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, *344*(11), 783–92. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
- SOARES, J., PINTO, A. E., CUNHA, C. V., ANDRÉ, S., BARÃO, I., SOUSA, J. M., & CRAVO, M. (1999). Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*, *85*(1), 112–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990101\)85:1<112::AID-CNCR16>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990101)85:1<112::AID-CNCR16>3.0.CO;2-T)
- SORLIE, T., PEROU, C. M., TIBSHIRANI, R., AAS, T., GEISLER, S., JOHNSEN, H., ... BORRESEN-DALE, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

- SORLIE, T., TIBSHIRANI, R., PARKER, J., HASTIE, T., MARRON, J. S., NOBEL, A., ... BOTSTEIN, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8418–8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- SOTIRIOU, C., NEO, S.-Y., MCSHANE, L. M., KORN, E. L., LONG, P. M., JAZAERI, A., ... LIU, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10393–10398. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>
- SOTIRIOU, C., WIRAPATI, P., LOI, S., HARRIS, A., FOX, S., SMEDS, J., ... DELORENZI, M. (2006). Gene expression profiling in breast cancer: Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(4), 262–272. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj052>
- STAAF, J., RINGNÉR, M., VALLON-CHRISTERSSON, J., JÖNSSON, G., BENDAHL, P. O., HOLM, K., ... BORG, Å. (2010). Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(11), 1813–1820. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.8775>
- STUCKI, M., PASCUCCI, B., PARLANTI, E., FORTINI, P., WILSON, S. H., HÜBSCHER, U., & DOGLIOTTI, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, *17*(7), 835–843. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202001>
- SUN, T., LEE, G. S. M., OH, W. K., FREEDMAN, M. L., POMERANTZ, M., PIENTA, K. J., & KANTOFF, P. W. (2011). Inherited variants in the chemokine CCL2 gene and prostate cancer aggressiveness in a caucasian cohort. *Clinical Cancer Research*, *17*(6), 1546–1552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2015>
- SZYF, M. (2012). DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Medicine*, *4*(3), 26. <https://doi.org/10.1186/gm325>
- SZYF, M., PAKNESHAN, P., & RABBANI, S. A. (2004). DNA methylation and breast cancer. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 68, pp. 1187–1197). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.030>
- THORN, CAROLINE; OSHIRO, CONNIE; MARSH, SHARON; HERNANDEZ-BOUSSARD, TINA; MCLEOD, HOWARD; KLEIN, TERI; ALTMAN, R. (2010). “Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.” *Pharmacogenetics and Genomics*, *53*. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- TURNER, N., TUTT, A., & ASHWORTH, A. (2005). Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.03.006>
- WEIGELT, B., MACKAY, A., A’HERN, R., NATRAJAN, R., TAN, D. S. P., DOWSETT, M., ... REIS-FILHO, J. S. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: A retrospective analysis. *The Lancet Oncology*, *11*(4), 339–349. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70008-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70008-5)