

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



El factor de transcripción CTCF se correlaciona positivamente con la inestabilidad genómica nuclear en células tumorales de cáncer de ovario y con la destinación de contenido pro tumoral/metastásico en exosomas secretados por células cancerígenas de ovario

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

MATIAS IGNACIO DEL CAMPO SMITH

Directora de Tesis: Dra. Lorena Lobos González

Codirectora de Tesis: Mg. Carmen Romero Osses

Santiago-CHILE

Junio 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

MATIAS IGNACIO DEL CAMPO SMITH

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 24 de junio del 2022.

Director de Tesis:

Dra. Lorena Lobos González

Co-director de Tesis:

M.S Carmen Romero Osses

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

Dra. Marcelo Kogan

Dr. Manuel Varas

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
FINANCIAMIENTO	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de ovario	1
1.2. Fisiopatología del cáncer de ovario	2
1.3. CCCTC-binding factor (CTCF): Factor transcripcional.	5
1.4. CTCF en cáncer de ovario	9
1.5. Integridad genómica nuclear	10
1.6. Inestabilidad genómica nuclear	11
1.7. Comunicación celular mediada por exosomas en cáncer	12
1.8. Exosomas	13
1.9. Rol de los exosomas en la progresión del cáncer de ovario.	15
1.10. Resumen	16
2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3. METODOLOGÍA	23
3.1. Líneas celulares, medio condicionado y preparación de exosomas	23
3.2. Cuantificación de Exosomas	23
3.3. Caracterización de exosomas mediante Western Blot	24
3.4. Microscopia electrónica	25
3.5. Bioinformática	25
3.6. Ensayo de formación de clones	27

4. RESULTADOS	28
4.1. Resultados del Objetivo N°1	28
4.1.1. Reclasificación de pacientes de cáncer de ovario	29
4.1.2. Selección de proteínas con mayor correlación con CTCF	29
4.1.3. Organización de proteínas y estudio de vías ontológicas asociadas	30
4.1.4. Correlación positiva entre el complejo NuRD y CTCF podría aumentar la desestabilización genómica nuclear.	33
4.1.5. El aumento de CTCF se correlaciona de manera positiva con las vías de reparación del genoma.	33
4.1.6. Resultados preliminares muestran la presencia de CTCF en exosomas secretados por células de cáncer de ovario A2780.	36
4.2. Resultados del Objetivo N°2	40
4.2.1. Selección de pacientes y normalización de datos de RNAs.	41
4.2.2. CTCF podría incorporar LncRNAs y mRNAs a exosomas secretados por células de cáncer de ovario.	43
4.3. Recapitulación de los resultados principales	47
5. DISCUSION	49
5.1. Cáncer de ovario, inestabilidad genómica, formación de micronúcleos.	49
5.2. CTCF es necesario para la regulación de la expresión genómica y para mantener la integridad de la arquitectura nuclear y genómica.	50
5.3. CTCF no se correlaciona con el avance de la enfermedad de cáncer de ovario.	51
5.4. El complejo NuRD se correlaciona de manera positiva con CTCF, siendo una vía indirecta de promoción de la inestabilidad genómica.	52
5.5. CTCF se correlaciona positivamente con vías de reparación del genoma	54

5.6. La sobre expresión de CTCF podría fomentar la segregación anómala de cromosomas	54
5.7. Inestabilidad genómica, micronúcleos y exosomas	55
5.8. CTCF está presente en exosomas secretados por las células HOSE y A2780.	56
5.9. CTCF podría ser el responsable de la presencia de LncRNAs, mRNAs y proteínas con capacidades promotoras de metástasis en exosomas secretados células de cáncer de ovario	59
5.10. Conclusión.	63
6. ACTIVIDADES DERIVADAS DE LA TESIS	65
6.1. Publicaciones durante el periodo de tesis	65
6.2. Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas	66
7. ANEXOS	67
8. BIBLIOGRAFÍA	71

ABREVIATURAS

CTCF	: CCCTC Binding-Factor
RNAs	: Ácidos ribonucleicos
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
NuRD	: Complejo de des acetilación y remodelamiento del nucleosoma
A2780	: Línea celular de cáncer de ovario de origen no metastásico A2780
HGSOC	: Cáncer de ovario seroso de alto grado
LGSOC	: Cáncer de ovario seroso de bajo grado
KRAS	: Oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten
PTEN	: Homologo de fosfatasa y tensina
BRAF	: Proto oncogen B-raf serina/treonina quinasa
TP53	: Proteína tumoral P53
BRCA	: Reparación de DNA asociada a BRCA
LH	: Hormona luteinizante
FSH	: Hormona folículo estimulante
TADs	: Dominios de asociación topológica
SMAD3	: Miembro de la Familia SMAD tipo 3
PARP1	: poli-[ADP-ribosa] polimerasa 1
YY1	: Factor de transcripción YY1
CK2	: Caseína quinasa 2 alfa 1

DNA	: Acido desoxirribunucleico
SKOV3	: Línea celular de cáncer de ovario metastasico SKOV3
SRC	: Proteína proto-oncogén tirosina quinasa
MMP9	: Metaloproteidasa de matriz 9
SERPINE1	: Miembro 1 de la familia Serpin E
CTBP1	: Proteína 1 de unión al extremo c-terminal
ESC	: Línea celular de células madre embriogénicas
MN	: Micronúcleos
CD63	: Proteína de membrana 3 asociada a lisosomas
EMT	: Transición epitelio-mesenquimal
MVB	: Cuerpos multi vesiculares
CMV	: Cuerpos multi vesiculares
ILVs	: Vesículas intraluminales
ESCRT	: Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte
mRNAs	: RNA mensajeros
miRNAs	: RNA pequeños
CD9	: Proteína inhibidora del gen 2 del crecimiento celular
CD81	: Tetraspanina 81
CD82	: Tetraspanina 82
HSP70	: Familia de proteínas de choque térmico A 70

HSP90	: Familia de proteínas de choque térmico A 80
Alix	: Proteína que interactúa con ALG-2
TSG101	: Gen de susceptibilidad tumoral 101
TNA α	: Factor de necrosis tumoral alfa
CD171	: Molécula de adhesión de celular neurales L1
ERK	: Proteínas quinasas activadas por mitogeno
RPMI	: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SFB	: Suero fetal bovino
OPTIMEM	: Medio de cultivo reducido en suero
P100	: Placas de cultivo p100
BCA	: Acido bicinconinico
PVDF	: Fluoruro de poli vinilideno
TBS	: Solución salina tamponada con tris
TBT-T	: Solución salina tamponada con tris y polisorbato 20
RBBP4	: Proteína 4 de unión a RB, factor de remodelación de la cromatina
GATAD2A	: Dominio de dedo de zinc GATA que contiene 2A
GATAD2B	: Dominio de dedo de zinc GATA que contiene 2B
HDAC2	: Histona des acetilasa 2
NELFB	: Miembro de complejo B del factor de elongación negativo
SSRP1	: Proteína 1 de reconocimiento de estructura especifica

SUPT16H : Subunidad compleja FACT SPT16

RPA1 : Proteína de replicación A1

STAG1 : Antígeno estromal 1

CTCF-70 : Producto truncado de CTCF: Dominio n terminal de CTCF

TPM : Transcritos por millón

NEAT1 : Transcripción de la asamblea nuclear Paraspeckle 1

FAM225A : Familia con similitud de secuencia 225 miembro A

FAM225B : Familia con similitud de secuencia 225 miembro B

FAM157B : Familia con similitud de secuencia 157 miembro B

LncRNAs : RNAs largos no codificantes

MALAT1 : Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis

PLEC : Plectina

CPNE1 : Copina 1

PNN : Pinina

HGS : Sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos

ADRM1 : Receptor de ubiquitina de proteasoma ADRM1 26S

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1	Esquema fundamental de tesis: La sobre expresión de CTCF promueve la inestabilidad genómica nuclear, formación de micronúcleos y contenido pro metastásico en exosomas secretados por células de cáncer de ovario	19
----------------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Flujo de trabajo para obtención de proteínas correlacionadas con CTCF que tengan un rol en la promoción de la inestabilidad nuclear.	21
Figura 2	Flujo de trabajo para el objetivo específico N°2: Selección de RNAs y proteínas candidatos.	22
Figura 3	Reclasificación de pacientes por etapas.	30
Figura 4	Obtención de datos proteicos y correlación de nivel de proteínas con CTCF en tumor primario de pacientes con cáncer de ovario.	31
Figura 5	Heatmap clusterizado del nivel proteico de las proteínas con mayor correlación con CTCF por paciente.	32
Figura 6	El complejo NuRD se correlaciona de manera positiva con CTCF.	34
Figura 7	Las vías de reparación del genoma están correlacionadas de manera positiva con CTCF.	35
Figura 8	Evaluación de la concentración y distribución de tamaños de exosomas.	37
Figura 9	Microscopia electrónica de exosomas A2780.	38
Figura 10	CTCF está presente en exosomas de células HOSE y A2780.	39
Figura 11	Selección de pacientes con mayor expresión proteica CTCF en tumor primario.	42
Figura 12	Expresión de LncRNAs que se unen físicamente a CTCF según estadio y expresión proteica de CTCF en el tumor primario en pacientes con cáncer de ovario.	45

Figura 13	RNAs seleccionados por estadio con mayor probabilidad de estar presentes en exosomas debido a la presencia de CTCF.	46
Figura 14	Expresión proteica de YY1 y PARP1 según estadio y expresión proteica de CTCF en el tumor primario de pacientes con cáncer de ovario.	47
Figura 15	CTCF se correlaciona positivamente con el complejo NuRD y mecanismos de reparación de DNA.	62
Fig. anexo 1	Análisis de tamaño y concentración de exosomas secretados por células A2780 y HOSE purificados mediante ultra centrifugación	67
Fig. anexo 2	Análisis de tamaño, concentración y microscopia electrónica de exosomas secretados por células HOSE	68
Fig. anexo 3	Análisis del número de clones HOSE al ser estimulados con exosomas A2780.	69
Fig. anexo 4	Vías enriquecidas de las proteínas con correlación positiva con CTCF.	70

FINANCIAMIENTO

Esta tesis no recibió financiamiento directo de ningún proyecto de investigación gubernamental ni universitario. Solo recibió aportes personales de la Dra. Carmen Romero y Dra. Lorena Lobos

RESUMEN

El cáncer de ovario es la enfermedad ginecológica más letal en mujeres. Clínicamente esta enfermedad es difícil de identificar, ya que las pacientes a menudo presentan sintomatología no específica. Debido a esto, el 80% de las mujeres son diagnosticadas con cáncer avanzado. Además, se caracteriza por tener una alta inestabilidad genómica nuclear.

La desestabilización nuclear o inestabilidad genómica nuclear es un fenómeno catalogado como uno de los *hallmark* del cáncer, el cual se define como la pérdida de la homeostasis genómica de las células. Esto genera la producción de micronúcleos, los cuales son destinados a los exosomas.

CTCF es un factor de transcripción involucrado en la regulación genética como en la estabilidad genómica nuclear y este se encuentra sobre expresado en el cáncer de ovario, por lo que en este trabajo investigamos la correlación entre i) CTCF y la inestabilidad nuclear, ii) la presencia de CTCF en exosomas secretados por células de cáncer de ovario y iii) la posibilidad de que CTCF sea el responsable de la presencia de proteínas y RNAs que posean capacidades promotoras de la tumorigénesis o metástasis en exosomas.

Los resultados de esta investigación muestran que la sobre expresión de CTCF esta correlacionada positivamente con la inestabilidad genómica nuclear ya que cuando aumentan los niveles de CTCF en los tumores primarios de pacientes con

cáncer de ovario de la base de datos TCGA Firehose Legacy, aumentan los niveles del complejo NuRD y de la maquinaria de reparación del DNA. Esto gatillaría la promoción de la producción de micronúcleos, los cuales son incorporados a exosomas. Por otra parte, se detectó la presencia de CTCF en exosomas secretados por células de cáncer de ovario A2780. Estos resultados sugieren que CTCF podría tener un rol activo en la generación de los micronúcleos.

Debido a la presencia de CTCF en exosomas, se evaluó *in silico* tanto las proteínas como los RNAs que interactúan con CTCF, para primero verificar si estas biomoléculas han sido descritas como cargo de exosomas y segundo, evaluar si estas poseen la capacidad de promover tumorigénesis o metástasis.

Mediante el uso de técnicas bioinformáticas, mostramos que las biomoléculas que pasaron los filtros han sido descritas estar presentes en exosomas como también promotores de varios mecanismos tumorigénicos y/o metastásicos.

Nuestros resultados sugieren que es posible que CTCF y su interactoma formaría parte del cargo de los micronúcleos y finalmente sería destinado a los exosomas. Así, la sobre expresión de CTCF podría ser responsable de la promoción o aumento del cargo nuclear y de la destinación de agentes protumorales/metastásicos en vesículas extracelulares del tipo exosomas.

ABSTRACT

Ovarian cancer is the most lethal gynecological disease in women. Clinically, this disease is difficult to identify since patients often present non-specific symptoms. Because of this, 80% of women are diagnosed with advanced cancer.

Ovarian cancer is known to have high nuclear genomic instability. Nuclear destabilization or nuclear genomic instability is a phenomenon classified as one of the hallmarks of cancer, which is defined as the loss of genomic homeostasis of cells. This generates the production of micronuclei, which are destined for exosomes.

CTCF is a transcription factor involved in genetic regulation as well as in nuclear genomic stability and it is overexpressed in ovarian cancer. So, in this work we investigated the correlation between i) CTCF and nuclear instability, ii) the presence of CTCF in exosomes secreted by ovarian cancer cells and iii) the possibility that CTCF is responsible for the presence of proteins and RNAs in exosome which have tumorigenic and pro-metastatic capacities.

The results of this research show a positive correlation between CTCF levels, NuRD complex and the DNA repair machinery increases in primary tumors from patients with ovarian cancer from the TCGA Firehose Legacy database. Therefore, CTCF overexpression is positively correlated with nuclear genomic instability. This

would trigger the promotion of micronuclei production, which could be incorporated into exosomes.

On the other hand, the presence of CTCF was detected in exosomes secreted by A2780 ovarian cancer cells. All these results indicate that CTCF could play an active role in the generation of micronuclei.

Due to the presence of CTCF in exosomes, both proteins and RNAs that interact with CTCF were evaluated *in silico*, to first verify if these biomolecules have been described as cargo of exosomes and second, to evaluate if they have the ability to promote tumorigenesis or metastasis.

Using bioinformatic techniques, we show that filter-passing biomolecules have been described to be present in exosomes as well as promoters of various tumorigenic and/or metastatic mechanisms.

Our results suggest that it is possible that CTCF and its interactome would be part of the micronucleus cargo and would ultimately be destined for exosomes. Thus, the overexpression of CTCF could be responsible for the promotion or increase of the nuclear cargo and the destination of protumor/metastatic agents in extracellular vesicles of the exosome type.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de ovario

El **cáncer de ovario** es la enfermedad ginecológica más letal en mujeres [1]. Mundialmente se estiman 314.000 casos nuevos y 207.000 muertes anuales [2]. El riesgo de desarrollar cáncer de ovario para una mujer es de 1 en 75 y la probabilidad de morir por esta enfermedad es de 1 en 100 [3]. Clínicamente esta enfermedad es difícil de identificar, ya que las pacientes a menudo presentan sintomatología no específica como fatiga e hinchazón abdominal. De hecho, el 80% de las mujeres son diagnosticadas con cáncer avanzado en donde la supervivencia a los 5 años no supera el 5%, comparado con el 92% si es que el cáncer es detectado tempranamente [4]. Para las mujeres diagnosticadas con etapas avanzadas de la enfermedad, las opciones de tratamiento son limitadas y aunque el cáncer sea detectado tempranamente la probabilidad de recurrencia es del 70% en 18 meses. [4]. Llama la atención que el promedio de supervivencia a los 5 años varía entre 30-40% a nivel mundial, y que solo haya tenido un incremento modesto del orden del 2-4% desde 1995 [5]. A su vez los cánceres ginecológicos (cuello uterino, ovario, útero, vagina, vulva) alcanzan al 11,5% del total de los cánceres en la mujer y entre ellos el cáncer de ovario se ubica en el segundo lugar con 3,9% del total de los tumores

ginecológicos. En el año 2010 en Chile, el carcinoma epitelial de ovario fue la 9° causa de muerte en la mujer [6].

1.2. Fisiopatología del Cáncer de Ovario

Clasificación patológica

Casi todos los tumores benignos y malignos de ovario se originan de tres tipos celulares: células epiteliales, células estromales y células germinales. En países desarrollados más del 90% de los casos de un tumor maligno de ovario son de origen epitelial, 5-6% son de origen estromal y el 2-3% son de origen germinal [7]. Además, cada categoría posee un número definido de subtipos, los cuales pueden encontrarse de forma combinada en tumores.

En el caso de tumores epiteliales, estos se pueden clasificar en varias categorías: 1) Según los subtipos histológicos: Seroso de alto grado (HGSOC), seroso de bajo grado (LGSOC), mucinoso, endometriode, células claras y tipo Brenner [8]. 2) Según el comportamiento: i) Benigno: cuando carecen de proliferación celular exuberante y comportamiento invasivo. ii) *Borderline*: cuando poseen proliferación atípica, pero sin comportamiento invasivo y iii) Maligno: cuando posee comportamiento invasivo. Por último, 3) según el grado de agresividad, siendo de tipo I: aquellos que progresan desde tumores benignos o *borderline*, como son los de tipo mucinoso, endometriode y no seroso, caracterizados por tener mutaciones en KRAS, PTEN, BRAF. Los de

tipo II: cuyo fenotipo es agresivo y de manera general poseen mutaciones en TP53 y BRCA, siendo el HGSOC el más característico [9].

Factores de riesgo que promueven el desarrollo del cáncer de ovario

Varios estudios epidemiológicos han llegado al consenso sobre la implicancia en los factores reproductivos como hormonales en la patogénesis del cáncer de ovario. De hecho, existen dos corrientes investigativas que han logrado adecuarse a los datos acumulados [10].

La primera corriente es la de ovulación incesante: Postula que el número de ciclos ovulatorios incrementa la tasa de división celular, la cual se asocia con la reparación de la superficie del epitelio luego de cada ovulación, lo que a su vez incrementa la probabilidad de generación de mutaciones espontáneas. La correlación entre el aumento de ovulaciones con el incremento de riesgo de cáncer es consistente con este enfoque [11].

La segunda corriente involucra el impacto de las gonadotropinas, bajo el fundamento de que el cáncer puede desarrollarse por el exceso de estimulación en el tejido ovárico por parte de las gonadotropinas pituitarias: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) [12].

Ambos postulados proponen mecanismos que proporcionan un marco para interpretar los datos epidemiológicos sobre la correlación en la exposición tanto

endógena como exógena de hormonas reproductivas en la patogenia del cáncer.

Factores fisiológicos que previenen el desarrollo del cáncer de ovario

El embarazo causa anovulación y suprime la secreción de gonadotrofinas hipofisarias lo que es consistente con ambas corrientes. De hecho, mujeres que han tenido hijos tienen entre un 30% a un 60% menos riesgo que mujeres que nunca han tenido hijos, y cada embarazo a término disminuye el riesgo en un 15%. [13]

La lactancia suprime la secreción de gonadotrofinas pituitarias lo que lleva a la anovulación, particularmente en los meses iniciales de la lactancia. Ambas hipótesis sugieren que la lactancia reduce el de riesgo de cáncer de ovario. De hecho, la mayoría de los estudios indican un leve efecto protector de desarrollar cáncer de ovario. Además, un metaanálisis reciente indica el efecto protector de desarrollar cáncer de ovario se incrementa al aumentar el tiempo de lactancia [14].

Con todos estos antecedentes se puede plantear que se requiere de forma urgente caracterizar los mecanismos del desarrollo del cáncer, con especial énfasis en los estadios tempranos, con el fin de descubrir nuevos marcadores tempranos de esta enfermedad o incluso nuevos blancos farmacológicos.

Es por esto que en esta investigación se propone el estudio de una proteína, que se encuentra descrita en células presentes desde la mosca hasta el ser humano, ubicada en todas las células del cuerpo humano y sobre todo, absolutamente esencial para el funcionamiento correcto de las células.

1.3. CCCTC-binding factor (CTCF): Factor transcripcional.

CCCTC-binding factor (CTCF) es una proteína de 82 kDa que cumple el rol como factor transcripcional. Pertenece a la familia de proteínas con estructura de dedos de zinc y se expresa ubicuamente en muchos tipos de células y tejidos, además de tener una secuencia muy conservada entre las células eucariotas [31]. Posee 3 dominios, N-terminal, c-terminal y un dominio central los cuales pueden ser modificados post traduccionalmente. CTCF posee 11 dedos de zinc codificados entre el exón 2 y 9 del dominio central [32], los cuales, a través del uso combinatorio de ellos, permite su unión a diferentes regiones del genoma. Hasta la fecha, se conocen alrededor de 20.000 sitios de unión de CTCF en el genoma humano [33].

Una de las características importantes de este factor es el hecho que el 55% de los sitios de unión corresponden a sitios intergénicos, 35% a intragénicos y el resto son cercanos a promotores. Lo que sugiere un rol mucho más complejo en la regulación de genes [34].

Para entender mejor el impacto que puede tener este factor transcripcional en la regulación genética, se debe considerar que la actividad genética, tanto a nivel de locus como a nivel de interacciones cromosómicas lejanas, es sumamente influenciada por el posicionamiento espacial del genoma, así como también, la estabilidad de la arquitectura genómica [35]. Es por esto que la habilidad de este factor para unirse a una gran variedad de secuencias genómicas, le permite regular la expresión de genes vía: i) Activación o represión de promotores [36], ii) Insulación de *enhancers* [33], iii) Regulador de la comunicación entre *enhancers* y promotores. iv) Regulador de interacciones entre segmentos lejanos de cromatina, iv) Estabilizador de la arquitectura genómica [37], v) Selector de exones en el proceso de *splicing* alternativo [38], entre otras funciones.

Para explicar el rol de CTCF, se debe mencionar que el genoma mamífero se encuentra organizado en dominios de interacción de cromatina local, del tamaño entre kilo a mega bases, denominados dominios de asociación topológica (TADs, por sus siglas en inglés) [39]. Estos dominios contienen secuencias genéticas que interactúan físicamente entre sí con mucha más frecuencia que con regiones que se encuentran fuera de los TADs [40]. Es precisamente en los márgenes de los TADs, que existen motivos de unión de CTCF. La interrupción de estos motivos produce la desregulación de los genes

que se encuentran dentro de los TADs, provocando una incorrecta expresión de los genes [41].

De hecho, hoy se sabe que CTCF al unirse a el genoma, actúa como proteína de andamiaje para diferentes proteínas como Miembro de la Familia SMAD tipo 3 (SMAD3), poli-[ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1), YY1, Cohesina, entre otras [42]. Esta última, al interactuar con CTCF, reestructura espacialmente la cromatina dando forma a los TADs, por medio de la formación de loops con el fin de controlar la expresión genética, modulando la interacción entre enhancers y promotores [43]. Una de las funciones de CTCF que utiliza esta propiedad, es la de insulación de enhancers.

Existen secuencias denominadas insuladoras, cuyo propósito es establecer límites entre secuencias genómicas vecinas. CTCF posee afinidad por un grupo determinado de ellas, y al unirse a estas en compañía de Cohesina, cambia la forma del loop de cromatina, evitando la comunicación del *enhancer* con su promotor correspondiente, desencadenando que la transcripción de ese gen particular se vea disminuida o incluso bloqueada [44], asignándole así un rol de supresor de la transcripción debido a su rol estructural.

Además, CTCF posee otro rol crucial y sumamente interesante, que es su capacidad de modular el posicionamiento del nucleosoma, lo que permite

regular la exposición de secuencias regulatorias a la maquinaria de transcripción y, por lo tanto, activar o silenciar genes [45].

Como fue expuesto en los párrafos anteriores, el rol que cumple CTCF en la regulación genética es sumamente complejo y hay mucho aun que investigar, sin embargo, es necesario mencionar que todas estas funciones dependen tanto de las modificaciones post traduccionales que sufra el factor, como del estado de metilación del genoma [32]. Las modificaciones post traduccionales cumplen el rol de cambiar la afinidad por la cromatina, ya sea a nivel general o secuencia específico. Entre ellas existen poly-ADP(ribosil)aciones, realizadas por las proteínas PARP, cuyo fin es regular el proceso de insulación [46]. Fosforilaciones, realizadas por CK2, ocasionando que este factor pierda la afinidad por la cromatina [47], e incluso SUMOilaciones, cuya función aún no ha sido completamente descrita. [37]. Por otra parte, la metilación de las secuencias de unión de CTCF, evitan su interacción con el DNA. [33].

De esta manera, es que CTCF a la fecha sigue siendo foco de estudio de muchos grupos de investigación, entre los cuales han tomado énfasis en el rol que pueda estar cumpliendo este factor en la promoción de capacidades tumorigénicas en cáncer, de hecho, hay publicaciones que describen a este

factor presente en ovario y el rol que cumple o no en la promoción de la metástasis están en desarrollo.

1.4. CTCF en cáncer de ovario.

En 2017, se realizó una investigación exhaustiva acerca de la relación de CTCF con el cáncer de ovario [48]. Esta investigación muestra varias razones sobre la importancia de este factor en la progresión de la enfermedad.

En primer lugar, se demuestra que los niveles de expresión y de proteína de CTCF se encuentran elevados en muestras de pacientes con cáncer de ovario. Además, los niveles proteicos son al menos 2 veces más altos en las lesiones metastásicas cuando son comparadas con el tumor primario. Por otra parte, se observó que, al silenciar este factor en las líneas celulares A2780 y SKOV3, que representan a células del tumor primario y metastásico respectivamente, no se altera la capacidad proliferativa del cáncer *in vitro* ni tampoco el tamaño del tumor *in vivo*. Sin embargo, al realizar pruebas funcionales de la cascada metastásica, el silenciamiento de CTCF desencadena a nivel *in vitro* la disminución tanto la capacidad de regeneración de heridas, migración e invasión de las células. Además, al administrar estas células en ratones se observa una disminución en la cantidad de focos metastásicos. Por último, CTCF posee como blanco múltiples genes involucrados en la metástasis, en los

que incluye: proteína proto-oncogén tirosina quinasa (SRC), Metalopeptidasa de matriz 9 (MMP9), TG β 1, Miembro 1 de la familia Serpin E (SERPINE1) y la Proteína 1 de unión al extremo c-terminal (CTBP1) [48].

1.5. Integridad genómica nuclear

La función genómica nuclear de las células eucariotas depende de la dinámica de la organización espacial y temporal del núcleo, ya que todos estos mecanismos influyen tanto en la mitosis como en la regulación de la expresión genética. Debido a esto, la integridad nuclear es esencial para el correcto funcionamiento celular [64].

Como ya fue expuesto en los párrafos anteriores, CTCF cumple un rol fundamental en la integridad del funcionamiento y la arquitectura nuclear.

A parte de todas las funcionalidades anteriormente descritas, este factor de transcripción es capaz de actuar como un “puente estructural” o proteína de andamiaje al anclar la heterocromatina a la laminina de la pared interna de la membrana nuclear [65], como también influir en la segregación correcta de los cromosomas en la anafase de la mitosis [66], por lo que la desregulación de este factor de transcripción podría desencadenar un desbalance en la integridad nuclear de las células.

1.6. Inestabilidad genómica nuclear

La desestabilización nuclear o inestabilidad genómica nuclear es un fenómeno catalogado como uno de los *hallmark* del cáncer, el cual se define como la pérdida de la homeostasis genómica de las células, en donde la regulación de la expresión de genes y/o la reparación del genoma se encuentran alterados [72].

La inestabilidad genómica es desencadenada por varios factores, entre ellos se encuentran el estrés celular, mutaciones del genoma como también rupturas de doble hebra, por lo que este fenómeno es muy común en las células cancerígenas [67].

El cáncer de ovario seroso de alto grado se destaca por su alta inestabilidad genómica, la cual es gatillada por la alta prevalencia de mutaciones en el genoma [68]. Entre estas destacan las amplificaciones genéticas, cuya manifestación puede ocurrir por un mal funcionamiento de la maquinaria de reparación de cortes de doble hebra [69].

CTCF podría tener un rol en la generación de estas amplificaciones genómicas ya que, en el estudio realizado por Teresa O, et al 2020, el *knockout* de CTCF en células ESC genera cortes de doble hebra en donde el 50% de ellos ocurre en sitios de unión de CTCF [70].

Formación de micronúcleos (MN)

Los MN son un producto de la inestabilidad nuclear, los cuales son originados a partir de fragmentos acéntricos y/o céntricos de cromosomas e incluso cromosomas completos que no pudieron incorporarse al núcleo al término de la telofase en la mitosis. Los cuales eventualmente son encapsulados en membrana nuclear. Una de las principales causas de la formación de estos MN, son los cortes de doble hebra en el genoma [71]. De hecho, se ha descrito formación de MN en pacientes de cáncer de ovario post tratamiento con quimio y/o radioterapia [73].

Yokoi A, et al 2019 demuestra en células de cáncer de ovario seroso de alto grado, que estos MN son incorporados a la maquinaria de biosíntesis de exosomas mediante la encapsulación de estos por las tetraspaninas CD63 [29].

1.7. Comunicación celular mediada por exosomas en cáncer

La relación entre los exosomas y la progresión del cáncer es uno de los focos de estudio que más rápido se ha expandido en la última década debido al gran potencial que tiene para descubrir nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos [15]. Se ha demostrado que los exosomas favorecen la progresión del cáncer y la metástasis a través de la regulación de procesos como la

transición epitelio-mesenquimal (EMT), migración, modulación del sistema inmune, invasión, angiogénesis y la reprogramación del estroma de los nichos pre metastásicos a un fenotipo asociado al cáncer [16]. El cáncer de ovario se ajusta a este fenómeno porque se ha comprobado que la difusión de células tumorales al peritoneo, el lugar más común de metástasis en este tipo de neoplasia es estimulado por exosomas secretados por las mismas células que componen el tumor [17].

1.8. Exosomas

Los **exosomas**, originalmente clasificados como residuos celulares en los años 80 [18], son micro vesículas derivadas de la membrana de endosomas tardíos que poseen un tamaño entre el rango de 40 a 150nm [19]. Últimamente se ha descrito que funcionan como vehículos de un cargo complejo compuesto de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos cuyo fin es entregar este cargo a células blanco. Esta acción puede resultar en una reprogramación celular de las células receptoras [23].

Los exosomas se producen en los cuerpos multi vesiculares (MVB) mediante la invaginación de la membrana de endosomas tardíos produciendo vesículas intraluminales (ILVs). Durante este proceso tanto ácidos nucleicos como proteínas son reclutados e incorporados en los ILVs, La fusión de la membrana

de los MVB con la membrana plasmática genera la liberación de los ILVs al espacio extracelular, estos últimos se denominan exosomas. [20]

Se ha descrito que la elaboración de los ILVs es realizada por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, ESCRT por sus siglas en inglés. Esta maquinaria se compone por 4 complejos (ESCRT 0-III) que trabajan de manera cooperativa para formar los MVB al invaginar, yemar las membranas e incluso sortear el cargo [20]. Sin embargo, la producción de exosomas puede ser independiente de ESCRT, este último funciona a base de micro dominios enriquecidos de ceramida en la membrana de los MVB. [21]

Los exosomas son capaces de interactuar con células vecinas y distantes. Esta comunicación intercelular posee 3 mecanismos principales: 1) Interacción directa entre receptores y ligandos 2) Fusión directa del exosoma en la membrana de la célula blanco y 3) Internalización vía endocitosis [22]. Estos mecanismos pueden generar cambios en el comportamiento y el fenotipo de las células blanco al estimular directamente las células vía: a) ligandos situados en la membrana plasmática b) transferencia de receptores activos por medio del mecanismo de fusión y c) reprogramación fenotípica al entregar el cargo de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos funcionales [23].

El cargo de los exosomas es sumamente complejo y este varía dependiendo tanto del tipo como del contexto celular. Hasta la fecha se han descubierto más

de 4400 proteínas, 194 lípidos, 1639 mRNAs y 764 miRNAs en diversos tipos celulares [24]. Las proteínas que más destacan son las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), proteínas heatshock (HSP70, HSP90), como también la proteína que interactúa con ALG-2 (Alix) y el Gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101) cuyas funciones van desde la invasión y fusión celular, presentación antigénica como también la producción de exosomas [25]. Incluso se ha reportado contenido nuclear en exosomas secretados por células cancerígenas de ovario que incluye alrededor de 201 proteínas asociadas al núcleo y 17 proteínas asociadas a la cromatina [29].

1.9. Rol de los exosomas en la progresión del cáncer de ovario.

La participación de los exosomas en la progresión del cáncer de ovario ocurre a lo largo de todo el desarrollo de la enfermedad, especialmente en la metástasis. Por una parte, existe una población de exosomas que poseen como carga proteínas tales como: β -catenina, Interleucina-6 y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); estos promueven el desprendimiento de las células cancerígenas del tumor primario al gatillar la EMT [26]. También, la población de exosomas enriquecidos en CD171 fomentan la supervivencia de células cancerígenas en la cavidad peritoneal al aumentar la migración y la activación de la vía ERK [27]. Por otro lado, la barrera natural del peritoneo, las células mesoteliales peritoneales,

puede ser reprogramada para convertirse en un sitio pre-metastásico por medio de la promoción de la EMT y transferencia de CD44, lo que permite la fijación de células cancerígenas en la cavidad peritoneal [28].

1.10. Resumen

- El **cáncer de ovario** es la enfermedad ginecológica más letal y el 80% de los casos diagnosticados corresponden a etapas avanzadas de la enfermedad.
- **CTCF** es un factor transcripcional requerido para el correcto funcionamiento en procesos como la mantención de la integridad nuclear como la regulación de la expresión génica e involucrado en la promoción de procesos asociados a la metástasis como son la migración e invasión en cáncer de ovario.
- La inestabilidad genómica nuclear se desencadena por estrés celular, mutaciones y rupturas de doble hebra. Entre sus productos, los micronúcleos, son incorporados a los cuerpos multivesiculares y por consiguiente a los exosomas.

- Los **exosomas** secretados por células cancerígenas poseen contenido nuclear y además están involucrados en cada etapa de la **progresión del cáncer**.

2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

CTCF es un factor transcripcional requerido para el correcto funcionamiento en procesos como la mantención de la integridad y estabilidad nuclear como la regulación de la expresión génica e involucrado en la promoción de procesos asociados a la metástasis como son la migración e invasión en cáncer de ovario [31-50]. Cabe mencionar que, la inestabilidad genómica nuclear se desencadena por estrés celular, mutaciones y rupturas de doble hebra. Entre sus productos, los micronúcleos, son incorporados a los cuerpos multivesiculares y por consiguiente a los exosomas [29, 67-73].

Por estas razones la sobre expresión de CTCF podría aumentar la inestabilidad genómica nuclear, por lo tanto, el estudio de la proteómica y transcriptómica asociada a CTCF podría ser útil para dilucidar que vías podrían contribuir a la desestabilización genómica nuclear. Al verificar este proceso, la sobre expresión de CTCF podría promover la formación de micronúcleos, por lo que, CTCF y biomoléculas que interactúan con este estarían siendo incorporados a los exosomas a través de los micronúcleos. Debido a que los exosomas pueden reprogramar a las células receptoras, se considerará a las biomoléculas que interactúen con CTCF con la capacidad de promover metástasis.

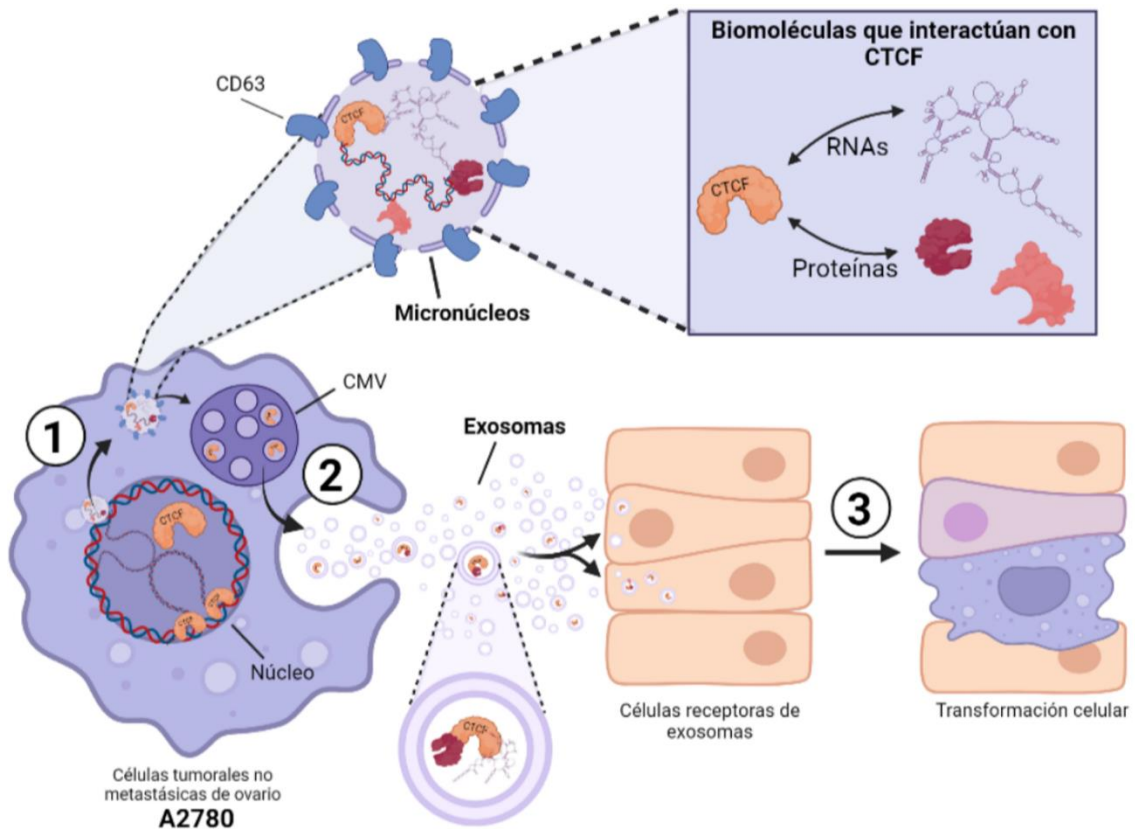


Ilustración 1. Esquema fundamental de tesis: La sobre expresión de CTCF promueve la inestabilidad genómica nuclear, formación de micronúcleos y contenido pro metastásico en exosomas secretados por células de cáncer de ovario:

1) La inestabilidad genómica nuclear promovida por la sobre expresión de CTCF aumenta la formación de micronúcleos. Además, debido a las funciones de CTCF, este factor debería estar contenido en los micronúcleos al igual que su interactoma. Una vez formados los micronúcleos, la tetraspanina CD63 envuelve la membrana de estos para destinarlos a los cuerpos multi vesiculares (CMV). 2) Los CMV al fusionarse con la membrana plasmática, gatilla la liberación de los exosomas, los cuales poseen contenido nuclear debido a los micronúcleos. 3) Los exosomas secretados por células cancerígenas son capaces de reprogramar las células receptoras de estos exosomas, promoviendo un fenotipo pro-tumoral/metastásico.

Dado los antecedentes, la hipótesis es:

“La sobre expresión del factor transcripcional CTCF en tumores de pacientes con cáncer de ovario, se correlaciona con el aumento de la inestabilidad nuclear, con la presencia de CTCF y a su vez con RNAs y proteínas que interactúan con este factor en exosomas secretados por células de cáncer de ovario *in silico*”.

Objetivo General

Examinar en un estudio *in silico* la correlación entre la inestabilidad genómica nuclear y CTCF usando la base de datos *TCGA Firehose Legacy* y evaluar la de la presencia de CTCF y biomoléculas que interactúan con este factor que posean la capacidad de promover metástasis en exosomas

Objetivos específicos:

Objetivo específico N°1:

Evaluar en un estudio *in silico* que proteínas pueden tener mayor correlación con el factor transcripcional CTCF, las cuales indicarían o promoverían inestabilidad genómica nuclear

Objetivo específico N°2: Estudiar en modelos *in silico* las posibles proteínas o RNAs que podrían estar presentes en exosomas secretados por células tumorales de cáncer de ovario debido a la presencia de CTCF y que puedan tener alguna contribución en los cambios sobre las capacidades tumorigénicas afectadas.

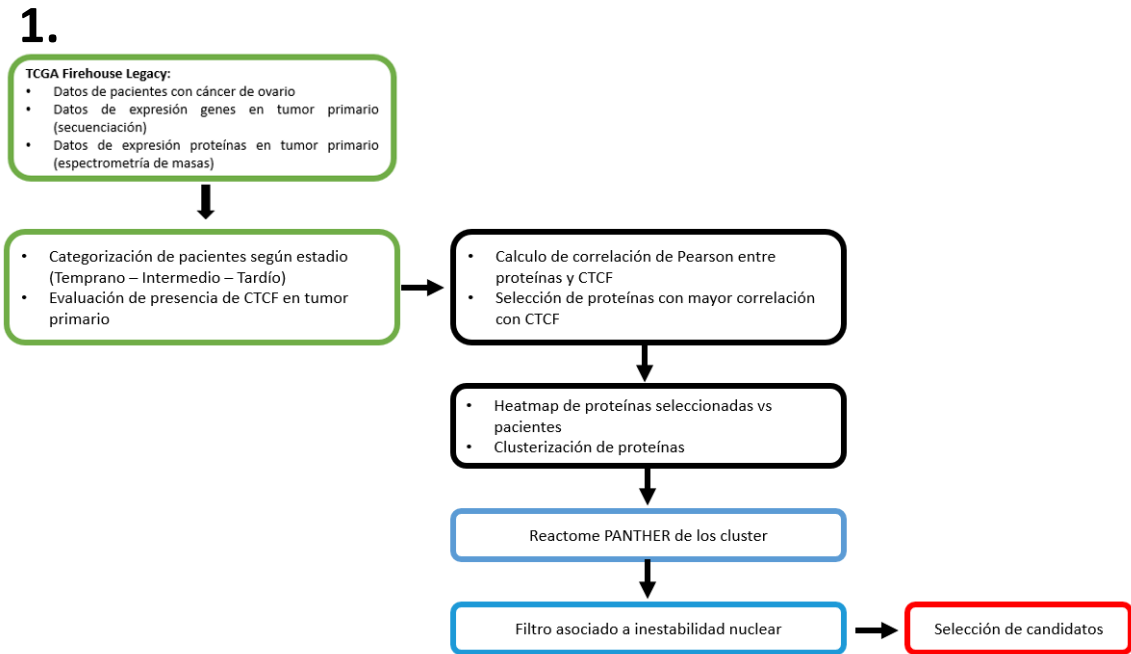


Figura 1. Flujo de trabajo para obtención de proteínas correlacionadas con CTCF que tengan un rol en la promoción de la inestabilidad nuclear:

A partir de la base de datos TCGA *Firehouse Legacy* de pacientes con cáncer de ovario, se utilizaron los datos de estadio y expresión de proteínas (espectrometría de masas y secuenciación respectivamente) de los pacientes con datos de expresión proteica de CTCF en el tumor primario (Verde). Luego, se calculó la correlación de Pearson del nivel proteico de proteínas con CTCF y se seleccionaron aquellas con mayor correlación. A partir de estas proteínas se realizó un *heatmap* clusterizado, se realizó una búsqueda de ontología genómica mediante el software Reactome PANTHER para cada clúster, para finalmente seleccionar aquellas proteínas con un rol asociado a la inestabilidad del núcleo.

2.

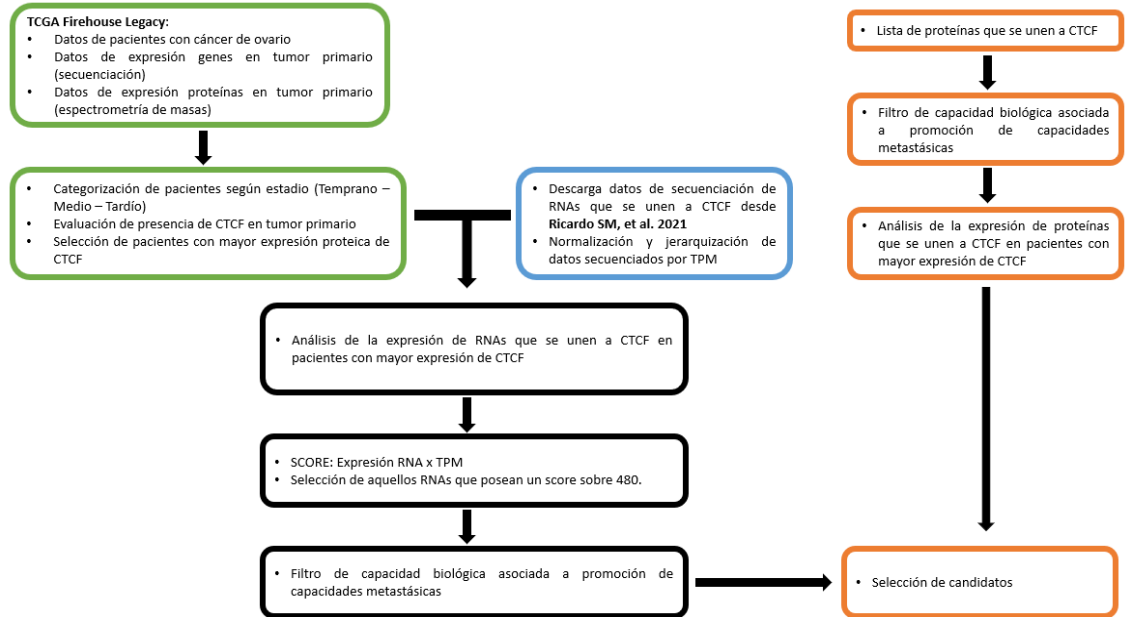


Figura 2. Flujo de trabajo para el objetivo específico N°2: Selección de RNAs y proteínas candidatos.

A partir de la base de datos TCGA *Firehouse Legacy* de pacientes con cáncer de ovario, se utilizaron los datos de estadio y expresión de proteínas y RNAs (espectrometría de masas y secuenciación respectivamente) de los pacientes con mayor expresión proteica de CTCF en el tumor primario (Verde). En estos pacientes se analizó la expresión de RNAs, que se unen físicamente a CTCF previamente normalizados y jerarquizados según el TPM obtenido (Azul). Se calculó un SCORE que multiplica el valor de expresión del RNA con su TPM y se seleccionaron aquellos que tuvieron un valor mayor a 480. Por último, se realizó un filtro de los RNAs seleccionados según la capacidad biológica de promover capacidades metastásicas (Negro). Además, se analizaron las proteínas que se unen a CTCF, las cuales tienen la capacidad de promover el cáncer de ovario y se analizó su expresión proteica en tumores primarios de los pacientes seleccionados (Naranja).

3. METODOLOGÍA

3.1. Líneas celulares, medio condicionado y preparación de exosomas

Las líneas celulares A2780 y HOSE se cultivaron en RMPI con 10% SFB, todas incubadas a 37°C con 5% CO₂ constante. Para la recolección de exosomas, se sembraron 800.000 células en medio OPTIMEM en placas p100 por 48h. Al alcanzar una confluencia del 70-80%, se recolectó el medio condicionado, se centrifugó primero a 3000g por 10 minutos y luego a 10.000g por 15 minutos a 4°C, se filtra el sobrenadante en filtros de 0,22 µm para luego congelar la muestra a -80°C. Una vez almacenado 500 ml de medio, se concentró al menos 70 veces el volumen del sobrenadante en tubos AMICON de 100K mediante centrifugaciones de 15 minutos a 3000g. Finalmente se utilizó el kit Exo-Spin para aislar las micro vesículas desde el concentrado, los exosomas quedan resuspendidos en 200 µl de PBS por columna.

3.2 Cuantificación de Exosomas

Para cuantificar los exosomas según cantidad y tamaño, se realizó un análisis de nanopartículas utilizando el equipo NanoSight NS300, se inyectó la solución con exosomas en PBS previamente diluida en el equipo y luego se realizan grabaciones de 30 segundos. El equipo utiliza una luz laser que incide en los

exosomas, luego esta luz se dispersa y el equipo capta la dispersión de la luz y calcula la cantidad y tamaño de los exosomas.

3.3 Caracterización de exosomas mediante Western Blot

La cuantificación de proteínas se realiza mediante el método de ácido bicinconinico (BCA), y fueron separadas mediante SDS-PAGE con un gel en gradiente al 5-15%. Las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF. Esta membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% con TBS 1x por 1 hora en agitación constante, luego se agrega el anticuerpo primario específico y se deja a 4°C toda la noche. Finalizado esta incubación, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-T 1x para luego agregar el anticuerpo secundario requerido incubando la membrana por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. La detección fue realizada mediante quimiofluorescencia, para el análisis de los geles se utilizó el programa Image Studio. Las proteínas evaluadas son: CTCF, TSG101 como marcador de exosomas ya que es parte del complejo ESCRT-1, CD63 como marcador de exosomas ya que es necesario para la secreción de exosomas y β -actina.

3.4 Microscopia electrónica

Los exosomas fueron visualizados para determinar su integridad mediante un microscopio de transmisión electrónica (TALOS) de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se utilizó 5 µl de muestra de exosomas la cual fue incubada por 5 minutos en una grilla con una solución de acetato de uranilo al 2% a temperatura ambiente. Luego para deshidratar las muestras se incubaron a 37°C por 15 minutos, para luego observarlas en el microscopio.

3.5 Bioinformática

Se descargó la base de datos de pacientes con cáncer de ovario *TCGA Firehouse Legacy* desde la página web cbioportal.org. Se utilizaron los datos de expresión de genes y de expresión de proteínas de los tumores primarios de pacientes (Secuenciación y espectrometría de masas respectivamente). Se categorizaron los pacientes según estadio de la enfermedad y se evaluó la expresión proteica de CTCF.

Se obtuvo la correlación de Pearson entre 3377 proteínas y CTCF, y se realizó un *heatmap* clústerizado según las métricas de distancia euclidiana y el método centroide. A partir de los clústeres generados, se estudió las vías ontológicas correspondientes para cada clúster mediante el software *Reactome Panther*, y se

seleccionaron aquellas proteínas que promuevan la inestabilidad genómica nuclear.

Para el objetivo 2, se seleccionaron aquellos pacientes que tenían mayor expresión proteica de CTCF (z-score >1).

Se descargaron los datos de secuenciación de RNAs que se unen a CTCF desde Ricardo SM, et al. 2021. Estos datos fueron normalizados y jerarquizados mediante el cálculo de TPM.

Se analizó la expresión de RNAs que se unen a CTCF en los pacientes con mayor expresión de CTCF y se calculó un SCORE (expresión de RNA en tumor x TPM RNA) y se seleccionaron aquellos con un SCORE > 480. Por último, de estos RNAs se seleccionaron aquellos que tienen alguna capacidad asociada a promoción de capacidades metastásicas.

Para el caso de las proteínas, se seleccionaron aquellas proteínas que tienen la capacidad de interactuar con el dominio C-terminal de CTCF y que además tienen la capacidad de promover capacidades metastásicas. Luego se analizó su expresión proteica en los tumores de los pacientes con mayor expresión proteica de CTCF.

3.6 Ensayo de formación de clones

En una placa de cultivo de 12 pocillos se agregó una capa de agarosa al 2%, luego se agregaron 7500 células HOSE re suspendidas en una mezcla de medio de cultivo RPMI + agarosa (1%). Se agregaron los siguientes estímulos; 5 μg , 10 μg y 20 μg de exosomas A2780 y 10 μg de exosomas de A2780 previamente sonicados por 10 minutos en un baño termorregulado a 37°C. Al día 10 y 14 se obtuvieron imágenes y se contaron los clones; al día 10 se cuantificaron los clones sobre 50 μm de diámetro y al día 14 sobre los 100 μm de diámetro.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados del Objetivo N°1

Objetivo 1: Estudiar en modelos *in silico* las posibles proteínas de mayor correlación con el nivel proteico de CTCF que podrían indicar o promover inestabilidad genómica nuclear.

Para iniciar los ensayos *in silico* del proyecto lo primero fue decidir la base de datos que entregue la mayor cantidad de data almacenada, y esta es TCGA-*Firehose Legacy*, esta base de datos exclusiva de pacientes de cáncer de ovario contiene información acerca de la edad, etapa del cáncer de ovario y secuenciación de proteínas y RNAs. Luego se procede a descargar la data y analizar sus datos clínicos. Hay información de un total de 617 pacientes, de los cuales 586 de ellos no recibieron quimioterapia previa a la biopsia y ninguno de los pacientes utilizados en este estudio recibió quimioterapia previamente. Considerando que hay pocos pacientes diagnosticados en estadio temprano (Fig 3A), es que se rearmaron las clasificaciones.

4.1.1 Reclasificación de pacientes de cáncer de ovario

En la **Figura 1**, se muestra el flujo de trabajo realizado para abordar el primer objetivo.

Para comenzar, primero se seleccionaron aquellos pacientes que poseían datos de expresión proteica de CTCF en el tumor primario (174 pacientes) (**Figura 3**). Como se puede observar en la **figura 3A**, al igual que lo descrito en la literatura [1, 2, 3], más del 80% de los pacientes se encuentran clasificados en etapas tardías de la enfermedad. Debido a la gran diferencia de pacientes por estadios, se dificulta la comparación de expresión de RNAs y proteínas entre estadios, por lo que reclassificamos a los pacientes en 3 categorías (**Figura 3B**). En donde los pacientes clasificados en IC, IIA y IIB estarán catalogados como Early Stage, IIC, IIIA Y IIIB en Mid Stage y IIIC y IV en Late Stage.

4.1.2 Selección de proteínas con mayor correlación con CTCF

De estos pacientes. se utilizó la información del nivel proteico de 3378 proteínas en donde se calculó la correlación de Pearson de estas proteínas con respecto al nivel proteico de CTCF. Únicamente se seleccionaron aquellas proteínas que tenían una correlación menor o igual a -0.3 y mayor o igual a 0.3 (**Figura 4**).

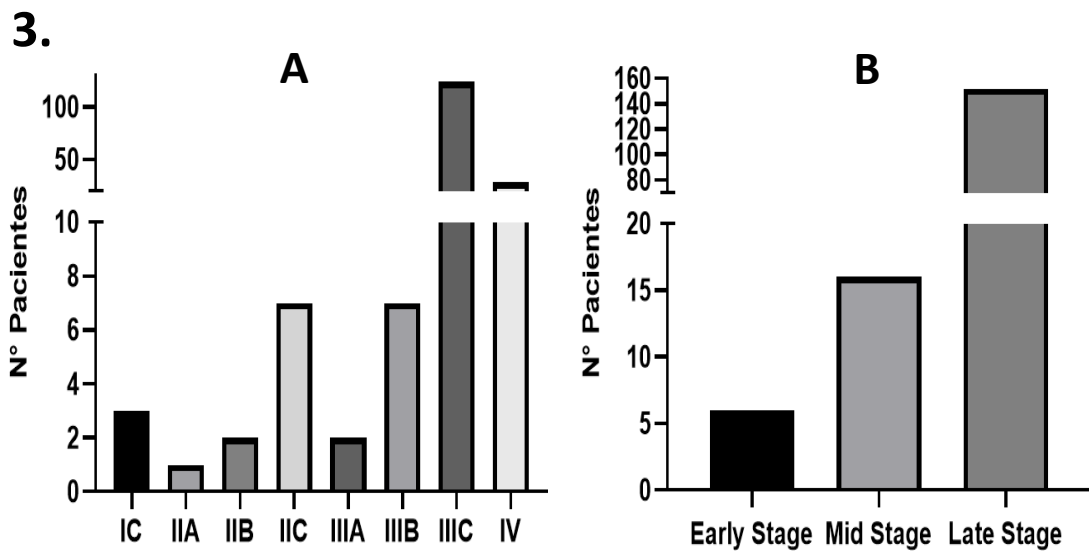


Figura 3: Reclasificación de pacientes por etapas.

Se muestra el número de pacientes que poseen datos de expresión proteica de CTCF clasificados según la etapa del cáncer de ovario. A) Número de pacientes por etapa diagnosticada B) Pacientes agrupados en 3 categorías según su etapa, en donde Early Stage = IC, IIA, IIB. Mid Stage = IIC, IIIA, IIIB. Y Late Stage = IIIC y IV.

4.1.3 Organización de proteínas y estudio de vías ontológicas asociadas

Una vez seleccionadas las proteínas con mayor correlación con CTCF se realizó un *heatmap* clusterizado para organizar en grupos tanto a los pacientes con niveles proteicos similares como a las proteínas con expresión semejante (**Figura 5**).

4.

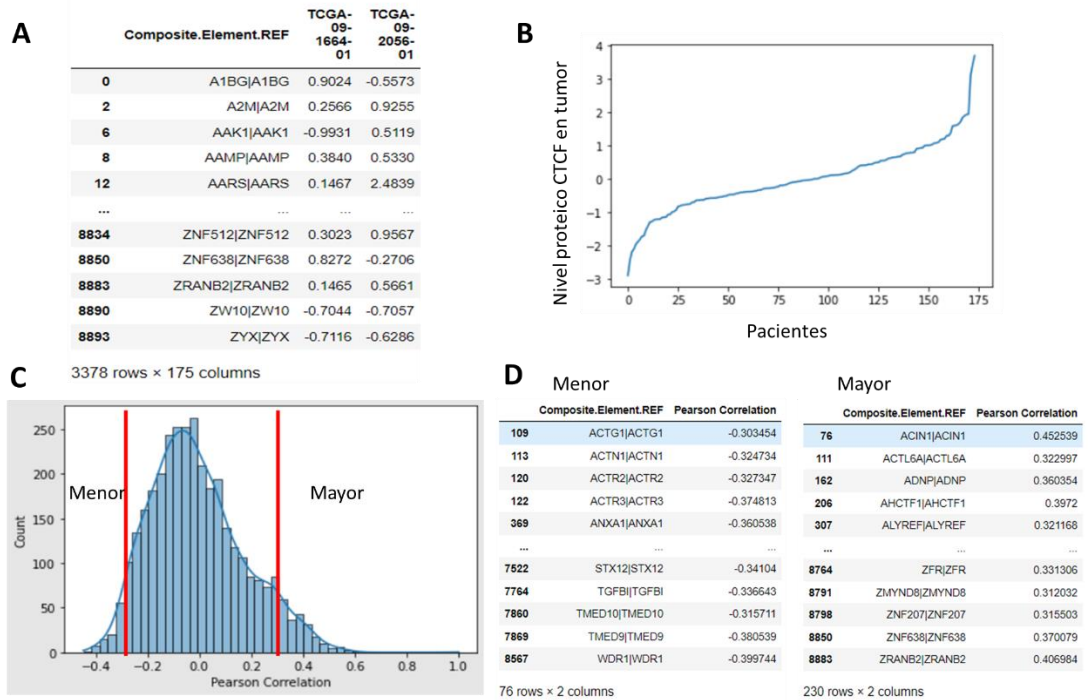


Figura 4. Obtención de datos proteicos y correlación de nivel de proteínas con CTCF en tumor primario de pacientes con cáncer de ovario.

Se muestra en la figura: A) Tabla con información del nivel proteico de 3378 proteínas por paciente, B) el nivel proteico de CTCF ordenados de menor a mayor nivel, C) grafico que muestra la correlación de Pearson de estas 3377 proteínas con respecto a CTCF. D) Selección de proteínas con una correlación $\leq -0,3$ (Menor) y $\geq 0,3$ (Mayor).

5.

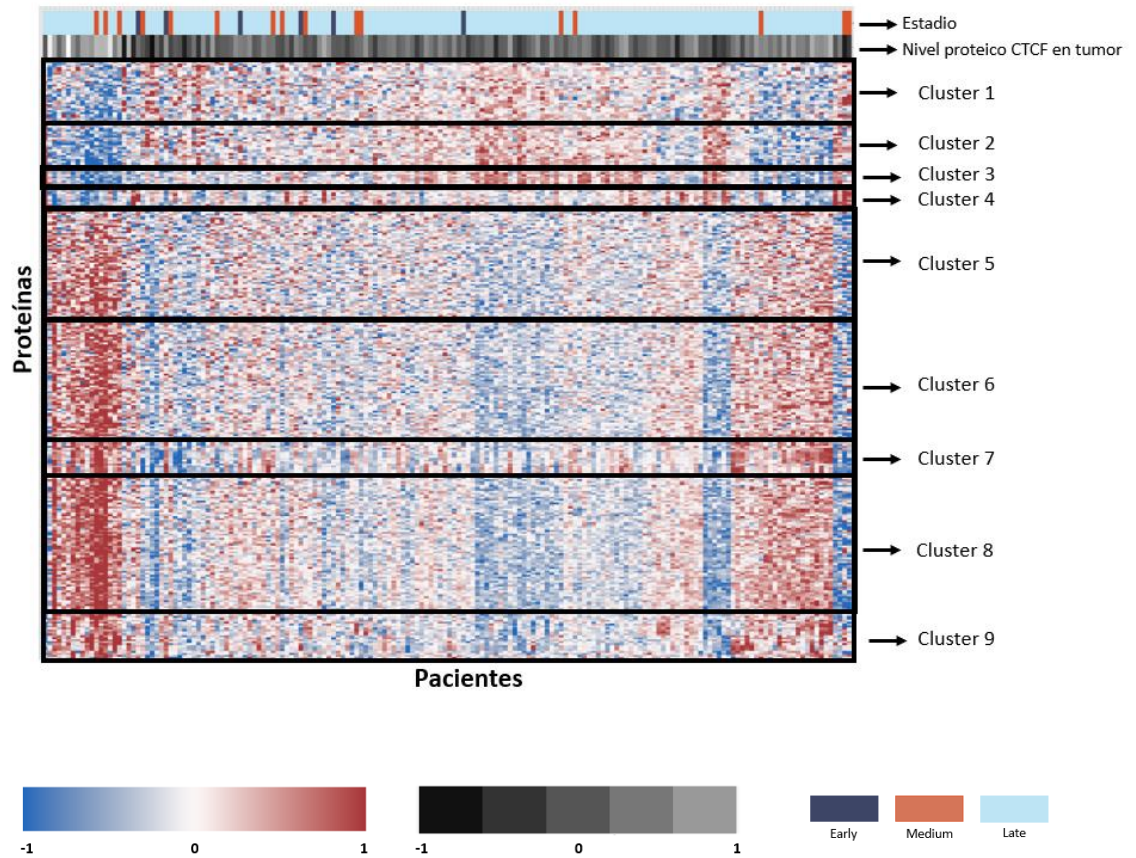


Figura 5. Heatmap clusterizado del nivel proteico de las proteínas con mayor correlación con CTCF por paciente.

En la figura se muestra el estadio de cáncer de ovario correspondiente por paciente (Primera fila), el nivel proteico de CTCF por paciente (Segunda fila) y el nivel proteico de las proteínas con mayor correlación con respecto a CTCF (resto de filas). La clusterización fue realizada con el método centroide y con distancia euclidiana, con el cual se generaron 9 clúster.

La clusterización de proteínas logro organizar a las mismas en 9 clúster (grupos) diferentes. Esto indica que cada grupo posee un nivel proteico similar entre las proteínas que los conforman, es por este motivo que se verificó por ontología genómica mediante el uso del software *Reactome Panther* a que vías pertenece cada clúster.

4.1.4 Correlación positiva entre el complejo NuRD y CTCF podría aumentar la desestabilización genómica nuclear.

Una de las vías que se encuentran correlacionadas de manera positiva con CTCF, son las proteínas que conforman el complejo NuRD (RBBP4, GATAD2A, GATAD2B y HDAC2) (**Figura 6**). Este complejo tiene la capacidad de inhibir a TP53 y PTEN como también mantener la metilación en secuencias genómicas [XX].

4.1.5 El aumento de CTCF se correlaciona de manera positiva con las vías de reparación del genoma.

Otras proteínas que se encuentran correlacionadas de manera positiva con CTCF son proteínas asociadas a vías de reparación de cortes de doble hebra (NELFB, SSRP1 y SUPT16H) y la activación de la maquinaria de reparación del DNA (RPA1, STAG1 y PARP1) (**Figura 7**).

6.

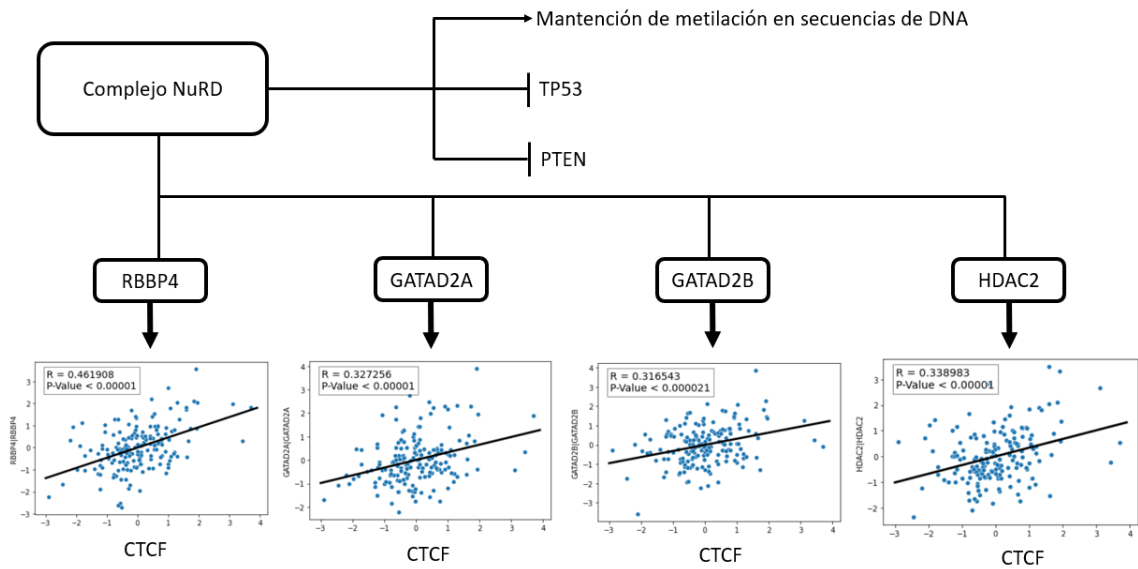


Figura 6. El complejo NuRD se correlaciona de manera positiva con CTCF.

En la figura se muestra las funciones del complejo NuRD relacionadas con la promoción de la inestabilidad genómica nuclear. Además, se muestran los gráficos de correlación de Pearson de proteínas asociadas al complejo NuRD con respecto a CTCF. RBBP4: $R=0.462$, $P < 0.05$. GATAD2A: $R=0.327$, $P < 0.05$. GATAD2B: $R=0.317$, $P < 0.05$. HDAC2: $R=0.339$, $P < 0.05$.

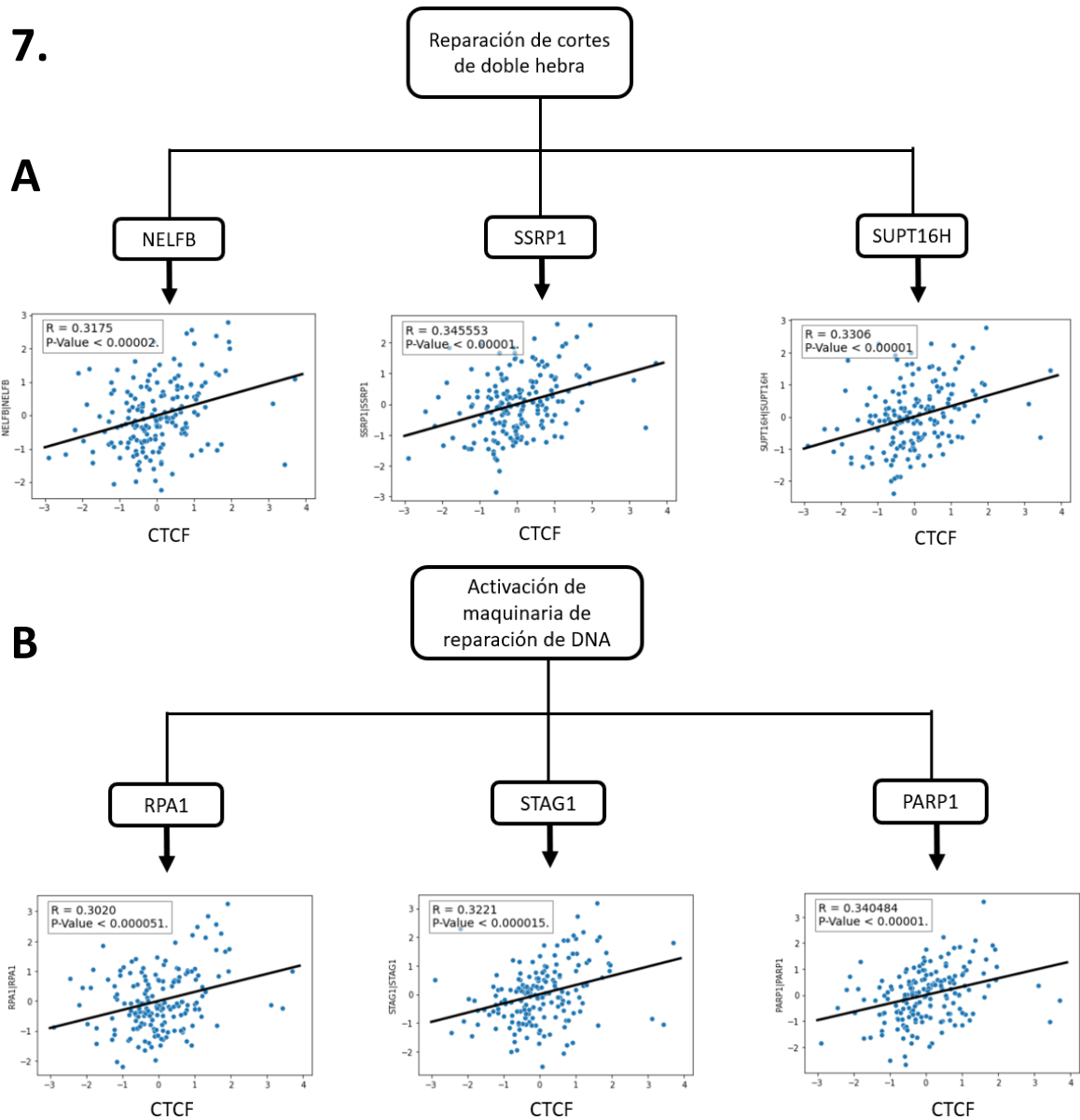


Figura 6. Las vías de reparación del genoma están correlacionadas de manera positiva con CTCF.

En la figura se muestra los gráficos de correlación de Pearson de las proteínas asociadas a las vías de reparación del genoma con respecto a CTCF A) Reparación de cortes de doble hebra.

NELFB: R= 0.317, P < 0.05, SSRP1: R= 0.345, P < 0.05, SUPT16H: R= 0.331, P < 0.05. B) Activación de maquinaria de reparación de DNA. RPA1: R= 0.302, P < 0.05. STAG1: R= 0.322, P < 0.05. PARP1: R= 0.340, P < 0.05.

Considerando la correlación positiva entre el nivel de CTCF y la inestabilidad genómica nuclear, el rol de CTCF en la mantención de la integridad nuclear y que la formación de MN se debe a la desestabilización de la integridad genómica es que se evaluó de forma preliminar la presencia de CTCF en exosomas secretados por líneas celulares de cáncer de ovario, para lo cual se utilizó la línea celular de cáncer de ovario A2780 proveniente de un tumor primario.

4.1.6 Resultados preliminares muestran la presencia de CTCF en exosomas secretados por células de cáncer de ovario A2780.

8.

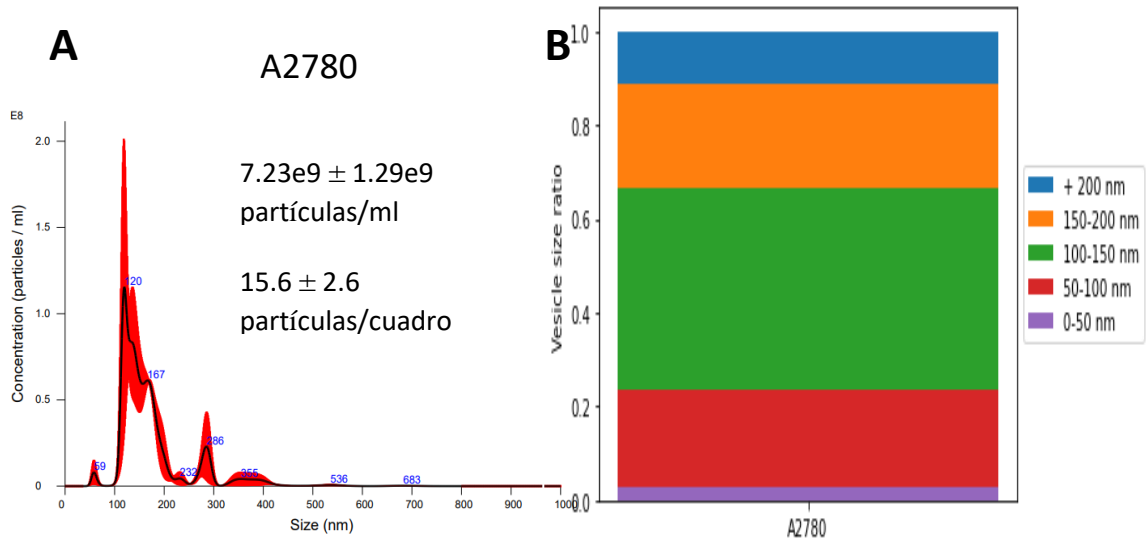


Figura 8: Evaluación de la concentración y distribución de tamaños de exosomas.

Se muestra la concentración y tamaño de exosomas secretados por la línea celular A2780. Para calcular concentración y tamaño, las muestras fueron diluidas 1/40 en PBS y se obtuvieron 3 videos de 30 segundos. A) Histograma de concentración por tamaños de exosomas secretados por la línea celular HOSE. Concentración: $2.36 \times 10^{10} \pm 5.36 \times 10^8$ partículas/ml, 47.6 ± 0.4 partículas/cuadro. B) Razón de tamaños de exosomas secretados por la línea celular A2780.

En la **figura 8**, se muestra el resultado del análisis de tamaño y concentración de exosomas secretados por la línea celular A2780 usando el equipo Nanosight, en donde se observa que la purificación posee picos de concentración de vesículas cercanos a los 100 nm.

Para poder desglosar de manera más detallada los resultados obtenidos del análisis de tamaño y concentración de exosomas secretados, se presenta un gráfico de columnas apiladas (*stacked-bar chart*) que indica la razón de tamaños de exosomas (**figura 8B**). Según la literatura, los exosomas poseen un rango de tamaño entre los 50 y 200 nm, así, en ambos gráficos los colores rojo, verde y amarillo corresponden al tamaño de exosomas lo que indica que en la purificación al menos el 80% de las vesículas extracelulares por tamaño corresponderían a exosomas.

En la **figura 9** se presenta una imagen por microscopía electrónica de la purificación de exosomas. Se indican los exosomas con flechas amarillas en donde se puede apreciar la forma de copa. Esta estructura en realidad corresponde a un artefacto clásico de exosomas generado por la deshidratación de la muestra al ser preparada. Con este resultado se sugiere que la purificación es adecuada y mantiene la integridad de los exosomas.

9.

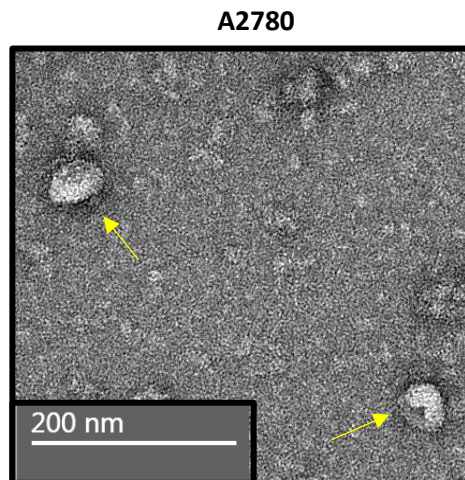


Figura 9. Microscopía electrónica de exosomas A2780.

Imágenes de exosomas secretados por la línea celular A2780, estas fueron obtenidas por el microscopio electrónico de transmisión TALOS de la facultad de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. (57.000X). En amarillo se indican los exosomas

En la **figura 10** se observa la detección de marcadores moleculares de exosomas como son el TSG101, proteína asociada al complejo de clasificación endosomal 1 (ESCRT-1) requerido para la formación de endosomas multivesiculares (precursor

de exosomas), y CD63, proteína asociada a la secreción de exosomas, tanto en los extractos celulares como en las exosomas purificadas de ambas líneas celulares.

10.

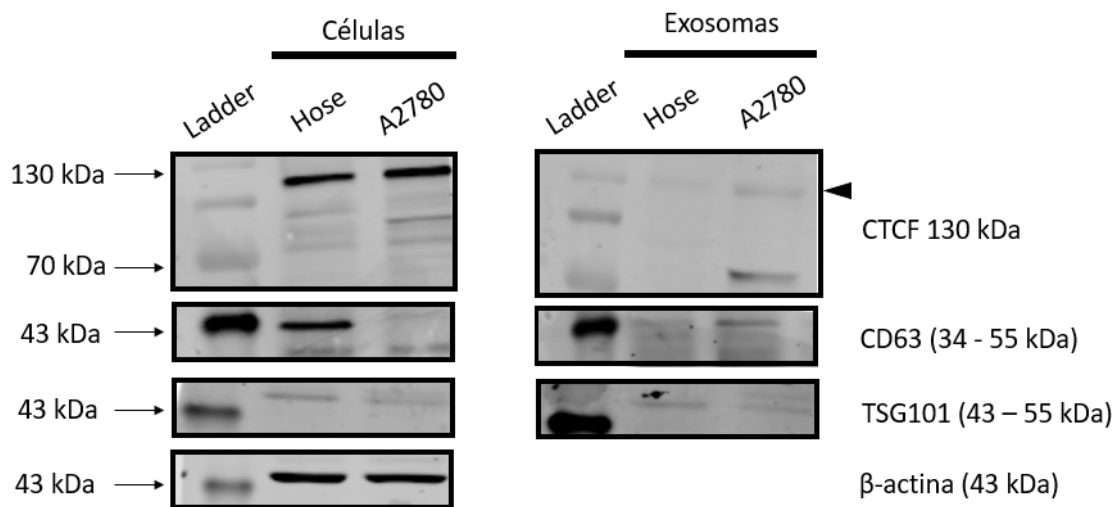


Figura 10: CTCF está presente en exosomas de células HOSE y A2780.

Se realizó un western blot en gradiente del 5-15% de 20 µg de proteínas de extracto celular y de exosomas secretados de las líneas celulares HOSE y A2780. En ambas se evalúa la presencia de las proteínas CTCF, CD63, TSG101 y en el caso de los extractos celulares β-actina. A) Western blot de proteínas provenientes de extractos celulares de las líneas HOSE y A2780. B) Western blot de proteínas provenientes de exosomas secretados por las líneas celulares HOSE y A2780. (Ladder = patrón de peso molecular) n = 1.

Dicho todo lo anterior, al integrar los resultados de las figuras 8, 9, y 10, concluimos que los exosomas purificados de ambas líneas celulares corresponden a una fracción de micro vesículas extracelulares enriquecidas en exosomas ya que al menos el 80% de estas poseen el tamaño correspondiente a exosomas (**Figura 8**), mantienen de forma íntegra su estructura (**Figura 9**) y se detectan marcadores de exosomas (**Figura 10**).

Por otra parte, en la **figura 10** al comparar la detección de CTCF entre ambas líneas celulares, no se observa diferencia entre ambos extractos celulares, sin embargo, se aprecia una mayor detección de CTCF en exosomas secretados por células cancerígenas de ovario A2780 que en exosomas secretados por células epiteliales de ovario HOSE.

Cabe destacar que este resultado sugiere que hay una mayor detección de la banda de 70kDa de CTCF (**CTCF-70**) que de la banda de 130 kDa en los exosomas secretados por células A2780, pese a que se observa una mayor detección de la banda de 130 kDa que la de CTCF-70 en los extractos celulares.

4.2 Resultados Objetivo N°2

Objetivo N°2: Estudiar en modelos *in silico* las posibles proteínas o RNAs que puedan estar presentes en exosomas secretados por células tumorales de cáncer de ovario debido a la presencia de CTCF y que puedan tener

alguna contribución en los cambios sobre las capacidades tumorigénicas afectadas.

En la **figura 2** se muestra el flujo de trabajo realizado.

4.2.1 Selección de pacientes y normalización de datos de RNAs.

Se analizó la expresión proteica de CTCF en los tumores primarios de los pacientes (**Figura 11**) y de estos se seleccionarán aquellos que tengan al menos el doble de la expresión promedio de CTCF (z-score > 1).

En estos pacientes se analizó la expresión de RNAs que se unen físicamente a CTCF según el ensayo *PAR-CLIP* realizado en la investigación de Ricardo SM, et al. 2021 [50]. Para realizar esto, se descargó la librería de secuenciación de RNAs que posee información del largo y de lecturas cuantificadas para cada RNA.

Para normalizar estos datos, se calculó el valor de transcritos por millón (TPM) según la siguiente formula:

$$TPM = \frac{(Lecturas \div Largo \text{ del RNA (Kb)})}{(Lecturas \text{ totales} \div 1.000.000)}$$

El TPM permite calcular la cantidad de lecturas normalizadas por el largo de cada RNAs cada 1 millón de lecturas totales. Mediante este valor jerarquizamos los datos para saber cuáles RNAs son los que más se unieron a CTCF.

11.

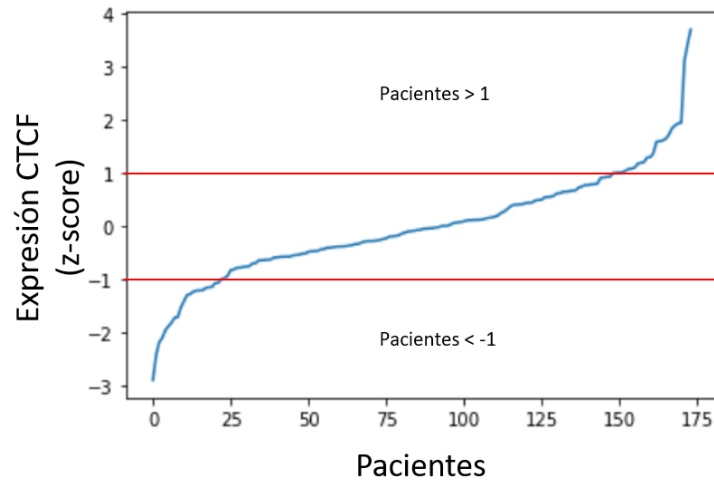


Figura 11. Selección de pacientes con mayor expresión proteica CTCF en tumor primario.

Se muestran todos los pacientes con información acerca de la expresión proteica de CTCF en su tumor primario, de estos se seleccionan aquellos pacientes que tengan al menos el doble de la expresión promedio de CTCF ($z\text{-score} > 1$).

A modo de ejemplo se muestra en la **figura 12**, la mediana de la expresión de los RNAs largos no codificantes (LncRNAs) en pacientes con mayor y menor expresión proteica de CTCF en los tumores primarios, según su estadio. ($z\text{-score} < -1$ y > 1). Se puede observar que existen varios LncRNAs que tienen una correlación positiva con la expresión tumoral proteica de CTCF, como son MALAT1, NEAT1, FAM225A, FAM225B, etc. Sin embargo, también se aprecia un LncRNA con correlación negativa como es el caso del FAM157B.

4.2.2 CTCF podría incorporar LncRNAs y mRNAs a exosomas secretados por células de cáncer de ovario.

Para abordar la pregunta de si CTCF podría tener un rol de incorporación de LncRNAs y mRNAs. Se filtro y seleccionaron aquellos RNAs que tengan la mayor probabilidad de estar presentes en exosomas debido a la presencia de CTCF. Se procedió a calcular un SCORE que se define según la siguiente formula:

$$SCORE = \text{mediana de expresion RNA} \times TPM$$

Únicamente en aquellos pacientes con mayor expresión proteica de CTCF en sus tumores primarios, se calculó el SCORE multiplicando la mediana de la expresión del RNA por estadio con el valor del TPM obtenido. En otras palabras, se obtuvo un SCORE para etapas medianas (Mid Stage) y uno para etapas tardías (Late Stage) para cada RNA.

Una vez realizado esto, se filtraron todos los RNAs que obtuvieron un valor menor a los 480. Este valor fue seleccionado ya que MALAT1 tuvo un valor de 488 para etapas tardías y adicionalmente este ya ha sido descrito como cargo de exosomas en múltiples canceres [51, 52, 53].

Cabe destacar que únicamente los RNAs que pasaron este filtro son de naturaleza mRNAs y LncRNAs.

Finalmente, de los RNAs que pasaron el filtro SCORE se seleccionaron aquellos que tienen capacidades promotoras de tumores o de metástasis (**Figura 13**).

En la **figura 13**, se muestran los RNAs seleccionados con mayor probabilidad de estar presentes en exosomas debido a la presencia de CTCF según el estadio de pacientes con cáncer de ovario. Cabe destacar que tanto MALAT1, NEAT1 han sido descritos como cargo de exosomas [51, 60] al igual que PLEC, CPNE1, PNN, HGS y ADRM1, sin embargo, estos últimos están descritos como cargo proteico y no como mRNA. [61].

En el caso de las proteínas, se analizó cuales proteínas son capaces de interactuar con el dominio N-Terminal de CTCF [49], debido a que es la fracción preponderante de CTCF en los exosomas secretados por las células tumorales no metastásicas A2780 (**Figura 10**).

De estas proteínas únicamente PARP1 e YY1 han sido descritas previamente como promotoras de varios canceres [62, 63], por esta razón se analizó la expresión proteica de estas proteínas en los tumores primarios de pacientes con mayor expresión de CTCF (**Figura 14**).

Como se puede observar en la **figura 14**, los resultados muestran la correlación positiva entre las proteínas estudiadas con la expresión de CTCF en los tumores primarios de pacientes clasificados en estadios tardíos (Late Stage) sin embargo,

no es posible analizar el caso de los estadios intermedios por el bajo número de pacientes.

12.

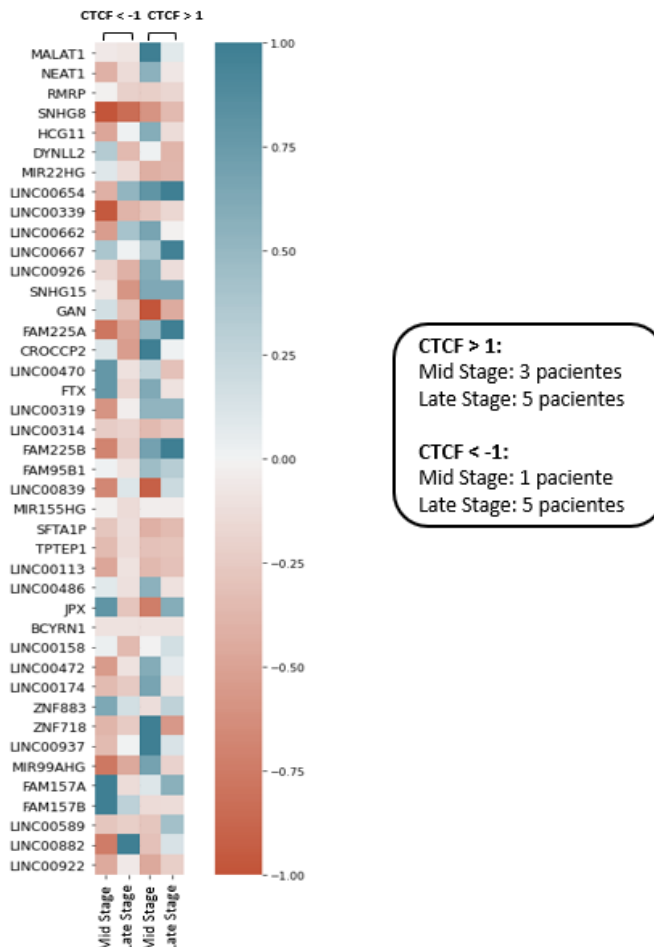


Figura 12. Expresión de lncRNAs que se unen físicamente a CTCF según estadio y expresión proteica de CTCF en el tumor primario en pacientes con cáncer de ovario.

Correlación en *heatmap* de la expresión de los lncRNAs que se unen físicamente a CTCF. Las dos primeras columnas de izquierda a derecha corresponden a los pacientes que tienen una menor expresión proteica de CTCF en el tumor primario (z -score < -1), las dos siguientes a los pacientes con mayor expresión proteica de CTCF en el tumor primario (z -score > 1). A su vez la columna 1 y 3 de izquierda a derecha, corresponden a pacientes catalogados en etapas medianas (Mid

Stage) y el resto a etapas tardías (Late Stage). Las filas corresponden a la mediana de la expresión de cada LncRNAs. Además, se adjunta la cantidad de pacientes por estadio según la expresión proteica de CTCF.

13.

A

LncRNAs	SCORE para etapas medianas (Mid Stage SCORE)
MALAT1	6077.73
NEAT1	739.24

LncRNAs	SCORE para etapas tardías (Late Stage SCORE)
MALAT1	488.55

B

mRNAs	SCORE para etapas medianas (Mid Stage SCORE)
PLEC	1262.22
CPNE1	1140.24
PNN	1112.26
HGS	767.33
UQCC1	567.47

mRNAs	SCORE para etapas tardías (Late Stage SCORE)
ADRM1	567.46
PLEC	512.34

Figura 13. RNAs seleccionados por estadio con mayor probabilidad de estar presentes en exosomas debido a la presencia de CTCF.

A) Se muestra los LncRNAs seleccionados con mayor probabilidad de estar en exosomas por estadio, en el cuadro superior aquellos seleccionados en estadios medianos, y en el cuadro inferior aquellos seleccionados en estadios tardíos. B) Se muestran los mRNAs seleccionados con la mayor probabilidad de estar en exosomas por estadio. En el cuadro superior aquellos seleccionados para etapas medianas, y en el cuadro inferior para etapas tardías.

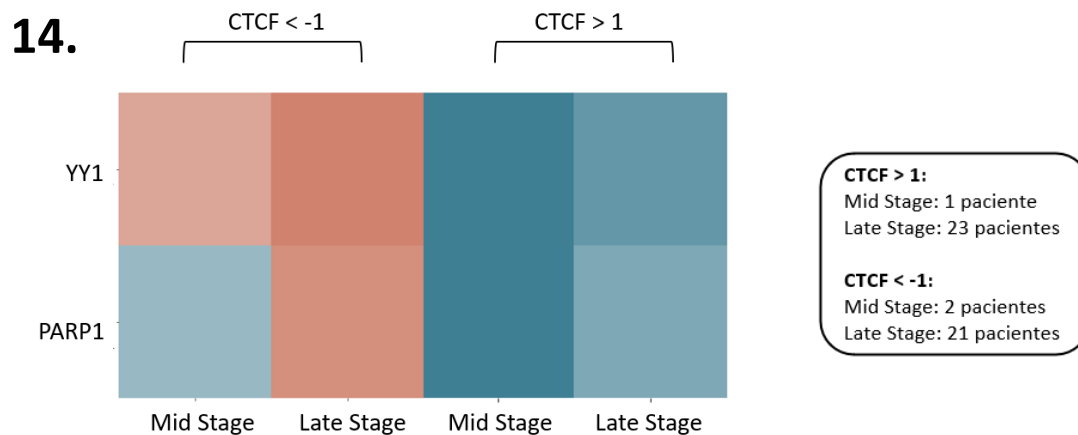


Figura 14. Expresión proteica de YY1 y PARP1 según estadio y expresión proteica de CTCF en el tumor primario de pacientes con cáncer de ovario.

Correlación en *heatmap* de la expresión de los YY1 y PARP1. Las dos primeras columnas de izquierda a derecha corresponden a los pacientes que tienen una menor expresión proteica de CTCF en el tumor primario (z-score < -1), las dos siguientes a los pacientes con mayor expresión proteica de CTCF en el tumor primario (z-score > 1). A su vez la columna 1 y 3 de izquierda a derecha, corresponden a pacientes catalogados en etapas intermedias (Mid Stage) y el resto a etapas tardías (Late Stage). Las filas corresponden a la mediana de la expresión de cada proteína. Además, se adjunta la cantidad de pacientes por estadio según la expresión proteica de CTCF.

4.3 Recapitulación de los resultados principales

Hay una correlación positiva entre la expresión de CTCF en tumores de cáncer de ovario con la detección del complejo NuRD y con proteínas asociadas a la reparación de cortes de doble hebra y activación de la maquinaria de reparación del genoma (Figura 6 y 7 respectivamente).

Se detectó la presencia de CTCF en exosomas en células epiteliales inmortalizadas de ovario HOSE y de cáncer de ovario A2780. Hay mayor detección de CTCF en las células A2780 que en HOSE.

De las 10 biomoléculas capaces de interactuar físicamente con CTCF, 9 han sido previamente descritas como cargo de exosomas. De este modo, estos resultados abren la posibilidad de que su presencia en exosomas pueda ser dependiente de la presencia de CTCF.

5.DISCUSION

5.1 Cáncer de ovario, inestabilidad genómica, formación de micronúcleos.

El cáncer de ovario seroso de alto grado se destaca por la alta prevalencia de mutaciones en el genoma. Entre las mutaciones presentes en este cáncer se destacan las amplificaciones genéticas, las cuales se manifiestan por errores en la maquinaria de reparación de cortes de doble hebra [68-69]. Justamente la mutación en el gen BRCA1/BRCA2, una de las causas más comunes de la generación de cáncer de mama y ovario, permite la formación de amplificaciones genéticas debido al rol activo de este gen en la reparación en los cortes de doble hebra [74]. Esto implica que disminuya considerablemente la estabilidad genómica de las células afectadas gatillando la desregulación de múltiples genes como también la segregación anómala de cromosomas. Es por esto que la formación de micronúcleos, cuya causa se debe a la segregación anómala de cromosomas debido a cortes de doble hebra en el genoma, lo cual es frecuente en el cáncer de ovario [71-73]. Cabe mencionar que la formación de micronúcleos también se ha visto en tumores de pacientes con quimioterapia [75].

5.2 CTCF es necesario para la regulación de la expresión genómica y para mantener la integridad de la arquitectura nuclear y genómica.

CTCF es un factor transcripcional necesario para la regulación de la expresión genómica como también para la mantención de la integridad de la arquitectura nuclear y genómica. Este factor es capaz de unirse a más de 20.000 sitios en el genoma humano, regular la transcripción mediante la promoción o inhibición directa de promotores y fomentar o desincentivar la comunicación entre secuencias regulatorias de genes al formar los *loops* [31-35]. Sumado a esto, el factor transcripcional CTCF se encuentra sobre expresado en el cáncer de ovario [48]. **Por estas razones, estudiar las proteínas susceptibles al nivel proteico de CTCF y a que vías ontológicas pertenecen, podría ser útil para verificar si la desregulación de CTCF podría indicar o desencadenar inestabilidad genómica nuclear al promover o inhibir ciertas proteínas.**

Para abordar esta pregunta, se utilizó la base de datos *Firehose Legacy*, la cual posee información de 617 pacientes. Una ventaja de utilizar esta base de datos es que 587 de los pacientes no recibieron quimioterapia previamente a la biopsia de sus tumores, por lo que el estudio de la correlación entre CTCF y la promoción de la inestabilidad genómica nuclear no se vería afectada por la quimioterapia; lo que pudiese afectar esta evaluación o relación. Sin embargo, debido a la ausencia de pacientes tratados con quimioterapia, no es posible comparar la correlación

entre CTCF y las vías promotoras de inestabilidad genómica entre pacientes con y sin tratamiento quimioterapéutico, es decir, la comparación entre contextos con y sin inestabilidad genómica inducida por fármacos, lo que sería interesante investigar en trabajos futuros.

5.3 CTCF no se correlaciona con el avance de la enfermedad de cáncer de ovario.

Al estudiar la correlación entre en i) nivel de CTCF en tumores primarios de pacientes, ii) las proteínas con mayor correlación con el nivel proteico de CTCF y iii) el estadio de la enfermedad en pacientes, se observó que no existe correlación entre el nivel proteico de CTCF en el tumor primario con el avance de la enfermedad (**figura 5**), fenómeno ya demostrado por Lintao Zhao, et al (2017) [48].

Cabe mencionar que, con el método de clusterización de proteínas, se logro encontrar 9 clústeres diferentes, esto significa que el nivel proteico de las proteínas pertenecientes a cada clúster se comportan de manera similar, lo que podría indicar que estas proteínas pertenecen a una vía particular o su expresión es regulada por los mismos agentes. Por esta razón se decidió estudiar las vías ontológicas de cada clúster para observar la veracidad de este fenómeno y con el

fin de seleccionar aquellas proteínas pertenecientes a alguna vía que pudiera promover la inestabilidad genómica nuclear.

Adicionalmente, el método de clusterización de pacientes logró generar aproximadamente 10 clúster diferentes. Como se puede observar en la figura 5, existen clúster de pacientes con un nivel alto de CTCF como otros con nivel bajo de CTCF y se aprecia la alta dependencia del nivel de las proteínas seleccionadas con el nivel de CTCF. Este fenómeno sería interesante de estudiar en trabajos futuros ya que podría ser una buena fuente de comparación entre pacientes con niveles diferentes de CTCF, para observar la dependencia del nivel de esta proteína con el fenómeno de inestabilidad nuclear. El estudio del estado mutacional de cada clúster podría indicar una correlación positiva entre el nivel de CTCF y la cantidad de mutaciones por paciente.

5.4 El complejo NuRD se correlaciona de manera positiva con CTCF, siendo una vía indirecta de promoción de la inestabilidad genómica.

Al estudiar las vías ontológicas pertenecientes a cada clúster, se observaron varias vías involucradas en la regulación de la estabilidad nuclear siendo una de ellas el complejo NuRD.

Este complejo tiene un rol dual en la promoción y supresión de la tumorigénesis dependiendo del tipo y contexto celular [75]. Sin embargo, este complejo es promotor de la desacetilación de TP53 que gatilla el bloqueo de la activación

transcripcional de genes dependientes de TP53 [75], esto significa que este complejo es capaz de suprimir el arresto del ciclo celular como también la apoptosis [77]. Además, es supresor de PTEN [75] el cual es un gen supresor de tumores responsable del control de ciclo celular, crecimiento celular, reparación de cortes de doble hebra, entre otros [78].

Además, este complejo es reclutado en promotores hipermetilados del genoma para mantener su estado de metilación, fenómeno evidenciado para el gen supresor de tumores BRCA1 cuya función es la reparación de mutaciones en el genoma y la hipermetilación de su promotor inhibe su transcripción [75].

Por lo tanto, la inhibición de las proteínas TP53, PTEN como BRCA1 por parte del complejo NuRD podría promover la inestabilidad genómica nuclear al evitar la reparación correcta de mutaciones y/o cortes de doble hebra, sumando a esto la pérdida del control del ciclo celular.

Por todas estas razones la sobreexpresión de CTCF y por lo tanto la promoción del complejo NuRD podría aumentar la inestabilidad genómica nuclear, al promover una nula o incorrecta reparación de cortes de doble hebra lo que fomentaría la formación de MN (**Figura 15**).

5.5 CTCF se correlaciona positivamente con vías de reparación del genoma, como compensación de la inestabilidad genómica nuclear.

Otras vías asociadas a la mantención de la integridad genómica que son correlativas al nivel proteico de CTCF son la vía de reparación de cortes de doble hebra y la activación de la maquinaria de reparación del DNA.

Ambas vías son supresoras de tumores al promover la reparación de mutaciones o cortes del genoma [79], así su promoción podría ser indicadora de la presencia de mutaciones, cortes de doble hebra y por lo tanto de inestabilidad genómica nuclear (**Figura 15**).

5.6 La sobre expresión de CTCF podría fomentar la segregación anómala de cromosomas

Al estudiar todas las proteínas y estudiar sus vías ontológicas (*Reactome PANTHER*), la vía asociada a la unión de cohesina a los cromosomas es la que posee mayor representación (**Figura anexo 4**).

Cohesina es una proteína requerida para la formación de loops de cromatina y por consiguiente su función se asocia a la diferenciación celular como también a la regulación de la expresión génica. Otras de sus funciones es la segregación de las cromátidas hermanas en el proceso de mitosis. Sin embargo, todas estas funciones son dependientes de la presencia de CTCF [80].

Es por esto que la sobreexpresión de CTCF en pacientes con cáncer de ovario evidenciada por Lintao Zhao, et al (2017) [48], podría fomentar una segregación anómala de los cromosomas. Esto podría explicarse por el hecho que CTCF al ser un factor de transcripción el cual puede unirse a más de 20.000 sitios en el genoma humano [33], su sobreexpresión podría generar que este factor se una a secuencias genómicas con menor afinidad, gatillando la función de cohesina en segmentos cromosómicos incorrectos y por ende generando una segregación anómala de cromosomas. Este fenómeno generado por la sobre expresión de CTCF podría fomentar la formación de MN y en este mismo sentido, CTCF al poseer un rol crucial en la segregación de cromosomas, este podría estar presente en MN.

5.7 Inestabilidad genómica, micronúcleos y exosomas

Los MN son un producto de la inestabilidad genómica nuclear, generada por una segregación anómala de cromosomas. En la investigación de Yokoi A, et al 2019 [29], muestran en células de cáncer de ovario que estos MN formados son incorporados a los CMV mediante las tetraspaninas CD63. Esta investigación es la primera en demostrar el mecanismo de la incorporación de contenido nuclear en exosomas. Así, considerando que 1) la correlación positiva entre el nivel de CTCF y la inestabilidad nuclear, 2) el rol de CTCF en la mantención de la integridad nuclear y en la segregación de exosomas y 3) la generación de MN se

debe a la desestabilización de la integridad genómica, es que en esta tesis se planteó que **CTCF podría estar presente en exosomas secretados por células de cáncer de ovario.**

5.8 CTCF está presente en exosomas secretados por las células epiteliales y tumorales de ovario.

En esta tesis, para la obtención y purificación de exosomas se utilizaron las líneas celulares tumorales A2780 y epiteliales no tumorales HOSE. En la figura 8, se mostró que el 80% de las micro vesículas purificadas, provenientes de las células A2780, corresponden a exosomas usando el criterio de tamaño. Además, se puede observar que existen vesículas con un tamaño mayor a los 200 nm las cuales podrían corresponder a vesículas extracelulares de un tamaño superior a los exosomas o a micro vesículas de unidas entre sí.

Por otra parte, en la figura 9, se muestra una imagen de exosomas obtenida por microscopia electrónica, en donde se observa la forma de copa descrita para exosomas. Esta estructura es generada por la deshidratación de la muestra e indica que los exosomas purificados están íntegros.

Finalmente, en la figura 10, se observa la presencia de CTCF en exosomas secretados por las líneas celulares HOSE y A2780. Sin embargo, se observa una gran diferencia en la cantidad de CTCF detectada en los exosomas purificados de cada línea celular. Esta diferencia podría ser explicada debido a la inestabilidad nuclear inherente para cada línea celular. Esto porque, las células HOSE corresponden a una línea celular de epitelio de ovario inmortalizada no tumorigénica [81] y las células A2780 corresponden a una línea celular proveniente de un tumor primario con mutaciones en BRAF y PTEN [82].

Según estos antecedentes la inestabilidad genómica de las células A2780 es elevada y a su vez que las células HOSE, por esta razón es que se podría explicar la mayor detección de CTCF en exosomas secretados por las células A2780 que por HOSE. Sin embargo, para demostrar este fenómeno se requiere de mayor análisis experimental, como por ejemplo inducir de manera artificial mayor inestabilidad genómica en células A2780 y verificar que en los exosomas de estas células haya mayor detección de CTCF que en células *wild-type*.

Por otro lado, se puede observar que hay una mayor detección de la banda de 70kDa de CTCF (CTCF 70) que de la de 130 kDa de CTCF en los exosomas secretados por las células A2780, a pesar de que en estas mismas células se observa una mayor detección de la banda de 130 kDa que la de CTCF-70. Lo que confirma lo que se ha descrito en la literatura, como la idea de que lo que se

observa como cargo de un exosoma no siempre es reflejo de la célula que lo secreta.

Así sugerimos que las células A2780 incorporarían de manera activa esta fracción de CTCF a los exosomas. Según EM Klenova, et al. 1997, CTCF-70 corresponde a un producto truncado de CTCF que únicamente posee el dominio N-terminal cuyo posible rol es potenciar la función de factor transcripcional de CTCF completo (130kDa), según el ensayo de transactivación en células C0S6 realizado en dicha investigación [36]. Esto podría implicar que la incorporación de CTCF-70 en las EVs que secretan las células A2780 podría aumentar la capacidad de CTCF de activar sus genes blancos en las células receptoras de estas EVs.

Otra posibilidad es que este producto truncado este interactuando con proteínas o complejos proteicos posicionados en segmentos genéticos de mayor inestabilidad genómica que generen la producción de micronúcleos, y por esa razón haya mayor cantidad que la isoforma completa de CTCF en exosomas. Por lo que estudiar el posicionamiento genómico de proteínas y/o complejos que interactúen con esta versión truncada de CTCF podría indicar que fragmentos genómicos inestables son más susceptibles a la formación de micronúcleos.

5.9 CTCF podría ser el responsable de la presencia de LncRNAs, mRNAs y proteínas con capacidades promotoras de metástasis en exosomas secretados por células de cáncer de ovario

CTCF posee 3 dominios, N-terminal, dominio central y el C-terminal. Estos cumplen funciones cruciales en el funcionamiento del factor de transcripción como son la unión al DNA mediante los 11 dedos de zinc localizados en el dominio central [32], unión a diversas proteínas a lo largo de los 3 dominios que ayudan a este factor de transcripción a unirse a secuencias específicas del genoma [49], como la unión a RNAs (LncRNAs, mRNAs, miRNAs, etc.) gracias a la región RBR, por sus siglas en inglés *RNA binding región*, localizada en el dominio C-Terminal [50].

Como se puede observar en la **figura 10**, los exosomas secretados por las células A2780 contienen como cargo tanto el factor transcripcional CTCF completo (banda 130kDa) como un producto truncado que solo posee el dominio n-terminal (CTCF-70). Por lo tanto, este factor de transcripción es capaz de unir varias proteínas y RNAs y a su vez, éste se encuentra en exosomas secretados por células tumorales de ovario, por lo cual, surge la siguiente pregunta. ¿CTCF es capaz de arrastrar proteínas y RNAs al exosoma y que promuevan capacidades metastásicas en las células receptoras?

Se generan muchas posibilidades de investigar que tendrían como fin dilucidar si CTCF posee la capacidad de modular el cargo exosomal para promover capacidades tumorogénicas o metastásicas en las células receptoras de estos exosomas.

Para contestar esta pregunta se seleccionaron aquellas proteínas y RNAs que tuvieron la mayor probabilidad de interactuar con CTCF mediante el uso de la base de datos *TCGA-Firehouse Legacy* y la investigación de Ricardo SM, et al. 2021 [50]. Una vez seleccionados, estos fueron filtrados y se seleccionaron únicamente aquellos que tienen la capacidad de promover tumorogénesis/metastásis en las células.

Todos los RNAs y proteínas seleccionados están involucrados en la estimulación de procesos pro tumorogénicos/metastásicos como proliferación celular, migración, transición epitelio mesénquima, degradación de la matriz extracelular, resistencia a la quimioterapia, supervivencia de las células cancerígenas y metastásis [51 - 63].

Además, todas las biomoléculas seleccionadas exceptuando a UQCC1 han sido descritos como cargo de exosomas en varios cánceres y en algunos casos en exosomas de tejido normal [61]. Sin embargo, todos los mRNAs seleccionados no han sido descritos como cargo de exosomas, pero sí su producto proteico [61].

El caso de YY1 es bastante interesante ya que esta proteína interactúa con el dominio N-terminal de CTCF y al mismo tiempo, esta proteína ha sido descrita como cargo de exosomas [83], así como también responsable de cargar al miR-223 en exosomas secretados de macrófagos que promueven quimio resistencia en células de cáncer de ovario [84]. Cabe mencionar que esta proteína es capaz de interactuar con la tetraspanina CD63 la cual es la responsable de incorporar los micronúcleos a los cuerpos multi vesiculares [29].

Por otra parte, el LncRNA MALAT1 ha sido descrito como promotor de tumorigénesis y metástasis en varios cánceres. Se ha publicado que está involucrado en la regulación de la transcripción, *splicing* alternativo, inhibición de TP53, que tiene rol de esponja de miRs como el miR-125 y miR-145, entre otras funciones. Además, este es capaz de unirse a segmentos genómicos del DNA específicamente en sitios de unión de CTCF y su función es dependiente de la configuración arquitectónica 3D de la cromatina, por lo tanto, su función depende de CTCF [85]. Es importante destacar que el miR-145 disminuye durante la progresión del cáncer de ovario epitelial y que la sobre expresión de este en células de cáncer de ovario A2780 y otras, disminuye la proliferación, migración e invasión de estas células [86].

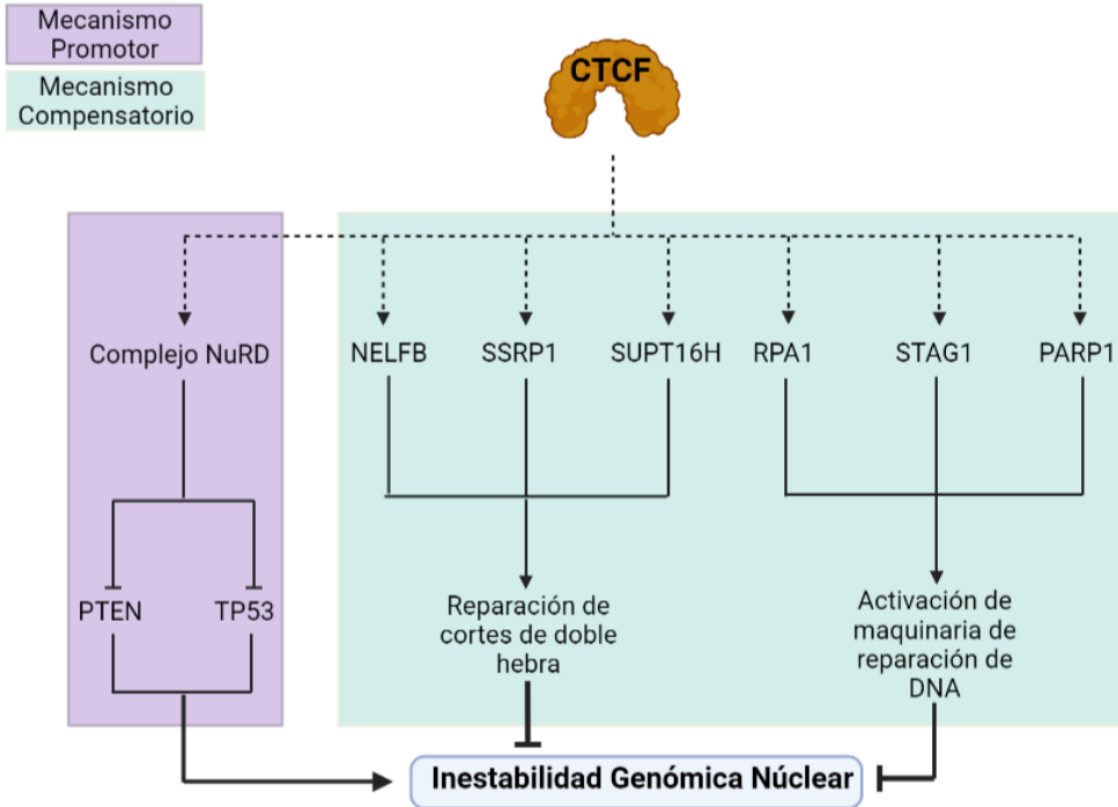


Figura 15. CTCF se correlaciona positivamente con el complejo NuRD y mecanismos de reparación de DNA.

En la figura se muestra todas las proteínas correlacionadas de manera positiva con CTCF. El complejo NuRD inhibe directamente a PTEN como a TP53 aumentando la generación de mutaciones y por lo tanto promoviendo la inestabilidad genómica nuclear. Por otro lado, las vías de la activación de la maquinaria de reparación de DNA y de cortes de doble hebra aumentarían de forma compensatoria.

5.10 Conclusión

Los resultados de esta investigación muestran que la sobre expresión de CTCF esta correlacionada positivamente con la inestabilidad genómica nuclear ya que cuando aumentan los niveles de CTCF, aumentan los niveles del complejo NuRD y de la maquinaria de reparación del DNA en los tumores primarios de pacientes con cáncer de ovario de la base de datos TCGA Firehose Legacy.

El aumento de la inestabilidad genómica promovería la producción de micronúcleos, los cuales mediante la tetraspanina CD63 son incorporados a la maquinaria de biogénesis de exosomas. Interesantemente, en este trabajo se muestra que CTCF está presente en exosomas. No solamente detectamos la presencia de CTCF en exosomas secretados por células de cáncer de ovario A2780, sino que también en células epiteliales de ovario no tumorales HOSE; sin embargo, detectamos mayor presencia de CTCF en exosomas secretados por células A2780 que HOSE. Las células A2780 son más inestable genómicamente que las células HOSE, lo que sugiere que CTCF podría tener un rol activo en la generación de los micronúcleos.

Una vez detectada la presencia de CTCF en exosomas secretados por células A2780, se evaluaron *in silico* tanto las proteínas como los RNAs que interactúan con CTCF, para primero verificar si estas biomoléculas han sido descritas como

cargo de exosomas y segundo, evaluar si estas poseen la capacidad de promover tumorigénesis o metástasis.

Mediante el uso de técnicas bioinformáticas, mostramos que 9 de 10 de las biomoléculas que pasaron los filtros, han sido descritas estar presentes en exosomas como también promotores de varios mecanismos tumorigénicos y/o metastásicos.

Nuestros resultados sugieren que es posible que CTCF y su interactoma formaría parte del cargo de los micronúcleos y finalmente sería destinado a los exosomas. Así, la desregulación de CTCF podría estar involucrada en la promoción o aumento del cargo nuclear y de la destinación de agentes protumorales/metastásicos en vesículas extracelulares del tipo exosomas en el cáncer de ovario.

6. ACTIVIDADES

6.1 Publicaciones durante el periodo de tesis

"Preparation of electrospun fiber mesh of poly (acrylic acid-co-4-styrene sulfonate) copolymers. Potential drug-eluting scaffold to delivery chemotherapeutic medication using clonogenic assays in tumorigenic gastric and breast cancer cells.". Andrónico Neira-Carrillo, Ignacio A. Zárate, N. Butto, L. Lobos-González, Matias Del Campo-Smith, Daniel A. Palacio, Bruno F. Urbano. En Revision.

6.2 Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas

"Studying the implication of the presence of master waiver of the genome in extracellular vesicles secreted by the ovarian tumor cell line A2780 when received by normal epithelial ovarian cells". **Matías del Campo-Smith**, Eduardo Duran, Sebastián Urrejola, Carmen Romero Osses, Lorena Lobos-González. SBBM XLIV ANNUAL MEETING, 26 de octubre 2021.



7. ANEXOS

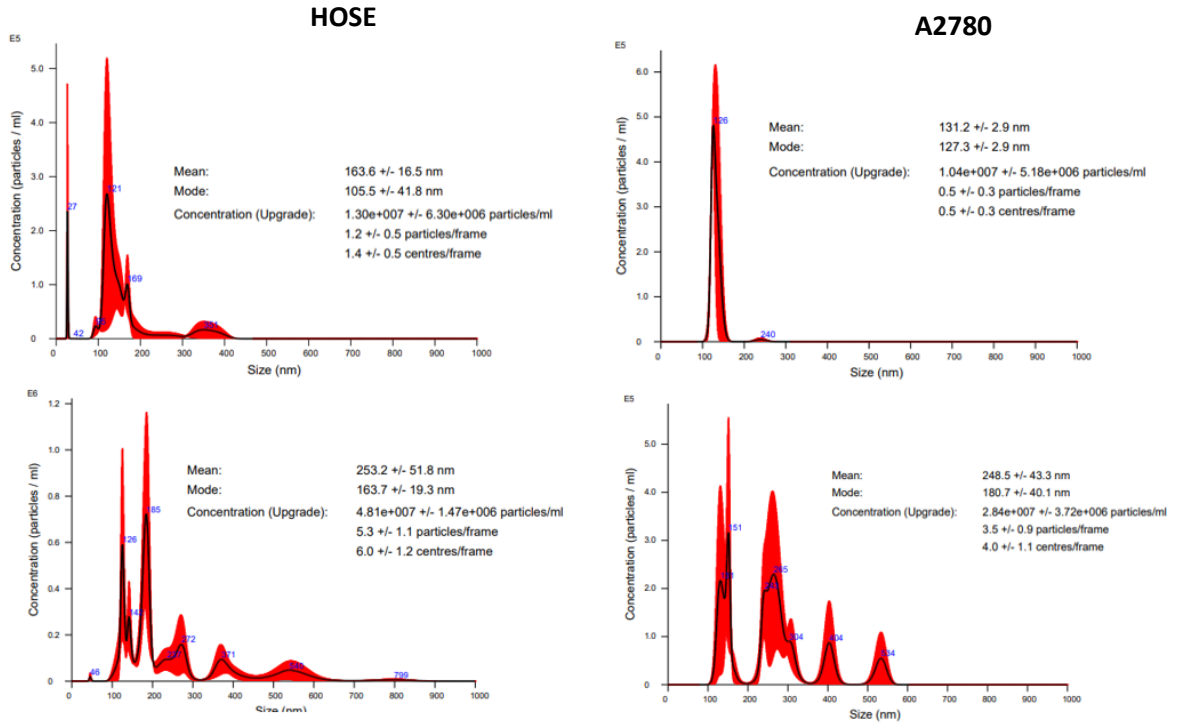


Figura anexo 1. Análisis de tamaño y concentración de exosomas secretados por células A2780 y HOSE purificados mediante ultra centrifugación.

Se muestra en la figura el análisis de tamaño y concentración de exosomas de A2780 y HOSE purificadas mediante ultra centrifugación. Ninguna de las cuatro purificaciones tiene la cantidad mínima de exosomas requerida para realizar un análisis de tamaño y concentración que es al menos 10 partículas por cuadro.

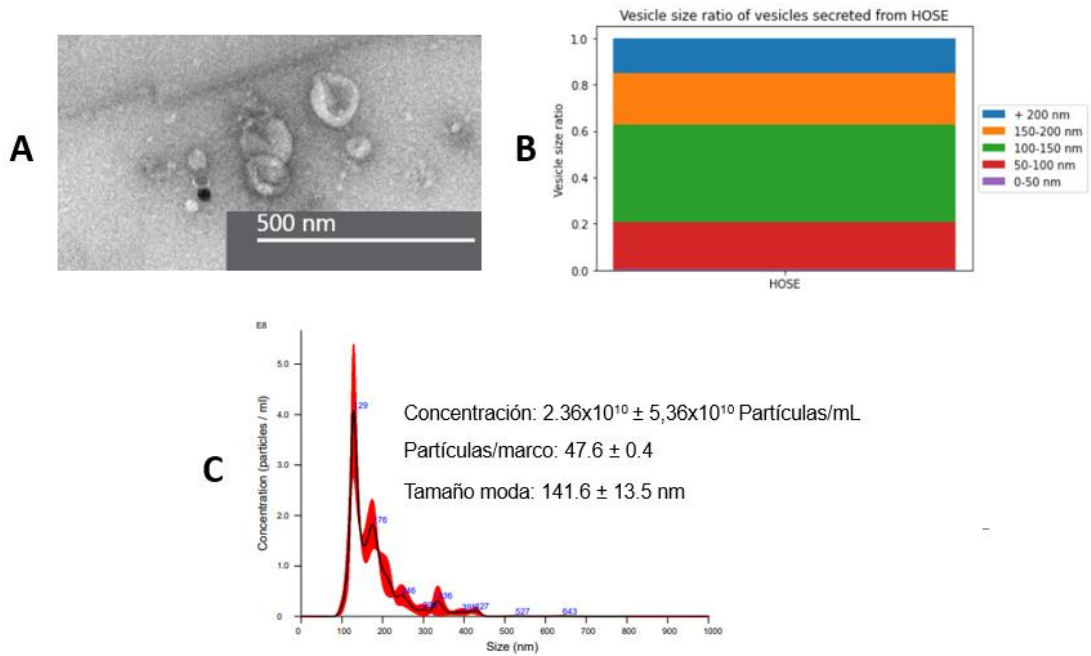


Figura anexo 2. Análisis de tamaño, concentración y microscopía electrónica de exosomas secretados por células HOSE.

A) Imagen de exosomas obtenida mediante microscopía electrónica TALOS. B) Razón de tamaños de exosomas secretados por células HOSE. B) Perfil de tamaño vs concentración de exosomas secretados por células HOSE.

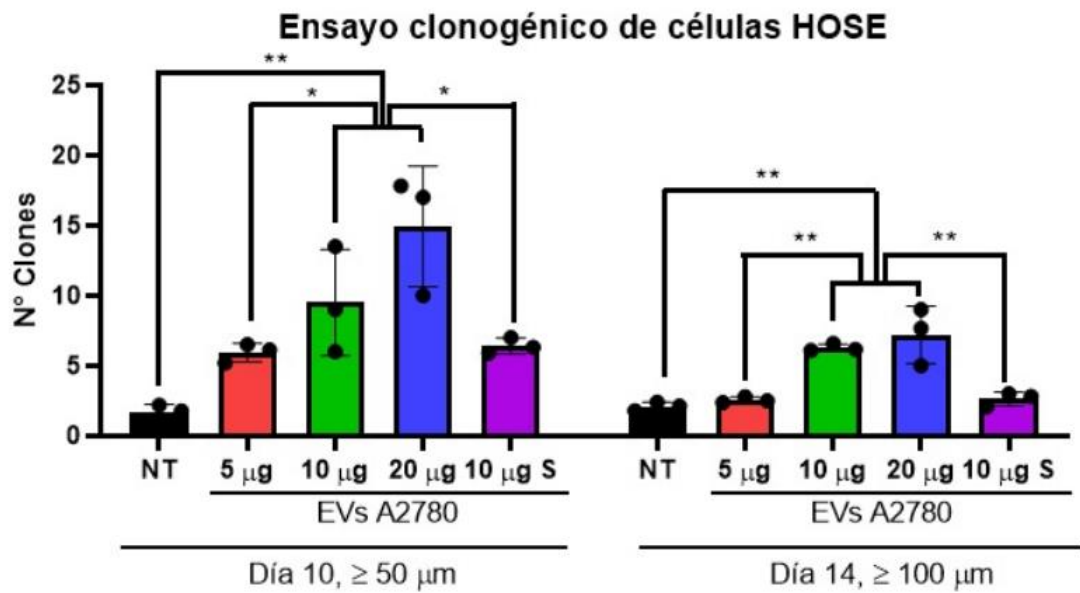


Figura anexo 3: Análisis del número de clones HOSE al ser estimulados con exosomas A2780.

Para el ensayo clonogénico, en placa de cultivo de 12 pocillos se agrega una capa de agarosa al 2%, luego se agregan 7500 células HOSE re suspendidas en una mezcla de medio de cultivo RPMI + agarosa. Se agregan los siguientes estímulos; 5 μg , 10 μg y 20 μg de exosomas A2780 y 10 μg de exosomas de A2780 previamente sonicados por 10 minutos en un baño termostático a 37°C (10 μg S) y como control de comparación NT = no tratado. Al día 10 y 14 se toman fotografías y se cuentan los clones; al día 10 se cuantifican los clones sobre 50 μm de diámetro y al día 14 sobre los 100 μm de diámetro. A) Panel de fotos de clones al día 10 y 14 según estímulo. (Aumento 10X). B) Grafico de numero de clones según estímulo y día. Experimento realizado en duplicado, n = 3.

	Reactome pathways	Client Text Box Input (fold Enrichment)	Client Text Box Input (raw P-value)
0	Cohesin Loading onto Chromatin (R-HSA-2470946)	56.15	9.560000e-09
1	Establishment of Sister Chromatid Cohesion (R-...	51.05	1.460000e-08
2	Mitotic Telophase/Cytokinesis (R-HSA-68884)	43.19	3.160000e-08
3	PTK6 Regulates Proteins Involved in RNA Proces...	37.43	2.260000e-03
4	mRNA Splicing - Major Pathway (R-HSA-72163)	32.24	2.410000e-69
...
204	Signal Transduction (R-HSA-162582)	1.65	8.650000e-04
205	Unclassified (UNCLASSIFIED)	.58	6.060000e-10
206	Innate Immune System (R-HSA-168249)	.25	3.870000e-03
207	Signaling by GPCR (R-HSA-372790)	< 0.01	9.960000e-04
208	GPCR downstream signalling (R-HSA-388396)	< 0.01	2.220000e-03

209 rows × 8 columns

Figura anexo 4. Vías enriquecidas de las proteínas con correlación positiva con CTCF.

Se muestra en esta figura las vías ontogénicas de las proteínas con correlación positiva con CTCF (Columna: Reactome pathways). Enriquecimiento: (Columna "Client Text Box Input fold Enrichment). Y el p value correspondiente (Columna: Client Text Box Input (raw P- Value)).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ferlay J et al. (2012) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013[2016-09-09].)
- 2) Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. *F. B. Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Vol **2021**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.
- 3) Howlader N, et al. (2015) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015
- 4) Sundar, S; et al. (2015). Diagnosis of ovarian cancer, *BMJ* 351, h4443, <https://doi.org/10.1136/bmh.h4443> (2015)
- 5) Allemani C, et al (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25676887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015; 385: 977–1010
- 6) Ministerio de salud (2013). Guía clínica AUGE “Cancer de ovario epitelial”, Santiago. Minsal 2013.
- 7) Sankaranarayanan R, et al. (2006). Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the proble. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006; 20: 207-25.
- 8) McCluggage WG, et al. (2011). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*. 2011; 43: 420-32

- 9) Shih IM, et al. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based of morphological and molecular genetic análisis. *Ame J Pathol.* 2004; 164: 1511-8.
- 10) Risch HA, (1998). Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1774-96.
- 11) Casagrande JT, et al. (1979). Incessant ovulation and ovarian cancer. *Lancet*, 1979; 2: 170-3.
- 12) Riman T, et al. (2004). Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004; 83: 783-95.
- 13) Whittesmore AS, et al. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative análisis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white woman. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol.* 1992; 136: 1184-203.
- 14) Li DP, et al. (2014). Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15: 4829-37.
- 15) Jia, Y, et al. (2017). Exosome: Emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget* 2017, 8, 41717-41733.
- 16) Li, K, et al. (2019). Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis. *Int. J. Cancer* 2019, 144, 1486-1495.
- 17) Kenny, H.A, et al. (2014). Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J. Clin. Investig.* 201, 124, 4614-4628.

- 18) Johnstone RM, et al (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-20
- 19) C. Thery, et al (2002). Exosomes: composition, biogénesis and function, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 569-579.
- 20) Henne WM, et al (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell.* 2011;21(1):77-91.
- 21) Airola MV, et al (2013). Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol.* 2013;215:57-76.
- 22) Tian T, et al (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem.* 2010;111(2):488-96.
- 23) Simons M, et al (2009). Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(4):575-81.
- 24) Mathivanan S, et al (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1241-4.
- 25) Vlassov AV; et al. (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochem Biophys Acta.* 1820;7:940-8.
- 26) Vella, L.J. (2014). The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Front. Oncol.* 2014, 4, 361.
- 27) Guywein, P. et al, (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 2492-2501.

- 28) Nakamura, K. et al. (2017). Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 2017, 15, 78-92.
- 29) Yokoi A; et al, (2019). Mechanism of nuclear content loading to exosomes. *Sci Adv.* 2019; 5: eaaax8849.
- 30) Yamamoto CM; et al. (2018). Comparison of benign peritoneal fluid and ovarian cancer ascites-derived extracellular vesicles RNA biomarkers. *J Ovarian Res.* 2018; 11:20.
- 31) Filippova GN, et al (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* 1996; 16:2802-2813.
- 32) Ohlsson R, et al (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease, *TRENDS in Genetics*. Vol 17 No, 9 September 2001.
- 33) Hark AT, et al (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 2000; 405:486-89. <https://doi.org/10.1038/35013106>
- 34) Chen X, et al (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008; 133: 1106-1117.
- 35) Misteli T (2004). Spatial positioning. *Cell* 2004; 119: 153-156
- 36) Klenova EM, et al (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity for the chicken C-Myc gene, is an 11-Zn finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol.* 1993;31:7612-24. <https://doi.org/10.1128/Mcb.13.12.7612>.

- 37) Phillips JE, et al (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 2009; 137: 1194-1211
- 38) Shukla S, et al (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011;479:74-U99. <https://doi.org/10.1038/nature10442>.
- 39) Dixon J, et al (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485:376-80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.
- 40) Yu M, et al (2017). The three-dimensional organization of mammalian genomes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2017;33(33):265-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060531>.
- 41) Nora EP, et al (2017) Targeted degradation of CTCF decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization. *Cell*. 2017;169:930. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.004>.
- 42) Holwerda SJB, et al (2013). CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120369. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0369>
- 43) Merkenschlager M, et al (2016). CTCF and Cohesin in genome folding and transcriptional gene regulation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2016;17(17):17-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022339>.
- 44) Downen JM, et al (2014). Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes. *Cell*. 2014;159:374-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.030>.
- 45) Schones DE, et al (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*. 2008;132:887-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.0220>.

- 46) Yu W, et al (2004). Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat. Genet.* 36:1105-1110.
- 47) El-Kady, A., et al (2005). *Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. FEBS Letters, 579(6), 1424–1434. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.044*
- 48) Lintao Zhao, et al (2017). CTCF promotes epithelial ovarian cancer metastasis by broadly controlling the expression of metastasis-associated genes. *Oncotarget, 2017, Vol 8, (No. 37), pp: 62217-62230*
- 49) Rodrigo G, et al (2018). Developing in 3D. the role of CTCF in cell differentiation. *Development 2018 145.*
- 50) Ricardo SM, et al (2021). CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes & development 2018, 28:723-734.*
- 51) Ping Z, et al (2018). Exosome-mediated delivery of MALAT1 induces cell proliferation in breast cancer. *Onco Targets Ther. 2018; 11: 291-299.*
- 52) Jingchao X, et al (2020). Exosomal MALAT1 sponges miR-26a/26b to promote the invasion and metastasis of colorectal cancer via FUT4 enhanced fucosylation and PI3K/Akt pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 39, Article Number 54.*
- 53) Shouzhong W, et al (2020), LncRNA MALAT1 Aggravates the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer by Stimulating the Expression of COMMD8 via Targeting miR-613. *Cancer Manag Res. 2020; 12: 10735-10747.*
- 54) Liqin W, et al (2017). Long non-coding RNA MALAT1 is upregulated and involved in cell proliferation, migration and apoptosis in ovarian cancer. *Exp Ther Med. 2017 Jun;13(6):3055-3060*
- 55) Jihong An, et al (2017). LncRNA NEAT1 contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating ZEB1 expression via miR-194. *Onco Targets Ther. 2017. Nov 10;10:5377-5390.*

- 56) Michihiko N, et al (2015). Hepatocyte growth factor secreted by ovarian cancer cells stimulates peritoneal implantation via the mesothelial-mesenchymal transition of the peritoneum. *Gynecol Oncol.* 2015 Nov;139(2):345-54.
- 57) Xiang-yu M, et al (2021). Pinin promotes tumor progression via activating CREB through PI3K/AKT and ERK/MAPK pathway in prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2021 Apr 15;11(4):1286-1303.
- 58) Marlena S F, et al (2013). Amplification Target ADRM1: Role as an Oncogene and Therapeutic Target for Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 Feb 1;14(2):3094-109.
- 59) Tamsin W, et al (2021). The attributes of plakins in cancer and disease: perspectives on ovarian cancer progression, chemoresistance and recurrence. *Cell Communication and Signaling* 19, Article number: 55 (2021)
- 60) Hanbin C, et al (2020). LncRNA-NEAT1 from the competing endogenous RNA network promotes cardioprotective efficacy of mesenchymal stem cell-derived exosomes induced by macrophage migration inhibitory factor via the miR-142-3p/FOXO1 signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy* 11, Article number: 31 (2020).
- 61) Keerthikumar, S., et al (2015). ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of Molecular Biology.* 2015.
- 62) Wenmeng W, et al (2017). YY1 is an inducer of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2017. P 1-11.
- 63) Matthew J, et al (2014). Transcriptional Roles of PARP1 in cancer. *American Association for Cancer Research.* DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0672.
- 64) Robert S, et al (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Dev.* 2007. 21:3027-3043
- 65) Lukasz S, et al (2022). CTCF supports preferentially short lamina-associated domains. *Chromosome Res*

- 66) Vasso M, et al (2018). Cohesin and chromosome segregation. *Elsevier Sponsored Documents*
- 67) Kin-Hoe C, et al (2012). The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nature Reviews Cancer* 12, 196-209 (2012)
- 68) Kylie L, et al (2007). High-Resolution Single Nucleotide Polymorphism Array Analysis Of Epithelial Ovarian Cancer Reveals Numerous Microdeletions And Amplifications. *Clin Cancer Res* (2007) 13 (16): 4731-4739
- 69) Michael J, et al (2002). Evidence For Replicative Repair of DNA Double-Strand Breaks Leading to Oncogenic Translocation and Gene Amplification. *J Exp Med* (2002) 196 (4): 469-480
- 70) Teresa O, et al (2020). CTCF is a barrier for Totipotent-like Reprogramming. <https://doi.org/10.1101/2020.12.20.423692>
- 71) M. Fenech, et al (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 125-132, 2011.
- 72) Douglas H, et al (2011). Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell* Volume 144, issue 5. Pages 646-674
- 73) Zizhi T, et al (2018). Active DNA end processing in micronuclei of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 18, Article number: 426 (2018)
- 74) Robert T, et al (2017). BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. DOI: 10.1177/1758834017714993
- 75) G Driessens, et al (2003). Micronuclei to detect in vivo chemotherapy damage in a p53 mutated solid tumour. *British Journal of Cancer*. 89, 727-729 (2003)
- 76) Anne Y, et al (2011). Cancer Biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer*. 11, 588-596 (2011).
- 77) Yu Zhang, et al (2016). TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl Cancer Res*. (2016). Dec; 5(6): 650-663.

- 78) Daniela M, et al (2005). Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nature Medicine*. 11, 63-70 (2005)
- 79) Alessandro T, et al (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front. Genet.* 23 April 2015
- 80) Ana Losada (2014). Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature Reviews Cancer* 14, 389-393 (2014)
- 81) Sarah L, et al (1992). Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenic responses to extracellular matrix. *AM J Obstet Gynecol* 1992;167:729-35.
- 82) Silvia D, et al (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature Communications* 4, article number: 2126 (2013)
- 83) M. J. Shurtleff, et al (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife* 5, e19276 (2016).
- 84) Xiaolan Z, et al (2019). Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 38 Article Number: 81 (2019).
- 85) Gayatri A, et al (2020). MALAT1 Long Non-Coding RNA: Functional Implications. *Noncoding RNA Jun*; 6(2): 22.
- 86) C. Romero, et al (2020). Role of microrna-145 in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. Volume 30, Issue Suppl 4.