



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

FACULTAD DE MEDICINA

Papel de CTCF en la transformación celular inducida por metales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

DIEGO ADRIAN OLIVA RICO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO



MÉXICO, D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: **"Papel de CTCF en la transformación celular inducida por metales"**, que presenta el alumno **DIEGO ADRIAN OLIVA RICO** con número de cuenta **305634766**, cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Félix Recillas Targa

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg

Este trabajo fue realizado bajo la tutela del Doctor Emilio Rojas del Castillo a quien agradezco haberme abierto las puertas de su laboratorio, todo el apoyo recibido y sobre todo haber confiado en mi para la realización de este proyecto.

Gracias

ÍNDICE

☞	Resumen	4
☞	Abstract	5
☞	Introducción	6
	1. Transformación celular.....	6
	1.1 Ensayos <i>in vitro</i> para el estudio de la transformación celular.....	7
	1.2 Daño al DNA y establecimiento de mutaciones.....	8
	2. Exposición a metales.....	10
	2.1 Componentes de la mezcla de Pb-Cd-As.....	11
	2.1.1 Arsénico (As).....	11
	2.1.2 Cadmio (Cd).....	12
	2.1.3 Plomo (Pb).....	12
	3. Contexto epigenético.....	16
	3.1 Epigenética de la exposición a metales.....	18
	4. CTCF en la transformación celular.....	20
☞	Planteamiento del problema	24
☞	Hipótesis	24
☞	Objetivo	24
	Objetivos particulares.....	25
☞	Materiales y métodos	25
	Cultivo celular y tratamiento.....	25
	Modelo de transformación celular de dos fases.....	26
	Inmunofluorescencia.....	27
	Electroforesis unicelular (ensayo cometa modificado).....	27
	Modificación de DNA con bisulfito de sodio.....	29
	Diseño de oligonucleótidos.....	29
	ogg1.....	30
	p53.....	31
	Preparación de bacterias competentes.....	32
	Transformación de bacterias por choque térmico.....	33
☞	Resultados	34
	Potencial carcinogénico del Pb-Cd-As	34
	Efecto de la mezcla de Pb-Cd-As sobre CTCF.....	36
	Análisis global de metilación.....	36
	Selección de genes candidatos para el análisis local de metilación.....	37
	Análisis local de metilación con MS-PCR.....	39
	Análisis local de metilación por secuenciación.....	40
☞	Discusión	43

☞	Conclusión.....	46
☞	Perspectivas.....	46
☞	Referencias.....	48

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

☞	Tabla de abreviaturas.....	3
☞	Figura 1. Marcadores moleculares del cáncer.....	6
☞	Tabla 1. Ensayos de transformación celular <i>in vitro</i>	8
☞	Figura 2. Organización del DNA en la cromatina.....	17
☞	Figura 3. Modelos propuestos de la función de CTCF.....	21
☞	Tabla 2. Resumen de modificaciones de histonas.....	23
☞	Figura 4. Esquema de las fases del ensayo de transformación celular.....	25
☞	Figura 5. Eficiencia relativa de formación de colonias.....	34
☞	Figura 6. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales sobre la localización de CTCF.....	35
☞	Figura 7. Porcentaje de DNA en la cola del cometa.....	37
☞	Figura 8. Esquema de la región promotora de <i>ogg1</i>	38
☞	Figura 9. Esquema de la región promotora de <i>p53</i>	38
☞	Figura 10. PCR sensible a la metilación (MS-PCR) de la región promotora del gen <i>ogg1</i> murino.....	39
☞	Figura 11. PCR sensible a la metilación (MS-PCR) de la región promotora del gen <i>p53</i> murino.....	40
☞	Figura 12. Análisis del estado de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación del promotor del gen <i>ogg1</i> murino.....	41
☞	Figura 13. Análisis del estado de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación del promotor del gen <i>p53</i> murino.....	42
☞	Figura 14. Diagrama de flujo de las perspectivas del proyecto.....	47

TABLA DE ABREVIATURAS

As	Arsénico	mRNA	RNA mensajero
Ca	Calcio	MSK1	Proteína cinasa activada por mitógenos y daño
Cd	Cadmio	MS-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación
CHD8	Proteína 8 de unión al cromodominio de la helicasa de DNA	MT	Metalotioneína
Co	Cobalto	NAC	N-acetil-cisteína
CTCF	Factor de unión a CCCTC	NaOH	Hidróxido de sodio
Cu	Cobre	Ni	Niquel
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	Ogg1	8-Oxoguanina DNA glicosilasa
DMSO	Dimetil sulfóxido	OH ⁻	Hidroxilo
DNMT1	Metil-transferasa de DNA	O ₂ ⁻	Superóxido
EDTA	Ácido etilen-diamino tetra-acético	8-oxo-dg	8 -Oxo-2'-desoxiguanosina
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Pb	Plomo
ERC	Enfermedad renal crónica	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Fe	Hierro	PFA	Paraformaldehído
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	PKC	Proteína cinasa c
GABA	Ácido gamma aminobutírico	p53	Supresor tumoral p53
GSH	Glutatión	RASS F1A	Proteína 1A da la familia del dominio de unión a RAS
HAT	Acetil-transferasa de histonas	ROS	Especies reactivas de oxígeno
HDAC	Des-acetilasa de histonas	RSK2	Cinasa de la proteína ribosomal S6
Hsp	Proteína de choque térmico	SAM	S-adenosil metionina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	SET7/9	Lisina-N-metil-transferasa de histonas
ITS	Insulina-tranferrina-selenio	SHE	Embrión de hámster sirio
MKP-1	Proteína cinasa activada por mitógenos	SUV39H1	Homologo 1 del supresor de variegación 3-9
MNNG	N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina	TPA	12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato

RESUMEN

La exposición a metales se considera un grave problema de salud pública en México. Su exposición está asociada con el inicio y desarrollo de un proceso tumoral, generando alteraciones a nivel genético y epigenético. Algunos metales pueden inhibir el funcionamiento de enzimas de reparación y proteínas con estructura de dedos de zinc. El factor nuclear CTCF, es una proteína que contiene 11 dedos de zinc que al unirse al DNA evita su silenciamiento por componentes epigenéticos como la metilación del DNA, generando una cromatina local permisiva a la transcripción. CTCF se une a genes de reparación como *ogg1*, *msh2*, *mbd4*, entre otros, y antecedentes de nuestro grupo han demostrado que la exposición a As-Cd-Pb conlleva a la sub-expresión de dichos genes.

Por esta razón y debido a que los eventos tempranos en la transformación celular inducida por As-Cd-Pb aún no están completamente esclarecidos, decidimos evaluar el efecto de la exposición a As-Cd-Pb en la localización y función de CTCF, así como estudiar como es que esta mezcla de metales genera cambios en el perfil epigenético capaces de iniciar un proceso tumoral.

Los resultados indican que la transformación celular inducida por la exposición a As-Cd-Pb está asociada a cambios en el perfil de metilación del DNA, que pueden ser promovidos por alteraciones en la localización de CTCF. Estos datos permiten suponer que, en efecto, la alteración de la expresión génica durante la transformación celular inducida por metales puede deberse al silenciamiento epigenético causado por la metilación de regiones promotoras.

ABSTRACT

Environmental exposure to metal mixtures is still considered a severe public-health problem in Mexico. Exposure to the formers is associated with the onset and development of a tumorigenic process, generating genetic and epigenetic anomalies. Some metals can inhibit the catalytic activity of repair enzymes and zinc finger-containing proteins. The nuclear factor CTCF is a protein with 11 zinc fingers that counters epigenetic gene silencing by inducing a local lax, transcription-permissive chromatin upon binding to the DNA. CTCF binds to the promoters of repair genes, such as *ogg1*, *msh2* and *mbd4*, and previous unpublished work from our research group has determined that exposure to the As-Cd-Pb mixture leads to sub-expression of those genes.

For this reason and since the early events in As-Cd-Pb-induced cell transformation are not yet completely understood, we decided to evaluate the effect of the exposure to As-Cd-Pb on the localization and function of CTCF, as well as to study how this metal mixture modifies the epigenetic profile of the cell for a tumorigenic process to occur.

The results obtained point out that As-Cd-Pb-induced cell transformation is associated with variations in the DNA's methylation profile, which might be brought about by the altered localization of CTCF. This data allows us to presume that the differences in genetic expression observed during metal-induced cell transformation might be due to the epigenetic silencing induced by the methylation of promoter regions.

INTRODUCCIÓN

1. Transformación celular

El proceso de carcinogénesis implica una serie de eventos celulares y moleculares que comprometen a la célula a replicar material genético dañado y transmitir mutaciones. Se han propuesto algunos modelos para explicar el desarrollo de este fenómeno tales como el fenotipo mutador y el progenitor epigenético, sin embargo el modelo mas aceptado hasta ahora es el de pasos múltiples, mismo que postula como este fenotipo celular maligno es el resultado de la acumulación de mutaciones no-letales durante una fase temprana de la carcinogénesis, etapa conocida como de iniciación. Estas mutaciones son transmitidas a células hijas como consecuencia de una ineficiente regulación de la proliferación celular durante la siguiente fase, la promoción, lo que conlleva a la fase de progresión, donde el daño genético adicional y el acumulado, producen el fenotipo maligno (Klaunig y Kamendulis, 2004; Ohmori et al., 2004).



Fig 1. Marcadores moleculares del cáncer. En el esquema se muestran los eventos, hasta ahora identificados, que conllevan a la transformación celular. Los marcadores clave se encuentran al centro. El desequilibrio energético y la evasión del sistema inmunológico son marcadores emergentes que se han identificado en algunos cánceres. Tanto la inestabilidad genómica como la inflamación se consideran características que facilitarían la adquisición de los marcadores clave y emergentes (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2000; 2011).

El proceso de transformación ha sido estudiado a nivel molecular, con la finalidad de entender los eventos tempranos en el desarrollo tumoral, sin embargo éste se origina a causa de varias alteraciones en el funcionamiento celular. Una célula necesita adquirir ventaja funcional frente a las demás células que conforman un tejido para dar inicio al crecimiento tumoral y algunas de las características que confieren dicha ventaja son la autosuficiencia a estímulos de crecimiento así como la insensibilidad a señales que los inhiban, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis) y el potencial ilimitado de replicación, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011); sin embargo, el orden y número de alteraciones mínimas que se deben presentar para dar inicio al proceso de transformación no ha sido esclarecido, por lo que el fenómeno aún representa un objeto de estudio (Fig 1).

1.1 Ensayos *in vitro* para el estudio de la transformación celular

Con la finalidad de entender el proceso de transformación, se busca reproducir el fenómeno en condiciones controladas con ensayos *in vitro*. El objetivo primordial de éstos es estudiar la transición de un cultivo estable a un cultivo comprometido en un proceso carcinogénico, basándose para ello en marcadores morfológicos como la organización de las células y su tipo de crecimiento. Estos ensayos permiten, entre otras cosas, determinar si un xenobiótico posee propiedades ya sea de iniciador o de promotor del proceso de transformación celular (Creton et al., 2011). Para estos estudios se pueden utilizar células primarias diploides o bien células inmortalizadas haploides, algunos ejemplo de las líneas celulares usadas con esta finalidad son las *SHE* (células embrionarias de hamster), *3H10t1/2*, *Balb/c 3T3* (ambas fibroblastos de origen murino) o *Bhas 42* (células *Balb/c 3T3* transfectadas con el retrovirus v-Ha-ras) (Tabla 1). Dichos ensayos se usan para emular exposiciones de menos de 24 horas (agudas), de un mes o menos (subagudas), de uno a tres meses (subcrónicas) y/o de más de tres meses (crónicas), dependiendo del número de dosis administradas, de su concentración y del tiempo que durará el monitoreo.

Tanto la especificidad como la sensibilidad de estos ensayos han sido probadas en estudios inter-laboratorio (Kajiwara y Ajimi, 2003). En particular, el ensayo de transformación de dos fases que usa la línea celular *Balb/c 3T3* ha sido aprobado por la

Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) debido a la alta sensibilidad que tiene para detectar el efecto carcinogénico de compuestos usados a concentraciones bajas, mismo que puede pasar desapercibido al usar otros ensayos menos sensibles (Ohmori et al., 2004; Sasaki et al., 2012a) . Si bien la especificidad del ensayo para identificar compuestos de riesgo para humanos es menor a la especificidad reportada por otros ensayos, el pronóstico de falsos positivos se considera mejor, en lo que al establecimiento de medidas preventivas de salud pública respecta.

	Balb/c 3T3	SHE pH 7.0	Bhas 42	C3H10T1/2
Concordancia (%)	68	85	78	84
Sensibilidad (%)	75	92	73	72
Especificidad (%)	53	66	84	80
Falsos-positivos (%)	47	34	16	20
Falsos-negativos (%)	25	8	27	28

Tabla 1. Ensayos de transformación celular *in vitro*. Algunos de los ensayos de transformación celular más empleados y sus características (Modificado de Creton, 2011)

Sin embargo, el empleo de ensayos de transformación con líneas celulares murinas no sólo permite identificar los xenobióticos que representaran un riesgo a la salud pública, sino que también permite estudiar a nivel molecular los procesos tempranos que conllevan a la transformación de las células en cultivo. Si bien, el ensayo emula las circunstancias que favorecerán la transformación celular para su estudio, éste ha sido frecuentemente cuestionado, ya que extrapola los fenómenos observados en células de ratón a humano. Sin embargo, los estudios realizados en líneas celulares murinas y los resultados que de ellos se obtienen aportan información invaluable acerca del proceso de transformación, con la que se vislumbran los antecedentes necesarios para dar pie a la investigación en modelos humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.2 Daño al DNA y establecimiento de mutaciones

Como ya se mencionó antes, para dar inicio al proceso de transformación es necesario que se acumulen mutaciones del tipo no-letales en el material genético de las células (Fraga et al., 1990). Existen varias maneras en las que se pueden producir daño que genere mutaciones de este tipo, pero todos ellos dependerán, en última instancia, de

la actividad de la DNA polimerasa II: si el dañado es reparado antes del siguiente ciclo de replicación del DNA no se producirán transiciones, ni transversiones que alteren el marco de lectura de los genes codificados en la secuencia dañada, es decir que no se habrán establecido las mutaciones. La exposición a luz UV, la presencia elevada de radicales libres de oxígeno, el estallido respiratorio de macrófagos, así como la exposición a xenobióticos tanto genotóxicos como no-genotóxicos representan ejemplos de condiciones que propician el daño al DNA (Mena et al., 2009); los errores en la replicación, en cambio, representan un caso independiente a lo antes descrito, ya que la incorporación errónea de bases nitrogenadas establece una mutación *per se*.

Los xenobióticos no-genotóxicos, denominados así por su falta de interacción directa con la molécula de DNA, contribuyen a la generación y acumulación de daño comprometiendo los procesos enzimáticos de reparación del DNA (Ames y Gold, 1990; Ames, 1991), lo cual incrementa la tasa de mutación en las células expuestas (Fraga et al., 1990; Mass y Wang, 1997). Este es el caso de algunos metales, a cuya exposición se asocia el inicio y desarrollo de procesos tumorales. La genotoxicidad derivada de la exposición a estos xenobióticos no solo radica en la inhibición de algunos mecanismos de reparación, sino también en la inducción de estrés oxidante (Hartwig et al., 2002; Beyersmann y Hartwig, 2008). A través de la inhibición de mecanismos celulares antioxidantes de tipo enzimático, tales como la catalasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); el efecto genotóxico de la producción de ROS empero, solo se hace evidente cuando la generación de éstas abruma las defensas celulares antioxidantes (Galaris y Evangelou, 2002), efecto que se ve favorecido por la exposición a metales.

La acumulación de ROS como el hidroxilo (OH^\cdot), el superóxido (O_2^\cdot) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) también compromete la estabilidad de la membrana celular y al material genético debido a que estos agentes pueden reaccionar tanto con residuos de aminoácidos, así como con lípidos y ácidos nucleicos, produciendo lesiones características en cada una de estas moléculas: carbonilación de proteínas, lipoperoxidación y oxidación de bases, respectivamente. Dichas especies no solo generan daño oxidante, sino que también pueden des-regular la proliferación celular

debido a su función mitogénica (Beyersmann y Hartwig, 2008; Jiang et al., 2009), promoviendo la replicación de material genético dañado y con ello, el establecimiento irreversible de mutaciones.

2. Exposición a metales

Desde sus comienzos, la actividad minero-metalúrgica ha exacerbado la exposición humana a mezclas de metales que solía limitarse a casos particulares como es el caso del consumo de agua de mantos acuíferos ricos en metales provenientes de la sedimentación natural, de modo que, a pesar de que la exposición natural a metales es un fenómeno persistente, es debido a dicha industria que aumenta el potencial nocivo de estos elementos. Esto ocurre principalmente de dos maneras: modificando la disponibilidad de los metales en el ambiente (aire, agua, tierra y alimentos) y alterando la especiación o la bioquímica del elemento (Yañez, 2003; Méndez-Gómez et al., 2008). La exposición se puede presentar tanto en el personal ocupacionalmente expuesto (POE) y en los habitantes de asentamientos urbanos localizados cerca de minas o de yacimientos naturales de metales. Para el caso del POE, la contaminación ocurre principalmente por inhalación directa del metal suspendido en el aire, mientras que para las demás personas la contaminación no solo se presenta por vía respiratoria, sino por ingestión de agua y/o alimentos contaminados (Rojas et al., 1999).

Específicamente, la exposición crónica a concentraciones bajas de la mezcla de metales/metaloides plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As) aún representa un problema considerable de salud pública en México. A pesar de que los niveles de partículas suspendidas en el aire que se registran en los alrededores de las zonas mineras estén dentro de lo reglamentario según la normativa mexicana, estos niveles son superiores a los permitidos en otros países (Pérez Duarte, 1994; Wolff et al., 2010). Esto tiene como consecuencia un elevado número de personas con complicaciones de salud producidas por la exposición crónica a la mezcla de Pb-Cd-As, a las cuales no se llega a atender correctamente porque los síntomas que se presentan tras una exposición crónica a metales difieren en gran medida de la mejor conocida sintomatología por intoxicación aguda.

La problemática anterior se debe a la relación dosis-efecto. Para el caso de los metales, se entiende por dosis la concentración intracelular necesaria que ocasiona que un órgano manifieste un efecto tóxico (Klaassen y Watkins, 1999). Ahora bien, debido a que la exposición es a concentraciones bajas y de manera crónica, los efectos biológicos en personas expuestas a dicha mezcla tardan varios años en manifestarse, por esta razón se complica sobremanera el diagnóstico en pacientes sintomáticos y es únicamente a través de estudios epidemiológicos retrospectivos que se puede identificar la causa de la afección, la fuente de exposición y los elementos contaminantes.

2.1 Componentes de la mezcla de Pb-Cd-As

La toxicidad de los metales que conforman esta mezcla ha sido bien estudiada cuando se presentan de manera individual, así que se sabe que hay varios mecanismos comunes entre ellos, algunos de los cuales son la capacidad de reaccionar con tioles, la producción de estrés oxidante, la oxidación de macromoléculas, el desplazamiento de metales esenciales y la inactivación de enzimas antioxidantes o de reparación que tengan metales esenciales o grupos sulfhidrilo en su sitio activo (Hartwig et al., 2002; G. Wang y Fowler, 2008). Existen, empero, consecuencias inherentes a la exposición a cada uno de estos metales/metaloide.

2.1.1 Arsénico (As)

Este elemento presenta predilección por la piel y tiene una vida media de 10 horas. A nivel celular, altera enzimas y proteínas con grupos sulfhidrilo y compromete el flujo de electrones de la cadena respiratoria impidiendo que ésta se lleve a cabo, conduciendo a la muerte celular. Los efectos de la exposición son dosis dependientes, pero cuando la exposición crónica se prolonga durante años se vuelve más difícil establecer una relación entre la dosis absorbida y los efectos que produce en las personas expuestas (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

La exposición crónica a As produce neurotoxicidad en el sistema nervioso periférico. Ésta se origina por la desmielinización de los axones que ocasiona parestesia, sensibilidad y debilidad muscular. El As también daña al hígado produciendo ictericia y

después cirrosis. Además, este elemento induce un aumento anormal en las concentraciones de hierro (Fe) en el hígado (44%) y de cobre (Cu) en el riñón (200%) (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

Este metaloide ha sido clasificado por la IARC como integrante del Grupo 1, carcinogénico para humanos, debido a que se ha comprobado la relación causal entre la exposición a este elemento y el desarrollo de cáncer de piel y de pulmón; también se ha asociado con linfomas, leucemias, hemangiosarcoma de hígado y cánceres nasofaríngeo, de riñón y de próstata (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

2.1.2 Cadmio (Cd)

Entre el 50 y el 75% del Cd que es absorbido se aloja en los riñones y el hígado. Su aparente falta de reactividad en el riñón se debe a que forma complejos intracelulares con la metalotioneína 2 (Ramírez, 2002), prolongando su vida media hasta 30-50 años (Klaassen y Watkins, 1999; ATSDR, 2004; Casarett et al., 2008).

La exposición crónica a Cd produce hipertensión así como enfermedad renal crónica (ERC) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). También afecta el metabolismo del calcio (Ca) favoreciendo su excreción por vía urinaria, lo cual produce dolor óseo, osteomalacia y osteoporosis. El Cd induce una disminución en la concentración total de Fe en riñón (33%) femur (43%) e hígado (63%), así como una disminución del 27% de zinc (Zn) en fémur y un aumento de este último elemento en riñón (20%) (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

La IARC clasifica al Cd en el Grupo 1, ya que en algunos estudios epidemiológicos se ha visto una relación entre la exposición ocupacional a este elemento y el desarrollo de cancer de pulmón y próstata (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

2.1.3 Plomo (Pb)

Este metal se puede alojar tanto en hueso como en tejido blando (ligamentos, tendones, músculos, nervios, vasos, órganos), siendo el primer reservorio el que

prolonga la vida media del metal hasta por 20 años. El Pb es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y se aloja en la materia gris, principalmente en el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, así como en la médula (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

Las alteraciones que la exposición a Pb produce en el sistema nervioso del niño se acentúan en el sistema central, esto se debe a que el Pb compromete al circuito neuronal en desarrollo, evitando la formación de conexiones intercelulares. Este metal también perturba el flujo de neurotransmisores de los sistemas colinérgico, noradrenérgico, dopaminérgico y del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Estos efectos producen irritabilidad, pérdida parcial de la conciencia y retraso mental en los niños expuestos de manera crónica. En adultos en cambio, los efectos patológicos de la exposición a Pb se presentan en el sistema nervioso periférico y se limitan a neuronas motoras en las que ocurre una desmielinización progresiva que culmina en la degeneración axonal. Esto da lugar a la característica parálisis de los nervios radial y peroneo común, volviendo a las personas expuestas incapaces de realizar los movimientos de pronación y dorsiflexión respectivamente (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

También existen repercusiones hematológicas por la exposición crónica a Pb que conducen al individuo a un cuadro anémico a causa de la reducción de la vida media de los eritrocitos y a la alteración de la biosíntesis de grupos hemo. Y en cuanto a las nefropatías, el Pb se caracteriza por formar cuerpos de inclusión en las células de túbulo proximal, alterando su morfología y función (Klaassen y Watkins, 1999; ATSDR, 2004; Casarett et al., 2008).

El Pb está catalogado como probable carcinógeno para humanos en el grupo 2A de la IARC, porque a pesar de que hay evidencia que relaciona la exposición a Pb con el desarrollo de cáncer de pulmón y del sistema digestivo y de que se han presentado casos de adenocarcinoma renal en trabajadores con exposición prolongada, dicha evidencia no es lo suficientemente contundente (Klaassen y Watkins, 1999; Casarett et al., 2008).

Ahora bien, se sabe que cuando se presentan en forma de mezcla los elementos no se comportan de la misma manera debido al efecto de sinergia o antagonismo que

pueden ejercer entre sí, produciendo efectos diferentes a los que se observan tras una exposición individual. Es por esta razón que la exposición a la mezcla de metales/metaloide llega a tener efectos severos tanto a concentraciones elevadas como bajas (ATSDR, 2004). La manera en la que interactúan los metales que conforman la mezcla aún no está esclarecida pero se ha sugerido que algunas de las moléculas que regulan la respuesta celular a estos metales (tales como metalotioneínas (MT), proteínas de unión a plomo (PbBP), glutatión (GSH) y proteínas de choque térmico (Hsp) están involucradas en el proceso (Wang y Fowler, 2008).

La potenciación de los efectos que cada metal genera en las células se han reportado en estudios *in vitro* e *in vivo*, tanto en modelos humanos como en rata. Algunos ejemplos de lo anterior son el incremento de 20% en la carbonilación de proteínas de células expuestas a la mezcla de Pb-Cd-As, mientras que la inducción de daño oxidante al DNA, medido por la generación de 8-oxo-2'-desoxiguanosinas (8-oxo-dG), aumenta considerablemente por la exposición conjunta a los metales, en comparación a cuando la exposición es individual (Wang y Fowler, 2008).

Del mismo modo, la inducción de la respuesta celular para contrarrestar la presencia de estos metales tiene lugar a concentraciones mucho menores, siempre y cuando los metales se presenten simultáneamente. Como ejemplos está la sobre-expresión de MTs ante la exposición a Pb-As, misma que es mayor que cuando dichos elementos son administrados individualmente (Wang y Fowler, 2008), o bien los genes de las Hsp60, 70 y 90 que se sobre-expresan ante una concentración 10 veces menor de Cd y As cuando éstos se administran juntos (Madden et al., 2002; Wang y Fowler, 2008). Estos ejemplos ponen en evidencia como la sinergia que los metales pueden ejercer entre sí, potencia el efecto celular desencadenado por la exposición, pudiendo no solo estimular una mejor respuesta desintoxicante, sino también aumentar los efectos perjudiciales.

En cuanto a la transformación celular, algunos trabajos han demostrado que la mezcla de As-Cd-Pb posee mayor potencial de transformación que cuando cada uno de estos metales/metaloide se presentan de manera individual. Si bien hay reportes de la capacidad transformadora de éstos cuando se administran a dosis elevadas (Tsuchiya, 2005; Martinez-Zamudio y Ha, 2011), se observó en estudios *in vitro* que la exposición

conjunta a estos metales no solo comprometía la viabilidad celular por medio de su genotoxicidad, sino que la exposición a dosis bajas, pero biológicamente efectivas, fue capaz de transformar un cultivo celular después de un curso temporal de exposición a la mezcla de metales.

Silva-Aguilar et al. (2011) al igual que otros grupos (Tsuchiya, 2005), observaron que la carcinogenicidad de los metales es más evidente en la fase de promoción de la transformación celular, cuando las células iniciadas comienzan a proliferar. Ahora bien, los metales de la mezcla en efecto son capaces de generar estrés oxidante y comprometer la eficiente reparación de macromoléculas dañadas, pero las células son capaces de contrarrestar este desequilibrio en su estado de oxido-reducción de manera que, en ausencia de un agente promotor que favorezca la replicación celular, el potencial transformador de los metales disminuye una vez pasado el evento de exposición. Por otro lado, sus experimentos pusieron en evidencia el hecho de que la transformación observada es dependiente de las ROS inducidas por el Pb-Cd-As, ya que el co-tratamiento con el compuesto antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) atenúa considerablemente el potencial de transformación de la mezcla de metales (Silva-Aguilar et al., 2011).

Cabe mencionar que la transformación solo es impedida al eliminar el estrés oxidante durante la fase de promoción; eliminar el estrés producido por Pb-Cd-As durante la fase de iniciación no atenúa el potencial transformador del tratamiento. Por esta razón se propone que el fenómeno de transformación celular es estimulado por diferentes factores dependiendo de la fase del proceso de transformación celular, de modo que, si la presencia de ROS no es un factor desencadenante durante la iniciación, debe existir otra variable responsable de la carcinogenicidad de los metales en fases tempranas del proceso de transformación.

3. Contexto epigenético

En 1975 se publicó un modelo que apoyaba una hipótesis formulada por el biólogo Conrad Waddington: los patrones de expresión génica, y no los genes *per se*, determinan el tipo celular a través de procesos dinámicos que conducen del genotipo al fenotipo; fue para esta teoría que Waddington acuñó el término *epigenética* (Barros y Offenbacher, 2009). En este modelo se propuso que la metilación enzimática de citosinas estaba relacionada con la expresión génica y que esta marca se conservaba a través de ciclos de replicación. Es decir que cualquier alteración producida por la metilación citosina-específica sería heredable (Holliday y Pugh, 1975; Riggs, 1975). Actualmente se sabe que la regulación epigenética del genoma depende de varios fenómenos, así como de la interacción entre ellos, la mayoría de los cuales están asociados con la cromatina.

La cromatina representa la unidad estructural del genoma eucarionte y está compuesta por DNA y las proteínas que se unen a él. La unidad funcional de la cromatina es el nucleosoma, un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) al cual se enrolla el DNA (alrededor de 147 pb, (Stewart et al., 2005) para compactar al DNA entre cinco y 10 veces su volumen (Fig 2). Sin embargo la función de las histonas no se limita a la compactación del DNA, sino que su presencia hace posible la regulación de las secuencias codificantes comprendidas en los nucleosomas. Tanto la metilación del DNA como la modificación post-traducciona de las histonas representan los componentes epigenéticos más estudiados hasta ahora. Gracias a esto se ha evidenciado que la dinámica de los patrones tanto de metilación del DNA, como de acetilación, metilación y fosforilación entre otras modificaciones de histonas, tienen una fuerte correlación con el crecimiento y la diferenciación celular (Bernstein et al., 2006; Gan et al., 2007; Meissner et al., 2008), por lo que alteraciones en el perfil epigenómico pueden predisponer al organismo a desarrollar, retener y heredar un fenotipo anormal. Un ejemplo de lo anterior corresponde a la correlación entre los patrones aberrantes de metilación del DNA y el desarrollo de procesos tumorales específicos (Esteller, 2011).

Las alteraciones en los patrones normales de metilación que se presentan en células cancerosas conforman al *fenotipo metilador del cáncer* (Issa, 2004). Éste fue descrito por

primera vez en linfomas y cáncer pulmonar por Baylin et al. (1986) y se caracteriza por una hipometilación global del genoma, aunado a una hipermetilación local del mismo. Parte del fenotipo se atribuye a la desmetilación de los elementos móviles y de las secuencias repetidas (mismas que representan alrededor de un 44% del genoma (Allis, 2007), sin embargo la hipermetilación se presenta únicamente en secuencias discretas (de 200 pb a 3 kb) que están enriquecidas en citosinas y guaninas llamadas *islas CpG*. Entre el 60 y 70% de las islas CpG se encuentran asociadas a promotores (Larsen et al., 1992) y permanecen desmetiladas a pesar de ser ricas en dinucleótidos CpG, contexto en el que se presenta la mayor parte de la metilación en mamíferos (Esteller, 2011). Dependiendo de la densidad de estos dinucleótidos, los promotores a los que se encuentran asociadas las islas son clasificados como *promotores de alta, baja o densidad intermedia de CpGs*, lo cual determina la influencia que el estado de metilación de la isla tendrá sobre la expresión del gen adyacente (Weber et al., 2007; Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010).

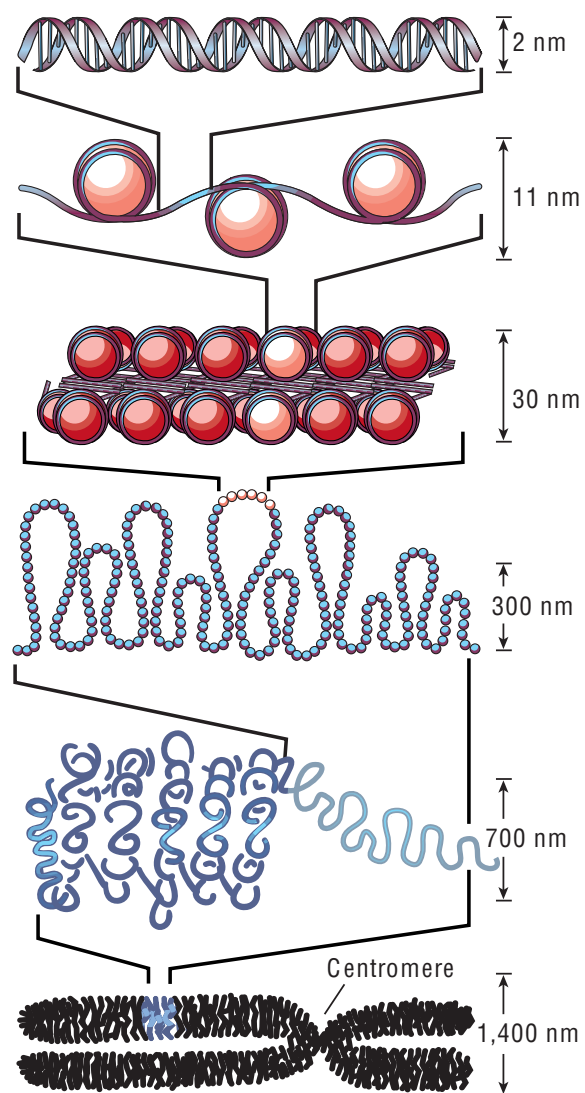


Fig 2. Organización del DNA en la cromatina. El nivel más bajo de organización es el nucleosoma y el conjunto de ellos conforman la fibra de 30nm, que es plegada para compactar y estructurar el genoma celular. (Modificado de Felsenfeld y Groudine, 2003).

En las células malignas se sub-expresan genes que regulan el crecimiento y la muerte celular (supresores de tumores) promoviendo la sobre-expresión de genes que darán ventaja funcional a la célula afectada (oncogenes) (Breivik y Gaudernack, 1999; Barros y Offenbacher, 2009; Reichard y Puga, 2010). Esto se debe, entre otras razones, a que los

promotores de genes supresores suelen ser del tipo con alta densidad de CpGs, o bien con densidad intermedia, de tal manera que su actividad es atenuada cuando la isla adyacente es hipermetilada durante la transformación celular.

3.1 Epigenética de la exposición a metales

Además de que algunos metales producen mutaciones que afectan directamente a la secuencia del DNA, también pueden dar pie a alteraciones capaces de modificar el perfil de expresión génica de una célula, sin necesidad de que haya cambios en los marcos de lectura de los genes comprometidos. Estas perturbaciones se denominan epimutaciones (Suter et al., 2004; Martin et al., 2011) y pueden conducir al silenciamiento de genes cuyos productos pueden ser críticos para mantener regulado el ciclo celular, la apoptosis, entre otras funciones esenciales para evitar la transformación de una célula.

Curiosamente, los metales/metaloide de la mezcla de Pb-Cd-As se destacan por la baja tasa de mutagenicidad que inducen de manera directa, aún presentándose en conjunto. Sin embargo, son capaces de iniciar un proceso de transformación celular, por lo que se ha propuesto que su capacidad carcinogénica no se debe a mecanismos genéticos, sino a los cambios epigenéticos que produce la exposición a éstos (Arita y Costa, 2009; Merzenich et al., 2001).

Se sabe que la exposición individual a Cd y As altera de manera global el estado de metilación de la célula. Según la metodología empleada para el estudio epigenético de la exposición a metales, los resultados varían entre un incremento o una disminución en el porcentaje total de DNA metilado. Por otro lado el incremento en la metilación de los promotores de genes específicos ocurre de manera consistente en genes como el *Inhibidor 2A de la cinasa dependiente de ciclinas* (CDKN2A/p16, (Issa, 2004; Ren et al., 2010; Recillas-Targa et al., 2011; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011), la *Protein-cinasa asociada con la muerte* (DAPK, (Barros y Offenbacher, 2009; Ren et al., 2010; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011), la *Proteína 1A de la familia del dominio de unión a Ras* (RASSF1A, (Esteller, 2005; Ren et al., 2010; Recillas-Targa et al., 2011), y la metalotioneína 1 (MT-1, (Chung et al., 2010; Tokar et al., 2010). A su vez, ciertas

modificaciones post-traduccionales en las histonas se han asociado con la exposición a estos metales, tales como la tri-metilación de las lisinas 9 y 27 en la histona H3 (H3K9me3 y H3K27me3, respectivamente, ambas marcas asociadas a la represión transcripcional), así como la tri-metilación de la lisina 4 (H3K4me3, asociada a promotores) y la fosfo-acetilación de la histona H3 (H3K9AcS10P, asociada a actividad transcripcional) (Barski et al., 2007). Estas marcas se presentan simultáneamente en las regiones promotoras de genes como la *Cinasa-fosfatasa activada por mitógenos* (MKP-1 (Martínez-Zamudio y Ha, 2011) y MT-3 (Somji et al., 2011) entre otros, silenciando la expresión de los mismos pero marcándolos para su rápida transcripción ante algún estímulo.

La hipometilación genómica observada en presencia de mezclas de metales se ha llegado a atribuir a la merma de la S-adenosil metionina (SAM, donador universal de grupos metilo en todos los procesos celulares de metilación (Barros y Offenbacher, 2009; Hou et al., 2011), inducida por el metabolismo del As, aunque la concentración de As necesaria para disminuir significativamente la concentración de SAM debe ser muy elevada, además de que esta asociación se ha visto principalmente en estudios *in vitro* (Martínez-Zamudio y Ha, 2011). La disminución de la SAM no explica, empero, el incremento en la metilación de regiones discretas del genoma. Este fenómeno en particular ha sido atribuido a la expresión alterada de la DNA metil-transferasas (DNMT1, DNMT3A/B), puesto que se ha reportado como la concentración del RNA mensajero (mRNA) que codifica para estas proteínas disminuye luego de una exposición corta, generando un patrón de hipometilación global, mientras que, tras una exposición crónica, el mRNA de estas proteínas aumenta, favoreciendo la hipermetilación de los promotores de genes como los antes mencionados (Benbrahim-Tallaa et al., 2007; Jiang et al., 2008; Martínez-Zamudio y Ha, 2011).

A pesar de la evidencia que existe, se desconocen los mecanismos precisos a través de los cuales se presentan estos cambios epigenéticos a lo largo del proceso de transformación celular. De hecho, el panorama se complica más, puesto que los metales pesados también poseen la capacidad de comprometer el funcionamiento de proteínas asociadas con el estado de permisividad de la cromatina, es decir aquellas capaces de modificar el código de histonas (Tabla 2) (acetil-transferasas de histonas (HAT), desacetilasas de

histonas (HDAC), cinasas (Msk1, Rsk2, (Zhu et al., 2011), metil-transferasas de histonas (G9A (Ait-Si-Ali et al., 2004; Bandyopadhyay et al., 2007; Arita y Costa, 2009), SET7/9 (Chi et al., 2010), SUV39H1 (Ait-Si-Ali et al., 2004; Wu et al., 2008) CHD8 (Van De Nobelen et al., 2010), entre otras) así como las proteínas que reconocen y efectúan dicho código (Swi/Snf (Bandyopadhyay et al., 2007; Chi et al., 2010), CRB2 (Sanders et al., 2004; Fraga y Esteller, 2005), MECP2 (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011), PRC2, EZH2 (Esteller, 2007; Baylin y Jones, 2011; Branco et al., 2011; Chi et al., 2010; Crea, 2012), HP1 (Wirth y Jedrusik-Bode, 2009), sin embargo esta no es la única manera en la que el estado de la cromatina puede alterar la expresión génica.

Como se mencionó antes, la cromatina se compone por DNA y proteínas, pero las histonas no son el único tipo de proteínas asociadas al DNA. Existen proteínas encargadas de la organización espacial de la cromatina en el interior del núcleo. Su adecuado funcionamiento permite delimitar territorios nucleares, que se caracterizan por una diferente tasa de actividad transcripcional y son determinantes para coordinar la regulación génica (Williams y Flavell, 2008; Hou et al., 2010). La lámina A/C, la cohesina y la nucleofosmina son ejemplos de proteínas que organizan la arquitectura nuclear (Hou et al., 2010; Ohlsson et al., 2010), sin embargo todas ellas interactúan con el factor de transcripción CTCF, la proteína responsable del mantenimiento e interacción de los territorios antes mencionados.

4. CTCF en la transformación celular

El factor de unión a CCCTC (CTCF) es una proteína nuclear con 11 dedos de zinc, muy conservada en vertebrados e invertebrados, a la que se le atribuyen diferentes funciones como bloqueador de enhancers, actividad por la que fue originalmente descrita, activador transcripcional, puesto que contrarresta el silenciamiento epigenético de los genes induciendo un estado permisivo en la cromatina, elemento barrera, gracias a que evita la propagación de la metilación del DNA y organizador del genoma, ya que puede modificar la estructura de la cromatina, delimitando regiones génicas discretas (Weth y Renkawitz, 2011). Su función varía según su localización y el número de dedos de zinc con los que se une al DNA (Wallace y Felsenfeld, 2007) y se

estima que los sitios de unión de CTCF en el genoma humano rondan entre los 14,000-15,000, y el factor de transcripción se encuentra asociado a la mayoría de estos sitios (Kim et al., 2007), mismos que también están conservados (Xie et al., 2007).

La distribución de los sitios de unión a CTCF correlaciona con una densidad génica elevada (Van De Nobelen et al., 2010), contrario a lo que antes se suponía ya que, siendo CTCF un elemento de barrera se esperaría que estuviera presente en regiones inter-génicas. Sin embargo CTCF se localiza con cierta frecuencia cerca de genes (Hou et al., 2010) mientras que, los dominios aparentemente libres de CTCF, se caracterizan por estar delimitados en sus extremos por esta molécula (Williams y Flavell, 2008).

Gracias a sus 11 dedos de zinc, CTCF puede formar homodímeros (Valadez-Graham et al., 2004; Yusufzai et al., 2004; Williams y Flavell, 2008) e interactuar con proteínas involucradas en la estructura nuclear como la nucleofosmina (Yusufzai et al., 2004; Ohlsson et al., 2010), la lámina nuclear (Ottaviani et al., 2009; Zlatanova y Caiafa, 2009), la cohesina (Cuddapah et al., 2008; Hou et al., 2010), etc. Algunos de los modelos propuestos para las funciones de CTCF incluyen el plegamiento de la cromatina para formar asas con actividad transcripcional diferente a las regiones aledañas (Fig. 3A), plegar la cromatina para aproximar los genes y los elementos reguladores entre sí (o bien acercar genes co-regulados para optimizar su control) (Fig. 3B), unir elementos reguladores inter-cromosómicos (Fig. 3C), y secuestrar secuencias a la periferia nuclear para su silenciamiento (Williams y Flavell, 2008; Boban et al., 2010; Handoko et al., 2011).

Debido a que CTCF se une a un gran número de secuencias capaces de inhibir la activación de promotores (elementos aisladores) y a causa de la plétora de funciones de control que la molécula puede ejercer

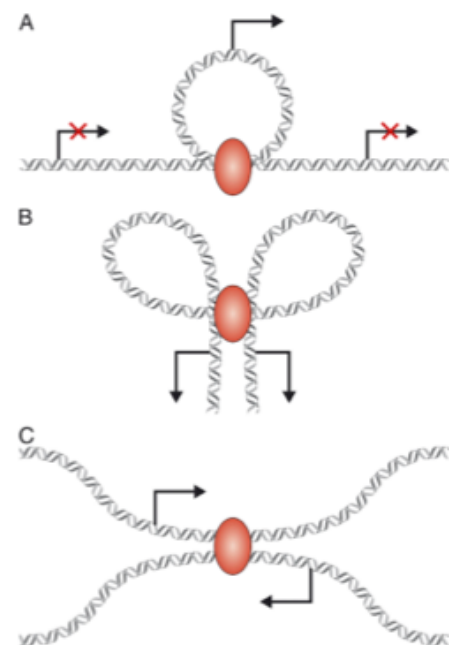


Fig 3. Modelos propuestos de la función de CTCF. Esta proteína puede formar asas con diferente actividad transcripcional (A) y aproximar genes a elementos reguladores a nivel intra-cromosómico (B) o inter-cromosómico (C), entre otros (Modificado de Williams y Flavell, 2008).

en ellas, la presencia de este factor de transcripción es de suma importancia para la regulación del transcriptoma y por ende para el mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, dado que es una proteína ubicua, su función no puede estar regulada simplemente por expresión diferencial, su control debe estar dado por la síntesis de factores que recluten a CTCF a sus secuencias blanco, o bien por el bloqueo de la unión de esta molécula a las secuencias que reconoce, fenómeno en el cual se propone que la metilación del DNA está involucrada (Williams y Flavell, 2008). Es precisamente por este hecho que el fenotipo metilador del cáncer puede estar directamente relacionado con la función de CTCF.

Esta proteína no puede unirse a secuencias metiladas (Felsenfeld y Bell, 2000; Allis, 2007; De la Rosa-Velazquez, et al, 2007; Lienert et al., 2011), pero el DNA no se metilará siempre y cuando el factor permanezca unido a los elementos aisladores que reconoce, de modo que, ¿cómo es que, durante la carcinogénesis, se puede presentar la hipermetilación característica en los promotores de *p16INK4*, *MLH1*, *BRCA1*, entre otros genes supresores de tumores (Esteller, 2007; Bhusari et al., 2010), si sus regiones promotoras se encuentran asociadas a CTCF ?

Para que se lleve a cabo este proceso la proteína asociada a una actividad de barrera debería disociarse temporalmente del DNA, permitiendo que las metil-transferasas *de novo* incorporen los grupos metilo a las citosinas de la isla CpG antes protegida y conduzcan al silenciamiento del gen asociado. Esto ya se ha postulado antes (Dávalos-Salas et al., 2011), e incluso dicha secuencia de eventos se ha correlacionado con la deslocalización de CTCF hacia el citoplasma celular en casos de cáncer de mama esporádico (DiNardo et al., 2001; Butcher et al., 2004; Butcher y Rodenhiser, 2007). Debido a que reconocen la misma secuencia, se ha propuesto que el parálogo de CTCF *Hermano del regulador de sitios improntados/proteína tipo CTCF* (BORIS/CTCFL, por sus siglas en inglés) puede desplazar a CTCF de sus sitios de unión, o reemplazarlo una vez disociado éste (Butcher y Rodenhiser, 2007; Martin-Kleiner, 2011; Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010) permitiendo la metilación del DNA. Consideramos, sin embargo, que ésta no es la única manera en la que se puede promover la disociación de CTCF y con ello exponer las islas CpG al efecto de metil-transferasas.

Modificación post-traducciona	Residuo modificado	Funciones reguladas
Acetilación	H2A (K5) H2B (K12,K15) H3 (K9, K14, K18, K23, K56y) H4 (K5, K8, K12, K16)	Transcripción, reparación, replicación, condensación
Metilación de lisinas (mono-, di-, tri-)	H3 (K4, K9, K27, K36, K79) H4 (K20)	Transcripción y reparación
Metilación de argininas (mono-, di-, tri-)	H3 (R2, R8, R17, R26) H4 (R3)	Transcripción
Fosforilación de serinas	H2B (S14) H3 (S10, 2S8) H4 (S1)	Transcripción, reparación, replicación, condensación
Fosforilación de treoninas	H3 (T3)	
Ubiquitinación	H2A (K119) H2B (K120h/123y)	Transcripción y reparación
ADP-ribosilación (argininas)	H2B (E2)	Transcripción
Sumoilación	H2A H2B H4	Transcripción
Des-aminación de arginina mono-met a citrulina (no en R di-, tri-met)	H3 H4	Transcripción
Isomerización de prolinas	H3 (P30y, P38y)	Transcripción
Biotinilación	H2A (K9, K13, K125, K127, K129) H3 (K4, K9, K18) H4 (K8, K12)	Silenciamiento génico, condensación mitótica, silenciamiento génico

Tabla 2. Resumen de modificaciones de histonas. Algunas de las modificaciones post-traduccionales mas conocidas, los residuos en las que se encuentran y las funciones que regulan (Modificado de Heath, 2007 basado en Kouzarides, 2007 y Hassan, 2006).

Como ya se mencionó, la exposición a metales también produce epimutaciones y el desplazamiento de Zn en presencia de Cd, Pb Cobre, Níquel, Cobalto o Hierro (Cu, Ni, Co, Fe, respectivamente) es un caso particular de la etiología de estas alteraciones. Existen reportes de la afinidad que estos iones presentan por los sitios coordinados por Zn (Galaris y Evangelou, 2002) pero, específicamente, se reconoce el efecto negativo que ejercen sobre las estructuras de dedos de zinc. Si bien las diferencias en su afinidad (Cu>Cd>Zn>Co>Ni (Predki y Sarkar, 1992) permiten que estos iones desplacen facilmente al Zn, tanto la estructura de los dedos como la función de la proteína se ven comprometidas (Predki y Sarkar, 1994; Asmuss et al., 2000; Zawia et al., 2000; Basha et

al., 2003). Si en lo que respecta a las proteínas de reparación, la sola des-estabilización de sus dedos de Zn es lo suficientemente significativa para promover la acumulación de daño al DNA y dar pie a un proceso carcinogénico, las consecuencias de los efectos que la exposición a metales puede tener sobre CTCF serían, en teoría, más graves, pues los blancos que involucra son muchos más y las funciones comprometidas van desde la regulación del transcriptoma hasta la estabilidad del genoma.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En vista de que CTCF tiene 11 dedos de zinc que la convierten en un blanco susceptible al efecto nocivo de los metales (Ong y Corces, 2009; Yusufzai et al., 2004; Zlatanova y Caiafa, 2009) resulta de interés determinar si este factor nuclear está involucrado en las fases tempranas del proceso de transformación celular inducido por la exposición a Pb-Cd-As. Esto dado que el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores por la hipermetilación de sus promotores es un evento clave en la tumorigénesis que conlleva a la adquisición de los marcadores típicos del cáncer (Esteller, 2007) y la pérdida de función de CTCF puede modificar el perfil de metilación celular para dar inicio al proceso de transformación celular.

HIPÓTESIS

La exposición a la mezcla de Pb-Cd-As alterará la función y en particular la localización nuclear de CTCF causando cambios en los patrones de metilación del DNA.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As sobre el factor nuclear CTCF y su papel en el proceso temprano de transformación celular.

Objetivos particulares

- ☞ Evaluar los efectos de la exposición a la mezcla Pb-Cd-As sobre la localización de CTCF
- ☞ Evaluar los cambios en la metilación del DNA, tanto a nivel global como local, durante la transformación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y tratamiento

La células usadas fueron fibroblastos embrionarios murinos de la línea celular Balb/c 3T3 (ATCC, No. CCL-163, también conocido como sistema de transformación de dos fases). Las células fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. El medio usado en todos los estudios fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de baja glucosa (Gibco), y complementado con glucosa, bicarbonato de sodio (Merk), 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptavidina/anfotericina, Gibco), 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) para la fase de iniciación y 2% de SFB para la fase de promoción respectivamente y 2% de insulina-trasferrina-selenio-A (ITS) para el medio de la fase de promoción (Gibco).

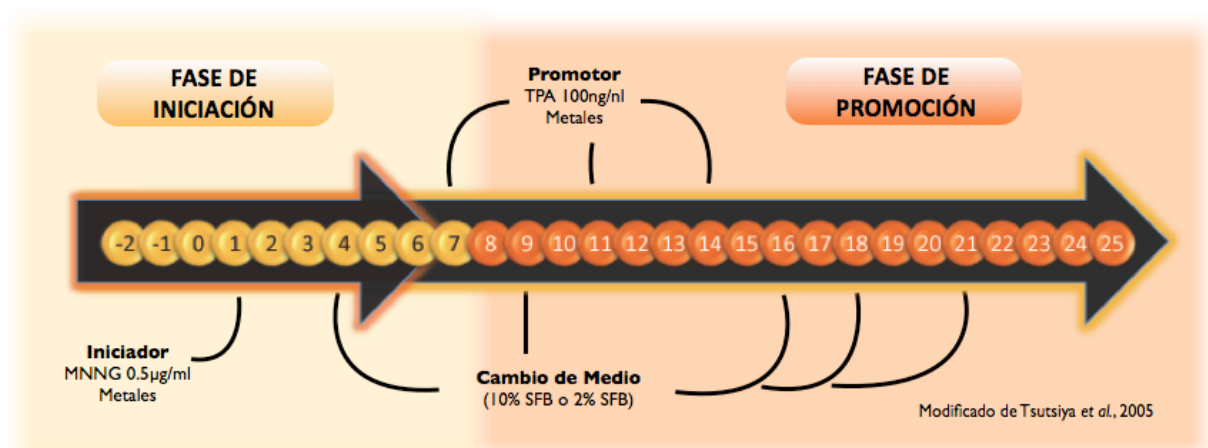


Fig 4. Esquema de las fases del ensayo de transformación celular. Fase de Iniciación (días 1-6), fase de promoción (días 7-25). El tratamiento iniciador (N-Metil-N'-Nitro-n-Nitrosoguanidina, MNNG) se administra al primer día del ensayo, mientras que el promotor (12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato, TPA) se administra tres veces a lo largo de la segunda fase (Modificado de Tsuchiya et al, 2005).

Se agregaron al medio 50 μl de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) para una concentración final de 2.872 μM (Sigma) y 100 μl de 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) para una concentración final de 0.162 μM (Sigma). Los metales de la mezcla de plomo (Pb) 4.8 μM , cadmio (Cd) 2.7 μM y arsénico (As) 2 μM fueron obtenidos de acetato de plomo, cloruro de cadmio y arsenito de sodio respectivamente (Merk). Se agregaron 36.7 μl de la mezcla al medio. Las células fueron cultivadas en cajas p100 con 7×10^4 células para los grupos control (Co) y 90 mil células para los grupos tratados (MNNG y Met), poniendo en cada caja 4 cubre-objetos de 18x18 centímetros.

Modelo de transformación celular de dos fases

Las células son cultivadas con diferentes concentraciones de SFB para las etapas de iniciación (días 1-6) y promoción (días 7-25) y se utilizan tanto un iniciador como un promotor conocidos para obtener el control positivo de transformación:

- ☞ MNNG en la iniciación, un mutágeno que presenta mucha afinidad por el N-7 de las guaninas, por lo que produce transversiones al formar pares anómalos con timina (Fang et al., 2001; Sakai, 2007).
- ☞ TPA en la promoción, un éster de forbol capaz de activar a la PKC y de este modo estimular el ciclo celular (Rebois y Patel, 1985).

Después de 25 días de cultivo bajo las condiciones antes descritas las células son procesadas por tinción de Giemsa y analizadas al microscopio para identificar las características morfológicas de focos de transformación: coloración intensa, diametro mayor o igual a 2 mm, orientación celular azarosa en los bordes del foco y crecimiento en multi-capa (Sasaki et al., 2012b). Los focos identificados se cuentan para determinar la eficiencia relativa de formación de colonias (Fig 3).

Este modelo está validado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) y el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y es usado para evidenciar el efecto iniciador y/o promotor de agentes

químicos en la transformación celular de manera reproducible y altamente sensible (Ohmori et al., 2004).

Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en cajas p100 usando dos cubreobjetos estériles para cada condición, cosechándolas a baja confluencia. Las muestras fueron lavadas con PBS y fijadas por 40 minutos con paraformaldehído 4% (PFA) y permeabilizadas con solución amortiguadora de fosfatos con tritón al 2% (PBS-Tritón). Se usó PBS con suero fetal bovino al 1% (PBS-FBS) durante 40 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo. A partir de este paso y después de cada incubación, las muestras fueron lavadas alternando un enjuague con PBS, un lavado de 5 minutos con PBS-Tritón y otro enjuague con PBS, con el fin de retirar el exceso de proteínas del suero y/o de anticuerpos. Los anticuerpos primario 1:50 (IgG de conejo vs CTCF; Sta Cruz) y secundario 1:100 (IgG-FITC de cabra vs conejo; ZyMed) o 1:200 (IgG-Alexa488 de cabra vs conejo; Invitrogen) se colocaron por goteo y las incubaciones se hicieron a 37°C en cámara húmeda por 40 minutos. La contratinción nuclear se realizó durante la incubación con el anticuerpo secundario, agregando 5 µl de DAPI 100 µg/ml a la solución, 5 minutos antes de que transcurrieran los 40 minutos de dicha incubación. Una vez lavadas, las muestras fueron montadas usando medio de montura de Dako (Fluorescent Mounting Medium; Dako Cytomation). Las muestras fueron analizadas por microscopía epifluorescente (Carl Zeiss, Axiostar plus, AxioCam IGc1) y confocal para hacer reconstrucciones de las células completas con aproximadamente 10 cortes de 5µm cada uno (Carl Zeiss, LSM Duo 710, Axio Observer 2.1. Láser de argón de 488 nm para visualizar FITC. Láser multifotónico Coherent (Chameleon) a 420 nm para visualizar DAPI).

Electroforesis unicelular (ensayo cometa modificado)

Las células fueron cosechadas utilizando PBS-EDTA 0.2% para contarlas y usar la misma cantidad de células por reacción. Se tomó una alícuota con aproximadamente 100 mil células y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos para poder quitar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Se tomaron 75 µl para poner 50 mil células por goteo en extremos opuestos de laminillas previamente cubiertas con 150 µl de agarosa regular al 1% (Sigma), cubriendo las gotas con cubre-objetos de 18x18mm (Knittel) para expandir las células embebidas en ellas.

Una vez solidificada la agarosa, se removieron los cubreobjetos y se guardaron las laminillas a 4°C en buffer de lisis por al menos 1 h (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, adicionado con 10% DMSO, 1% Triton X-100 (J.T. Baker, Invitrogen, Sigma) (Rojas et al., 2000).

Previo a la digestión enzimática las laminillas fueron enjuagadas en buffer de lavado para remover el exceso de sales (Tris pH 10 50 mM, EDTA 10 mM (Sigma, Invitrogen). Cada laminilla fue incubada con 10 µl de la enzima NotI (GC'GGCCGC) diluída según las indicaciones del proveedor (Fermentas) o con 10 µl de buffer, colocando cada reactivo sobre la agarosa solidificada en extremos opuestos de la laminilla y poniendo cubreobjetos encima para evitar que se evaporara el reactivo durante la incubación. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 37°C y luego lavadas en buffer de paro (Tris pH 10 50 mM (Sigma), EDTA 200 mM (Invitrogen) por 5 minutos para detener la reacción enzimática. Las laminillas se colocaron de inmediato en buffer de electroforesis (NaOH 300 mM (J. T. Baker), Na₂EDTA 1 mM (Invitrogen), pH >13) en una cámara horizontal (Maxicell) para llevar a cabo el protocolo a 0.8 V/cm y 300 mA por 10 minutos, sin dar tiempo adicional para el desenrollamiento del DNA. Las laminillas fueron lavadas dos veces por 5 minutos en buffer de neutralización (Tris 0.4 M (Sigma), pH 7.5) a temperatura ambiente, y luego deshidratadas con etanol absoluto por 5 minutos.

Las células se analizaron con un objetivo de 20x en un microscopio Olympus BMX-60 acoplado a fluorescencia (filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrera de 590 nm) usando 20 µl de una solución de bromuro de etidio (Sigma) 20 µg/ml y colocando un cubreobjetos del lado a analizar de cada laminilla. (Valverde et al., 2002). Los parámetros de migración del DNA (largo de la cola del cometa, porcentaje de DNA en la cola del cometa y momento de la cola de Olive (OTM) fueron evaluados usando el software Komet v3.0 (Kinetic Imaging) analizando 100 células por condición, cada una de éstas con su réplica biológica. Para estimar el valor neto producido por la digestión enzimática la media obtenida de las laminillas tratadas con buffer de cada tratamiento fue restada de la media obtenida en la laminilla correspondiente tratada con la enzima (Collins, 2009).

Modificación de DNA con bisulfito de sodio

Se extrajo DNA de las células cosechadas usando DNAzol (Gibco) y se cuantificó usando un NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer). Se usaron 2 µg de DNA para cada reacción de bisulfito de sodio ajustando el volúmen a 18 µl con agua bidestilada. Se calentaron las muestras a 95° C por dos minutos y transcurrido ese tiempo se pusieron en hielo por 5 minutos. Se añadieron 2 µl de NaOH 3 M para desnaturalizar el DNA y se incubó por cinco minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron 12 µl de hidroquinona 10 mM y 208 µl de bisulfito de sodio 3 M a pH 5, se mezcló ligeramente y se adicionaron 100µl de aceite mineral antes de poner las muestras a incubar a 50°C por 14 horas en oscuridad.

Se congelaron las muestras a -70°C para poder retirar el aceite mineral y después se pasaron por columnas Wizard (Promega) para eliminar el bisulfito y resuspender el DNA en agua bidestilada. Se agregaron 5.5 µg de NaOH 3 M y se incubaron las muestras por 15 minutos a 37°C para desulfurar el DNA y posteriormente se precipitó toda la noche a -70° C con 20 µg de glucógeno, 33.3 µl de acetato de amonio 5 M a pH 7.0 y 300 µl de etanol 100%. Se centrifugaron las muestras a 4° C por una hora a 13,000 rpm para remover el etanol y después lavar el pellet con 300 µl de etanol 70%. Se dejó secar el DNA y luego se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada.

Diseño de oligonucleótidos

Se usaron oligos con secuencia modificada por bisulfito de sodio para el reconocimiento y amplificación de la región promotora de los genes *ogg1* y *p53*. Para el diseño de cada oligo se usó la secuencia que se localiza a dos mil pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de cada gen y se buscó amplificar una zona que cumpliera con las características de un promotor de alto contenido, o bien de contenido intermedio en CpGs, según el algoritmo descrito por Weber et al. (Weber et al., 2007):

$$\text{Tasa de CpGs} = (\text{Número de CpGs}) / (\text{Número de pb}) / (\text{Número de Cs}) / (\text{Número de Gs})$$

$$\text{donde CpG} = \text{nucleótidos en contexto } 5' \text{- CG } -3'$$

$$pb = \text{pares de bases}$$

$$C = \text{citosina}$$

$$G = \text{guanina}$$

OGG1

Secuencia original:

5'-GAACTCCAAAGAAAGCCATCTCTCCACGCTCGGACTGGAGCGCGGGTAGCTGTGCCGCAGGCTGTAGCCAGG
GCGAGCAAACCTGAGACTGGCCTCTGAAGCCTGGGAAGCCGAGATGGCGCATTGGGGCCCTCCTGACAAGACGT
GGAGGGGACAGCGCTGAAAAATCACTGCCTCAGAAGAGGCTCGGTGGAGAAAGGCTTGAGCAGGGGAGGATGAG
ATTCTTTGGTTTTATTTCTTGAGACAGAGTCTCGCCATGAAGCCCAGCCTAGTTAAGCTTCAAACGTGCCTCCCGC
CTCTGCCTACCGAGTTCTGGGACGACCGGTGTGTACCACTACGCCCCGCAATGATGTGGCTCCAGTGGGGCCAGC
ACGAGAAGTTGCAGGCAGGCCCTGAGATTGCACCGAAAGCCCTGAAATGGCAGAGCCGGGTCTCTGGCAGCCAAT
CGCCAAGCAGCGAGGCCAGCAGGCCAACCGCTCCACCTCACAGGCCCGCCACTCCGGCACTCCCGAGTTCTCAT
TGGTGCTTCGTACTTTCTTCTCGGATTGGCTACCTCTAGGGTCAAATAAGCGGGAGCAAGGATCTACTTCCGGTG
GGAGTAACTGG**GACCCGGAAGAACCATACTGGCGCGCCTTTCCAAACCTCGAGGGCTGCGCAGGAGGAGGAGG**
CGCGCGCCGGGAGGTCCTGGGGCGGGGCCACGTCCGGAGGAAGAGGCGGGCGTGCTGCACGGGAGAGCGGAG
TGGGGCGTTTTAGGGTTTTGGTGGTGTGCG**AGAGGCTTTCTACGAGG**AGAGGGAAATTCATTCAACAGGGACTC
AAATTAATAATTACACCGGACCCATAAGCTAGGACCCACGGTGTACACTCCCGGTGTGTGTGGTCACTTGTGTGC
GAGGCTTTAGGACTTGGGAAAGTCGAGTTCTGATTGGACAGTGCCGTAATGGGCTGGGGCTGCTAGCCGAATGTT
ATTCCGTTCTGGCTGCCTAGCAGCATGAGACATCGCACCCCTAAGCTCCAGCC-3'

Secuencia modificada con bisulfito de sodio:

5'-GAATTTTAAAGAAAGTTTTATTTTTTACGTTCCGATTGGAGCGGGTAGTTGTGTCTAGGTTGTAGTTAGGGC
GAGTAAATTTGAGATTGGTTTTTTGAAGTTTGGGAAGTTCGAGATGGCGTATTCGGGGTTTTTTGATAAGACGTGG
AGGGGATAGCGTTGAAAAATTATTGTTTTAGAAGAGGTTCCGGTGGAGAAAGGTTTGAGTAGGGGAGGATGAGAT
TTTTTCGGTTTTATTTTTTGGATAGAGTTTTCGTTATGAAGTTTAGTTTTAGTTAAGTTTTAAACGTGTTTTTCGTT
TTTGTATTCGAGTTTTGGGACGATCGGTGTGTATTATTACGTTTCGTAATGATGTGGTTTTAGTGCGGGTTAGT
ACGAGyAAGTTGTAGGTAGGTTTTGAGATTGTATCGAAAGTTTTGAAATGGTAGAGTCGGGTTTTTGGTAGTTAA
TCGTTAAGTAGCGAGGTTAGTAGGTTAATCGTTTTTATTTATAGGTTTCGTTTATTTTCGGTATTTTCGAGTTTTT
ATTGGTGTTCGTATTTTTTTTTTCGGATTGGTTATTTTTAGGGTTAAATAAGCGGGAGTAAGGATTTATTTTCGG
TGGGAGTAAATTGG**GATTCGGAAGAATTATATTGGC**CGGTTTTTTTTAAATTCGAGGGTTGCGTAGGAGGAGG
AGGCGCGCGTCGGGAGGTTTTGGGGCGGGGTTACGTTCCGAGGAAGAGCGGGGCGTGTGTACGGGAGAGCGG
AGTGGSGGCGTTTTAGGGTTTTGGTGGTGTG**CGAGAGGTTTTTTACGAGG**AGAGGGAAATTTATTTAATAGGG
ATTTAAATTAATAATTATATCGGATTTATAAGTTAGGATTTACGGTGTATATTTTCGGTGTGTGTGGTTATTTGT
GTGCGAGGTTTTAGGATTTGGGAAAGTCGAGTTTTGATTGGATAGTGTGTAATGGGTTGGGGTTGTTAGTCGAA
TGTTATTTTCGTTTTTGGTTGTTTAGTAGTATGAGATATCGTATTTTAAGTTTTAGTT-3'

Oligos para la PCR sensible a metilación (MS-PCR)

Secuencias metiladas

- Forward: 5'-GATTCGGAAGAATTATATTGGC-3' T_m = 63.36; CpG = 2
- Reverse: 5'-CCTCGTAAAAAACCTCTCG-3' T_m = 63.67; CpG = 2

Producto de la amplificación

5'-GATTCGGAAGAATTATATTGGCGCGTTTTTTTTAAATTTTCGAGGGTTGCGTAGGAGGAGGAGGCCGCGCTCGGG
AGGTTTTGGGGCGGGTTACGTTTCGGAGGAAGAGCGGGGCGTGTGTACGGGAGAGCGGAGTGGGGCGTTTTAG
GGTTTTGGTGGTGTGCGAGAGGTTTTTTTTACGAGG-3'

Secuencias no-metiladas

■ Forward: 5'-GGGATTTGGAAGAATTATATTGGT-3' Tm=61.34

■ Reverse: 5'-TCCTCATAAAAAACCTCTCAC-3' Tm=58.63

Producto de la amplificación

5'-GATTTGGAAGAATTATATTGGTGTGTTTTTTTTAAATTTTGAGGGTTGTGTAGGAGGAGGAGGTGTGTGTTGG
GAGGTTTTGGGGTGGGGTTATGTTTGGAGGAAGAGGTGGGGTGTGTTGTATGGGAGAGTGGAGTGGGGTGT
AGGGGTTTTGGTGGTGTGTGAGAGGTTTTTTTTATGAGG-3'

p53

Secuencia original:

5'-GAAAACAGTCTTTACAGAGAGTGATAAGGACTGTACAGGAAATTAACA**CGGTGGTGG**GATACCAAGTATCT
CGGGAGAAC**CGT**TAGATTGAGATACTATGAAAAGCCTTTCTAAAGTGACATTTTAGCTAATGAGGGGAAAAAGA
ACTTAGGGGCC**CGT**GTTGGTTCATCCCTGACTTGGAAGG**CCTAAAGCAGGAAGACGGCCCG**GAATTCCAGGCC
AGCCTTGGCTACAAAGACTCTGTCTTAAAAATCCAAAAGATGGCTATGACTATCTAGCTGGATAGGAAAGAGCA
CAGAGCTCAGAACAGTGG**CGGT**CCACTT**ACG**ATAAAACTTAATTCTTTCCACTCTTTATACTTGACACAG**GGC**
AGGAGTCTCTCGAATCGGTTTCCACCCATTTGCCCTCACAGCTCTATATCTTAG**ACG**ACTTTTCACAAAG**CGT**
TCCTGCTGAGGGCAACATCTCAGGGAGAATCCTGACTCTGCAAGTCCC**CG**CCTCCATTTCTTGCCCTCAACCC**CG**
GAAGGACTTGCCCTTACTTGTTATGG**CG**ACTATCCAGCTTTGTGCCAGGAGTCT**CGCG**GGGGTTGCTGGGATTGG
GACTTTCCCTCCC**CGT**GCTCACCTGGCTAAAGTTCTGTAGCTTCAGTTCATTGGGACCATCCTGGCTGTAGGT
AG**CG**ACTACAGTTAGGGGGCACCTAGCATT**CAG**GCCCTCATCCTCCTCCTCCCAGCAGGGTGT**CAG**CTTCTCC
GAAGACTGGGTAAGTAATTGATGAG**CGT**G**ACG**AGACCTCT**CG**GTCACTGGCTCTCT**CG**TTTTGCATCCATAAAA
CTAGAGAAAAC**CGT**GGGGT-3'

Secuencia modificada con Bisulfito de Sodio:

5'-GAAAACAGTCTTTACAGAGAGTGATAAGGACTGTACAGGAAATTAACACGGTGGTGGGATACCAAGTATCTC
GGAGAACACGTTAGATTGAGATACTATGAAAAGCCTTTCTAAAGTGACATTTTAGCTAATGAGGGGAAAAAGAA
CTTAGGGGCCCGTGGTTCATCCCTGACTTGGAAGG**TTTAAAGTAGGAAGACGGTCG**GAATTTTAGGTTA
GTTTTGGTTATAAAGATTTTGTTTTAAAAATTTAAAAGATGGTTATGATTATTTAGTTGGATAGGAAAGAGTA
TAGAGTTTAGAATAGTGGCGGTTTATTTACGATAAAAATTTAATTTTTTTTTATTTTTTATATTTGATATAG**GG**
TAGGAGTTTTTCGAATCGGTTTTTATTTATTTTGTTTTTTATAGTTTTATTTTTAGACGATTTTTTATAAAGCG
TTTTTGTGAGGGTAATATTTTAGGGAGAATTTGATTTTGTAAAGTTTTCGTTTTTATTTTTTGTTTTTAATTTA

CGGAAGGATTTGTTTTTATTTGTTATGGCGATTATTTAGTTTTGTGTTAGGAGTTTCGCGGGGGTTGTTGGGATT
GGGATTTTTTTTTTTTACGTGTTTATTTTGGTTAAAGTTTTGTAGTTTTAGTTTTATTGGGATTATTTTGGTTGTA
GGTAGCGATTATAGTTAGGGGTATTTAGTATTTAGGTTTTTATTTTTTTTTTTTTTTAGTAGGGTGTACGTTTT
TTCGAAGATTGGGTAAGTAATTGATGAGCGTGACGAGATTTTTCGGTTATTGGTTTTTTTTCGTTTTGTATTATAA
AATTAGAGAAAATCGTGGGGT-3'

Oligos para la PCR sensible a metilación (MS-PCR)

Secuencias metiladas

■ Forward: 5'-TTTAAAGTAGGAAGACGGTCGC-3' Tm = 62.93; CpG = 3

■ Reverse: 5'-ACCGATTCGAAAACTCCTACC-3' Tm = 63.85; CpG = 2

Producto de la amplificación

5'-TTTAAAGTAGGAAGACGGTCGGAATTTTAGGTTAGTTTTGGTTATAAAGATTTTGTTTTTAAAAATTTAAAA
AGATGGTTATGATTATTTAGTTGGATAGGAAAGAGTATAGAGTTTAGAATAGTGGCGGTTTATTTACGATAAAA
ATTTAATTTTTTTTTATTTTTTATATTTGATATAGAGGTAGGAGTTTTTCGAATCGGT-3'

Secuencias no-metiladas

■ Forward: 5'-AGGTTTAAAGTAGGAAGATGGTTGT-3' Tm=60.59

■ Reverse: 5'-ACCAATTCAAAAACTCCTACCTCT-3' Tm=62.52

Producto de la amplificación

5'-TTTAAAGTAGGAAGATGGTTGTGAATTTTAGGTTAGTTTTGGTTATAAAGATTTTGTTTTTAAAAATTTAAAA
AGATGGTTATGATTATTTAGTTGGATAGGAAAGAGTATAGAGTTTAGAATAGTGGTGGTTTATTTATGATAAAA
ATTTAATTTTTTTTTATTTTTTATATTTGATATAGAGGTAGGAGTTTTTTGAATTGGT-3'

El producto amplificado se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% para después cortar la banda correspondiente al peso del fragmento de interés y recuperar el DNA usando el kit QIAquick (Quiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Preparación de bacterias competentes

Se usaron bacterias de la cepa DH5 α . El protocolo para la preparación de bacterias competentes se llevó a cabo usando un mechero para producir un medio estéril. Las bacterias se sembraron en 5 ml de medio LB sin antibiótico y se incuban a 37°C, en

agitación a 200 rpm, toda la noche. Se resembró una alícuota de 4 ml en 400 ml de LB (dilución final de 1:200), usando un matraz de un litro, a 37°C en agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 - 0.6 a 630 nm. Se centrifugó a 400 rpm, a 4°C, durante 15 minutos para resuspender en 20 ml de Buffer de Transformación 1 (TBF1 pH 5.8, 1.2 g RbCl, 0.99 g MgCl, 3 ml CH₃CO₂K 1 M, pH 7.5, 0.15 g CaCl-2H₂O, 11.9 ml Glicerol), las bacterias se incubaron en hielo 20 minutos y después se centrifugaron a 400 rpm a 4°C, durante 15 minutos para resuspender en 7 ml de TBF2 (2 ml MOPS 0.5 M, pH 6.8, 0.12 g RbCl, 1.1 g CaCl-2H₂O, 11.9 ml Glicerol). Se incubaron en hielo 20 minutos y se hicieron alícuotas de 100 µg para almacenar a -70°C.

Transformación de bacterias mediante un choque térmico

El producto amplificado de los genes se ligó al plásmido pGEM-T Easy (Promega) por medio de una reacción de ligación con la enzima T4 (Promega). El protocolo de transformación se llevó a cabo usando un mechero como medio estéril. Se usaron 5 µl del DNA obtenido de la reacción de PCR y se mezclaron con 100 µl de bacterias competentes. Los tubos se pusieron en hielo durante 30 minutos y después se incubaron a 42°C durante 60 segundos. Inmediatamente después, los tubos se volvieron a colocar en hielo por dos minutos y pasado el tiempo se les agregó a cada uno 1 ml de medio Lb sin ampicilina (Amp) y se incubaron a 37° C durante una hora. Los tubos se centrifugaron por cinco minutos a 5000 rpm y se decantó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en el poco medio que quedó en cada tubo, se plaqueó en cajas petri p100 con agar Lb con 100 µg/ml de Amp y éstas se incubaron a 37° C durante toda la noche.

Se seleccionaron las colonias de bacterias transformadas y con ellas se inocularon 4 ml de medio LB con 100 µg/ml de Amp. Se incubó toda la noche a 37° C agitando a 200 rpm. Las bacterias se centrifugaron 5 minutos a 10,000 rpm y se extrajeron los plásmidos usando el kit QIAprep Spin (Quiagene) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se digirió una alícuota de los plásmidos para confirmar la presencia del fragmento de interés usando la enzima *EcoR1* (New England). Las muestras se digirieron durante dos horas a 37° C y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%.

RESULTADOS

Potencial carcinogénico del Pb-Cd-As

Para corroborar la capacidad transformadora de la mezcla de metales, se establecieron las condiciones del ensayo de transformación celular de dos fases y se evaluó la eficiencia relativa de formación de colonias. El análisis morfométrico para el conteo de focos de transformación celular confirmó el potencial carcinogénico que tiene la mezcla de Pb-Cd-As. Al administrar la mezcla de metales como tratamiento promotor la eficiencia relativa de transformación fue mayor con respecto al control, pero la mezcla resultó ser mejor iniciador del proceso de transformación celular porque, como se observa en la gráfica (Fig 5), la eficiencia relativa de formación de colonias sólo fue significativa al usar la mezcla como tratamiento iniciador.

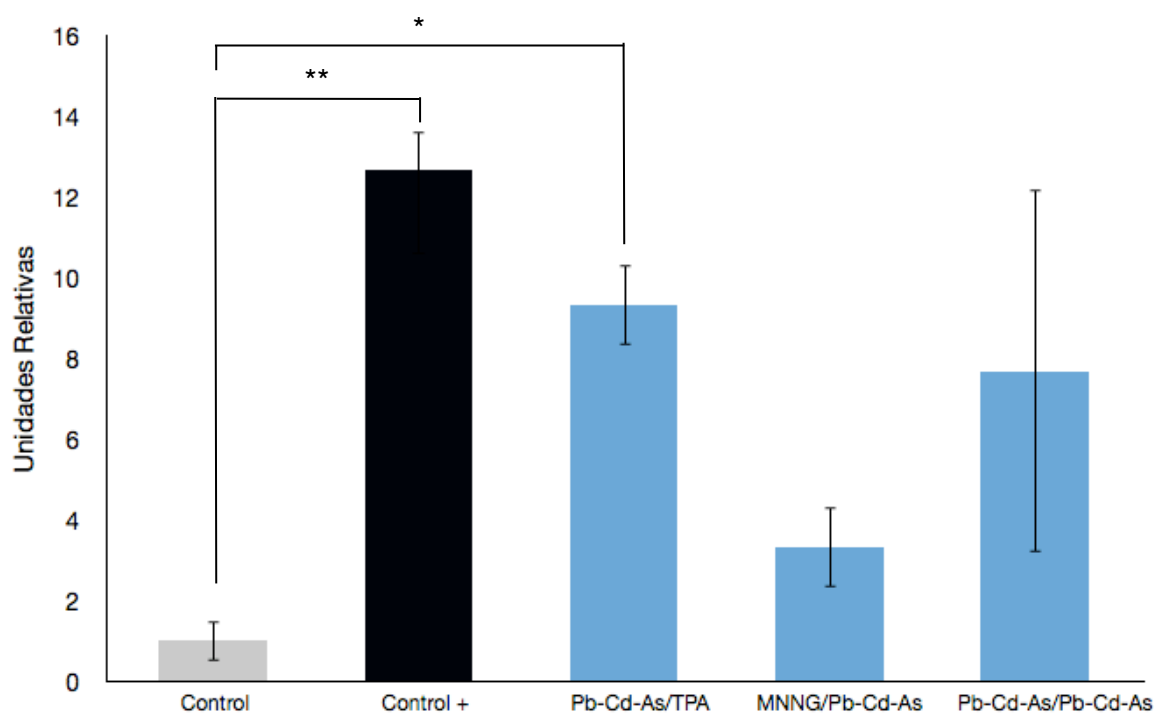


Fig 5. Eficiencia relativa de formación de colonias. Conteo de focos de transformación celular, tras 25 días de cultivo, identificados por tinción de Giemsa intensa, diámetro mayor o igual a 2 mm, orientación celular azarosa y crecimiento en multi-capas. Células Balb/c 3T3 bajo condiciones control, tratadas solo con el promotor (TPA), tratadas solo con el iniciador (MNNG) o tratadas usando la mezcla de metales como iniciador (Pb-Cd-As/TPA), como promotor (MNNG/Pb-Cd-As) o como ambos (Pb-Cd-As/Pb-Cd-As). Para el control positivo de transformación se utiliza MNNG como iniciador y TPA como promotor. n = 2. Anova de una vía, ** p<0.01, * p<0.05

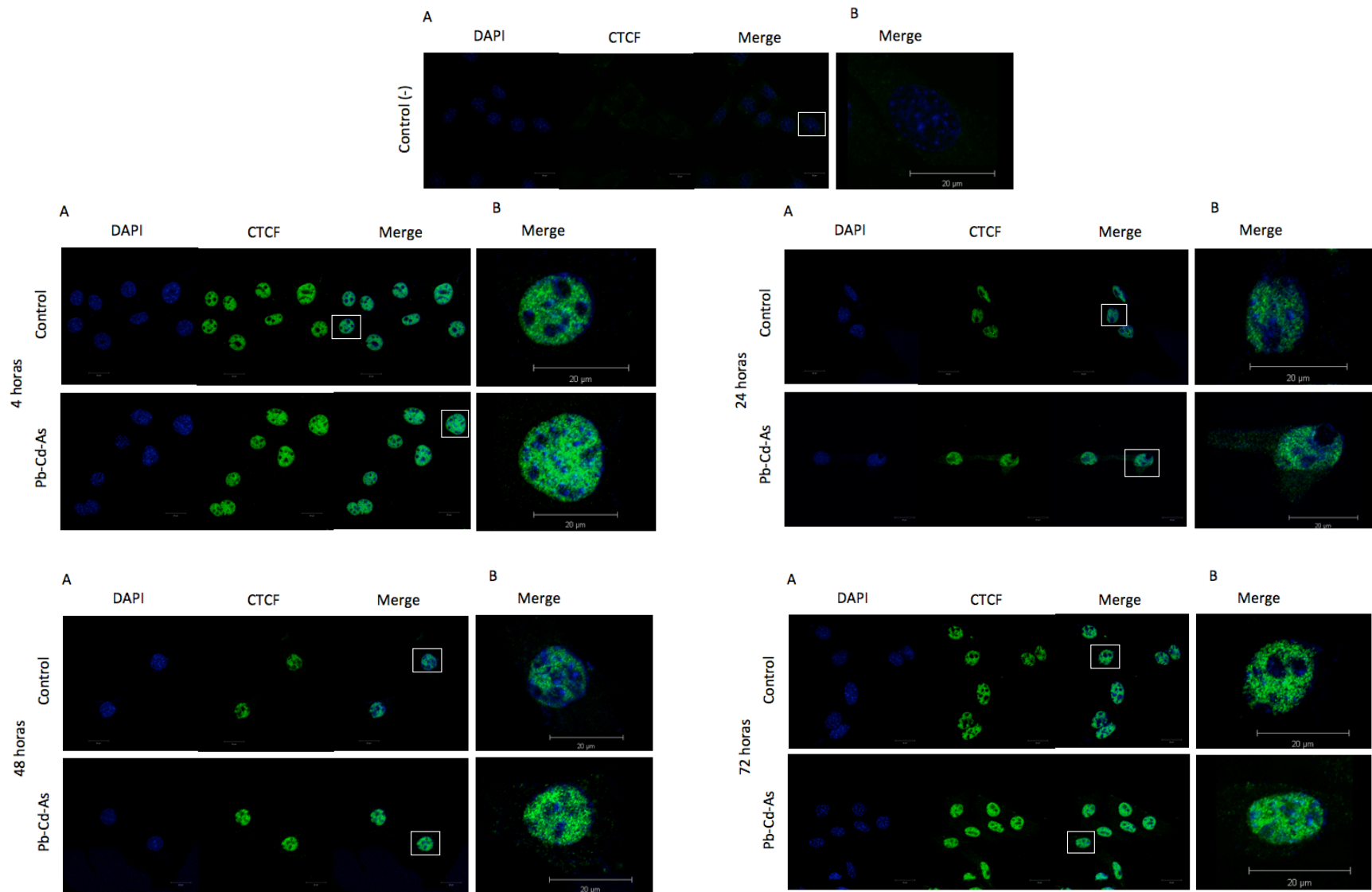


Fig 6. Efecto del tratamiento con la mezcla de metales sobre la localización de CTCF. (A) Inmuno-detección de CTCF (verde) en células Balb/c 3T3 bajo condiciones control y a las 4, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento con Pb-Cd-As. Contraintención nuclear realizada con DAPI (azul). (B) Amplificación digital del recuadro mostrado en A. Panel superior, control negativo. 66x

Efecto de la mezcla de Pb-Cd-As sobre CTCF

Con el propósito de evaluar los efectos de la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As sobre la localización del factor nuclear, se realizó una inmunofluorescencia contra CTCF para determinar si el tratamiento con la mezcla de metales inducía algún cambio en su localización y/o abundancia relativa (Fig 6).

El análisis confocal y las reconstrucciones realizadas a partir de las células en condiciones control y de aquellas tratadas por cuatro horas con MNNG mostraron que después de 72 horas CTCF se localiza únicamente en el núcleo. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la marca se distribuye en las regiones de cromatina laxa. Sin embargo, en las células tratadas por cuatro horas con la mezcla de Pb-Cd-As, el análisis mostró como la marca de CTCF ahora, además de ser nuclear, se observa en el citoplasma, con una distribución casi uniforme a través del nucleoplasma. Estos resultados nos llevan a suponer que la exposición aguda a la mezcla de Pb-Cd-As es capaz de comprometer la localización de CTCF.

Con base en este resultado y debido a la capacidad que CTCF tiene por proteger las islas CpGs de su metilación aberrante, se buscó determinar si su re-localización inducía cambios en el estado de metilación global y/o local del genoma durante la transformación celular.

Análisis global de metilación

A fin de evaluar el estado global de metilación en las células expuestas a la mezcla de Pb-Cd-As se hizo un ensayo cometa modificado usando NotI, una enzima de restricción sensible al estado de metilación del DNA (Fermentas) y se estimó el estado de metilación del DNA basándonos en el porcentaje del DNA que migró a lo largo del gel durante la electroforesis (i.e. porcentaje de DNA en la cola del cometa). El análisis anterior tiene como base teórica el hecho de que NotI es incapaz de realizar el corte endonucleolítico cuando la primera citosina de su secuencia blanco está metilada (C5met), así que un incremento en la tasa de metilación a nivel genómico produce una disminución en el sustrato de esta enzima y con ello una disminución en el porcentaje de DNA en la cola de los cometas.

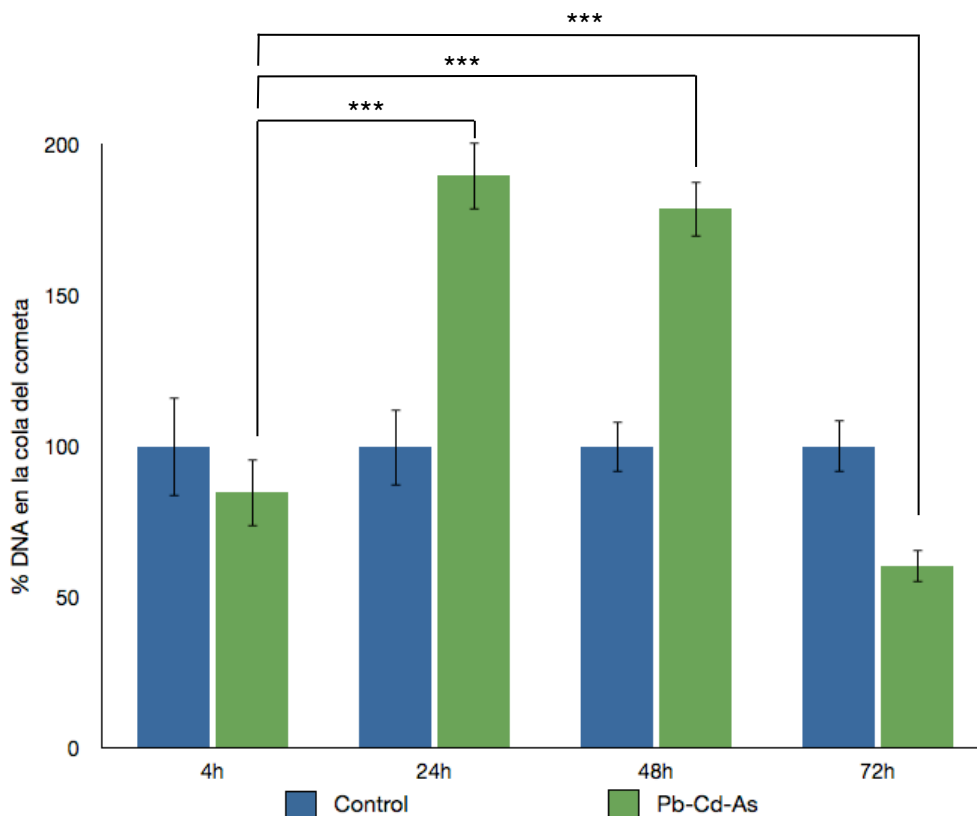


Fig 7. Porcentaje de DNA en la cola del cometa. Ensayo cometa modificado con la enzima sensible a metilación NotI. Nucleoides provenientes de células Balb/c 3T3 en condiciones control o tratadas con la mezcla de Pb-Cd-As. n = 2. T de Student, *** p<0.001

Al comparar los valores obtenidos de los diferentes días de muestreo se observó que, con relación al control, el DNA estaba hipometilado a las 24 y 48 horas post-exposición a la mezcla de metales (Fig 7). Sin embargo, a las 72 horas post-exposición se presentó una disminución en el porcentaje de DNA en la cola de los cometas, lo cual sugiere una hipermetilación en el genoma celular a las 72 horas del ensayo de transformación. De este modo, se corroboró que la exposición por 4 horas a la mezcla de metales puede alterar los patrones de metilación de las células expuestas.

Selección de genes candidatos para el análisis local de metilación

Con el propósito de determinar si los cambios en el estado de metilación podían repercutir directamente en el perfil de expresión génica, se decidió evaluar el estado de metilación de los promotores de algunos genes candidatos. Éstos se escogieron con base en los resultados de un micro-arreglo de mRNA realizado previamente en nuestro grupo de trabajo para la línea celular Balb/c 3T3 y bajo las condiciones antes descritas. Se evaluaron los cambios en la expresión génica inducidos por la exposición a la mezcla de

metales en la fase de iniciación (72 horas). De la plétora de genes que se encontraron sub-expresados (< -1.5 veces de cambio) se seleccionaron aquellos cuyas regiones promotoras correspondieran a islas CpG y unieran a CTCF *in vivo*, para lo cual se consultó la base de datos de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC, n.d.).

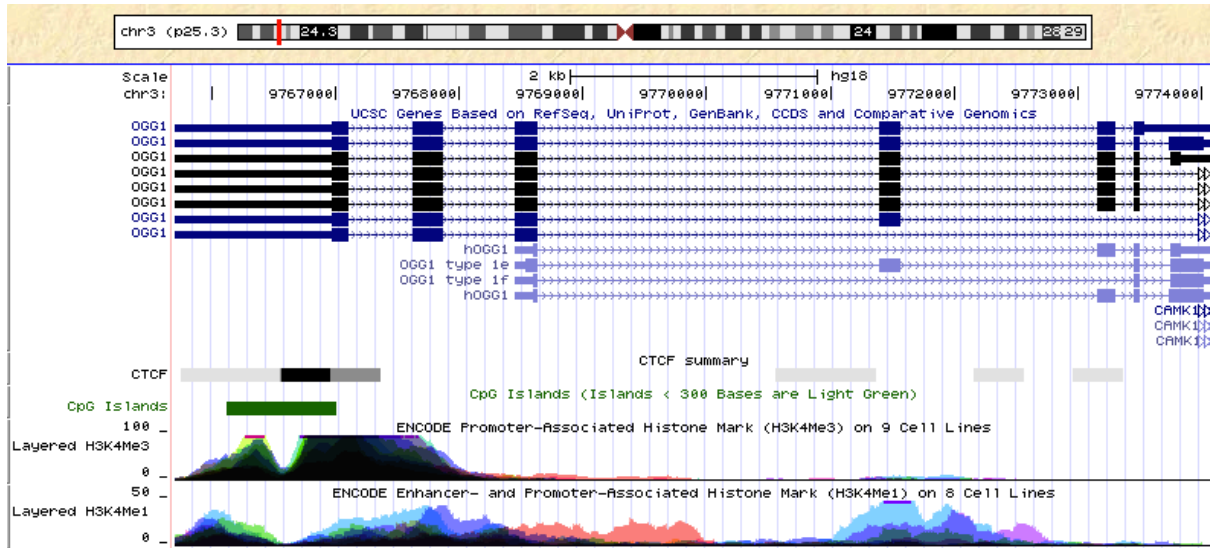


Fig 8. Esquema de la región promotora de *ogg1*. En la parte superior del esquema se muestra la posición del gen *ogg1* en el cromosoma humano 3 (3p25). En la parte inferior se muestra, en orden descendente, el marco de lectura del gen así como sus variantes de *splicing*, el sitio de unión de CTCF, la isla CpG asociada al promotor y las marca de histonas asociadas a promotores H3K4Me3 y H3K4Me1. Tomado de UCSC Genome Browser.

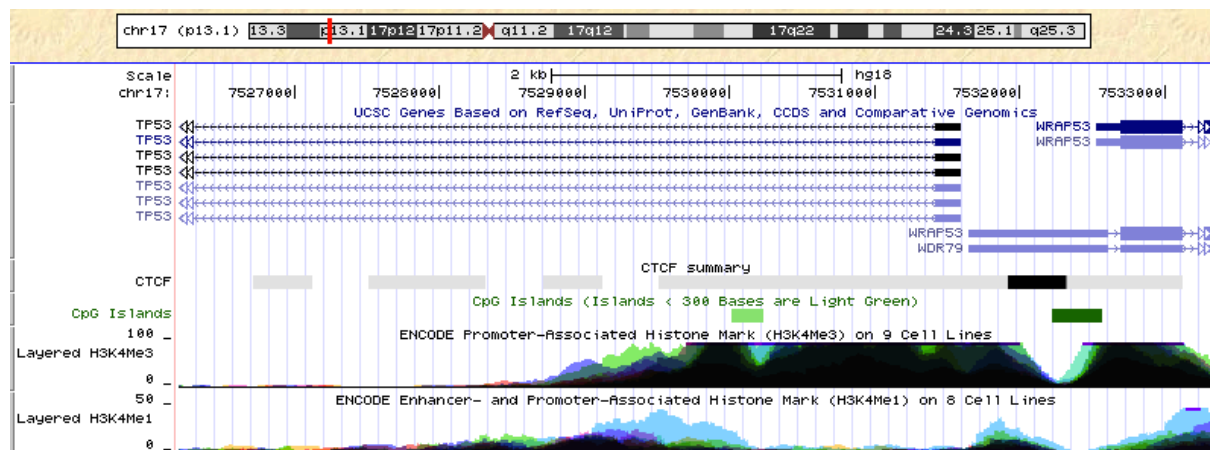


Fig 9. Esquema de la región promotora de *p53*. En la parte superior del esquema se muestra la posición del gen *p53* en el cromosoma humano 17 (17p13). En la parte inferior se muestra, en orden descendente, el marco de lectura del gen así como sus variantes de *splicing*, el sitio de unión de CTCF, la isla CpG asociada al promotor y las marca de histonas asociadas a promotores H3K4Me3 y H3K4Me1. Tomado de UCSC Genome Browser.

Los genes seleccionados fueron el de la 8-hidroxiguanosina DNA glicosilasa (*ogg1*, Fig 8.) y el supresor tumoral *p53* (Fig 9.). El primero debido a que algunos estudios indican que la exposición a metales compromete la vía de reparación por escisión de bases, en donde ésta participa. El supresor tumoral *p53* se escogió como control negativo de metilación durante la exposición a metales, puesto que es sabido que el promotor de este gen no se regula por metilación del DNA, sino por modificaciones de histonas (Soto-Reyes y Recillas-Targa, 2010).

Análisis local de metilación con MS-PCR

Se hicieron PCRs sensibles a metilación (MS-PCR) en donde los oligonucleótidos para *ogg1* mostraron una diferencia en el estado de metilación entre las muestras obtenidas a las cuatro y 72 horas post-exposición a la mezcla de metales. En todos los casos hubo amplificación de las secuencias reconocidas por ambos tipos de oligonucleótidos, pero el apareamiento de los oligonucleótidos diseñados para reconocer las secuencias metiladas fue mayor con las muestras obtenidas a las 72 horas post-exposición (Fig 10).



Fig 10. PCR sensible a la metilación (MS-PCR) de la región promotora del gen *ogg1* murino. Amplificación con oligos para secuencias no-metiladas (U) y metiladas (M) de muestras con 4 y 72 horas post-tratamiento modificadas con bisulfito de sodio. DNA metilado *in vitro* (IVD) usado como control positivo de amplificación para los oligos de secuencias metiladas. DNA obtenido de células Balb/c 3T3 cultivados bajo condiciones control o tratadas con la mezcla de Pb-Cd-As.

Por otro lado y consistente con los datos publicados, al usar los oligonucleótidos para *p53* solo hubo amplificación en las muestras en las que se usaron los oligonucleótidos diseñados para reconocer las secuencias no-metiladas (Fig 11). Se usó DNA metilado *in*

in vitro (IVD, por sus siglas en inglés) como control positivo de amplificación para los oligonuclótidos diseñados para reconocer las secuencias metiladas.



Fig 11. PCR sensible a la metilación (MS-PCR) de la región promotora del gen *p53* murino. Amplificación con oligos para secuencias no-metiladas (U) y metiladas (M) de muestras con 4 y 72 horas post-tratamiento modificadas con bisulfito de sodio. DNA metilado *in vitro* (IVD) usado como control positivo de amplificación para los oligos de secuencias metiladas. DNA obtenido de células Balb/c 3T3 cultivados bajo condiciones control o tratadas con la mezcla de Pb-Cd-As.

Análisis local de metilación por secuenciación

En vista de las diferencias en el estado de metilación que fueron evidenciadas con el ensayo de MS-PCRs, se decidió comprobar por medio de la transformación del DNA genómico con bisulfito de sodio, amplificación, clonación y secuenciación de los productos, el patrón específico para cada CpG de las secuencias de los promotores de los genes analizados. Al alinear las secuencias generadas se pudo observar que el tratamiento con la mezcla de metales indujo un incremento del 43.15% en la metilación de la región analizada de la isla asociada al promotor de *ogg1*, sin embargo este fenómeno solo se pudo apreciar 72 horas después de la exposición a la mezcla de metales (Fig 12). De modo opuesto, la región analizada en la isla CpG asociada al promotor de *p53* no mostró un cambio representativo en su estado de metilación a causa del tratamiento con la mezcla de metales (Fig 13).

Las MS-PCRs y la secuenciación de sus productos, mostraron que en efecto hay un cambio en la metilación de la región promotora del gen analizado, mismo que se encuentra sub-expresado en el micro-arreglo antes descrito. Más aún, que este cambio es dependiente de la exposición aguda a la mezcla de Pb-Cd-As.

OGGI

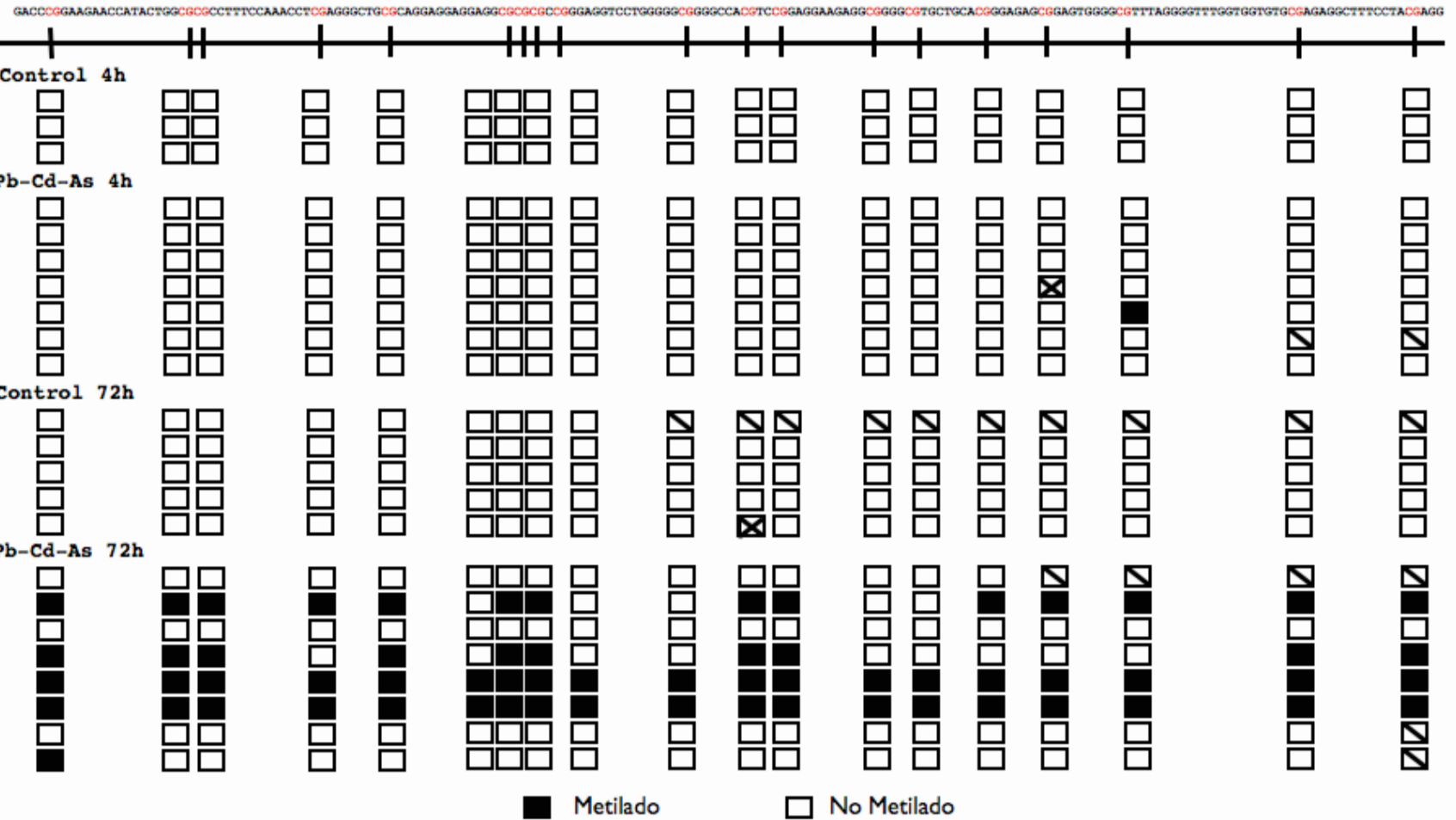


Fig 12. Análisis del estado de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación del promotor del gen *ogg1* murino. Amplificación de una región de 200 pb del promotor de *ogg1*. Muestras con 4 y 72 horas post-tratamiento convertidas por bisulfito de sodio. DNA obtenido de células Balb/c 3T3 cultivados bajo condiciones control (Co) o tratadas con la mezcla de Pb-Cd-As. Los cuadros negros representan CpGs metilados y los blancos CpGs no-metilados. (X) Nucleótidos mutados. (N) Nucleótidos que no fueron secuenciados.

p53

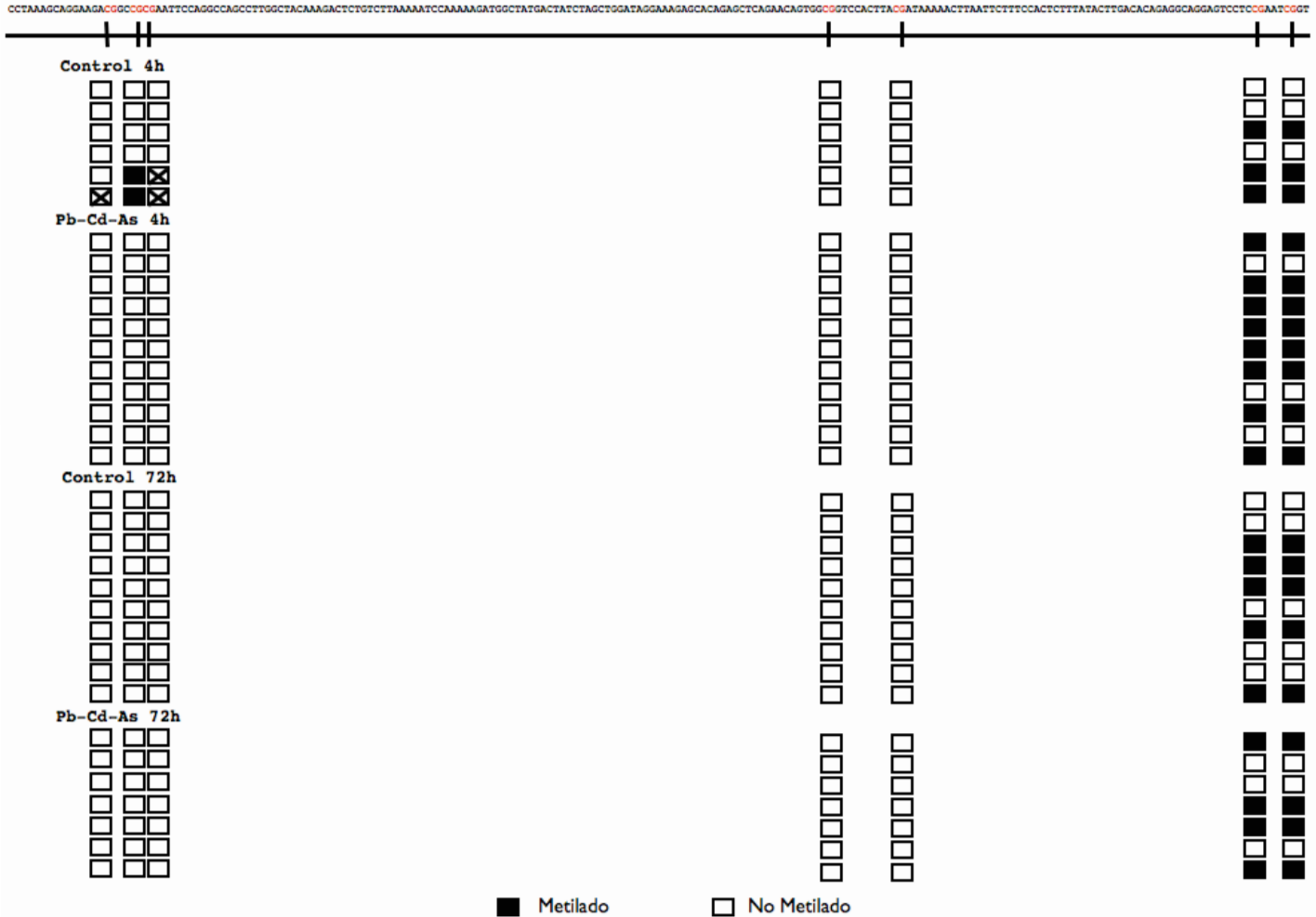


Fig 13. Análisis del estado de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación del promotor del gen *p53* murino. Amplificación de una región de 200 pb del promotor de p53. Muestras con 4 y 72 horas post-tratamiento convertidas por bisulfito de sodio. DNA obtenido de células Balb/c 3T3 cultivados bajo condiciones control (Co) o tratadas con la mezcla de metales (Me). Los cuadros negros representan CpGs metilados y los blancos CpGs no-metilados. (X) Nucleótidos mutados.

DISCUSIÓN

La exposición a la mezcla de Pb-Cd-As a concentraciones de relevancia epidemiológica fue capaz de inducir ciertas alteraciones asociadas a la regulación epigenética de la homeostasis celular. De manera específica, la inmunofluorescencia mostró como la exposición a la mezcla de metales es capaz de alterar parcialmente la localización nuclear de CTCF, una proteína con funciones que van desde regulación transcripcional hasta organizador espacial del genoma, puesto que la marca fluorescente de dicho factor se encontró dispersa en el interior del núcleo e inclusive fuera de éste, en el citosol. Como ya se mencionó, este fenómeno se ha descrito previamente en casos de cáncer de mama esporádico, sin embargo las inmunohistoquímicas donde se detectó el desplazamiento de CTCF al citoplasma celular provenían de biopsias de tumores, por lo que podría pasar por un evento tardío en el proceso tumorigénico (Butcher y Rodenhiser, 2007). En nuestro caso este fenómeno fue evidente 72 horas después de dar inicio a un proceso de transformación celular inducido por la exposición conjunta a Pb-Cd-As, lo que habla de un evento considerablemente temprano en la tumorigénesis. La des-localización de CTCF y el consecuente silenciamiento de genes debido a la metilación del DNA puede explicar los cambios en la expresión génica observados desde fases tempranas en el proceso de transformación celular. Cabe mencionar que, debido a que el efecto de des-localización fue exclusivo del tratamiento con la mezcla de metales, la transformación celular que desencadena la exposición al mutágeno MNNG debe llevarse a cabo a través de mecanismos alternos, independientes del silenciamiento por metilación de los genes que aparecen sub-expresados en el microarreglo antes mencionado.

El análisis del ensayo cometa modificado mostró que la exposición de 4 horas a la mezcla de Pb-Cd-As fue capaz de inducir la hipometilación del DNA a nivel global, pasadas 24 y 48 horas de exposición. De manera interesante, este fenómeno fue temporal, lo que apunta a un proceso de re-metilación del DNA, que ocasiona la hipermetilación observada a las 72 horas post-exposición y que fue evidenciada por la disminución en los sitios de corte disponibles para la enzima sensible al estado de metilación Not I. El comportamiento observado ha sido propuesto previamente por Mass y Wang (1997) para adjudicar los patrones del fenotipo metilador en cáncer a un

fenómeno secuencial desencadenado por un agente exógeno que induce la hipometilación de regiones normalmente metiladas (i.e. secuencias repetidas, regiones pericentroméricas, regiones teloméricas, etc.). La disminución en la tasa global de metilación activa a las metil-transferasas *de novo* (DNMT3a/b) como mecanismo de protección de la integridad del genoma pero, a causa de una regulación ineficiente, las metil-transferasas metilan secuencias que antes estaban desmetiladas. Ellos proponen que esto da origen a la hipermetilación local, también característica del genoma celular en cáncer (Takiguchi et al., 2003). Nuestros resultados indican que la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As tiene la capacidad de alterar de manera epigenética el estado basal de la célula al poco tiempo de la exposición. Es debido a que estas alteraciones pueden ser transmitidas a la siguiente generación celular que el efecto de la exposición a Pb-Cd-As sobre la metilación del genoma podría dar inicio fácilmente a la selección clonal que conduce a la transformación celular.

En cuanto a la evaluación del grado local de metilación tras la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As, los resultados de la amplificación con la MS-PCR muestran como el tratamiento aumentó la tasa de metilación en la región analizada del promotor de *ogg1*. Si bien el efecto no fue total, como se aprecia por la amplificación constante con los oligonucleótidos que reconocen las secuencias no-metiladas, si hubo un enriquecimiento en la marca epigenética de esta secuencia, mismo que fue confirmado mediante el protocolo de transformación del DNA por bisulfito de sodio y secuenciación.

Los resultados confirmaron de manera cuantitativa que el tratamiento con la mezcla de Pb-Cd-As conduce a un incremento en la metilación de la región analizada del promotor de *ogg1*. Se observaron varios grados de metilación a lo largo de la región promotora del mismo gen. A pesar de que 4 horas después de la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As la secuencia analizada resultó estar prácticamente desmetilada (apenas un 0.76% de metilación), se amplificó la misma secuencia usando los oligonucleótidos diseñados para reconocer dinucleótidos CpG metilados. Aunque esta amplificación fue similar a la que se presentó en el grupo control, no es despreciable porque fue mayor al grado de metilación observado en el gen *p53*, nuestro gen control. Esto se puede deber a que, a pesar de que el protocolo de MS-PCR solamente analiza el grado de metilación en una porción muy reducida del gen, el resultado se obtiene a partir del DNA extraído de todo

un cultivo celular. Si existiera DNA metilado en la región promotora del gen *ogg1*, por poco que fuera, sería amplificado y su presencia se vería reflejada después de la electroforesis. Es por ello que la ausencia de metilación en el mismo grupo, de acuerdo con los resultados del protocolo de bisulfito de sodio y secuenciación, se puede deber a que la cantidad de secuencias generadas por la PCR es muchas veces mayor que la cantidad de clonas que se generaron a partir de ellas, ya que cada bacteria adquiere, en teoría, una sola variante del promotor de *ogg1*. De este modo, si el DNA metilado era poco, no se vería en la secuenciación final, a menos que se incrementara considerablemente la cantidad de clonas para el análisis.

Cabe hacer énfasis en que las condiciones de experimentación empleadas han sido aprobadas por la IARC para la identificación de xenobióticos, o mezclas de éstos, que representen un riesgo a la salud pública por su capacidad carcinogénica, de modo que los resultados obtenidos vislumbran, a nivel molecular, algunos de los eventos involucrados en el proceso carcinogénico temprano desencadenado por la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As. Más aún, estos mecanismo también pueden estar presentes en la malignización de células humanas comprometidas en un proceso tumorigénico a causa de la exposición a la mezcla de metales, debido a que la región promotora analizada está conservada en el genoma humano con un porcentaje de identidad del 73% (NCBI, n.d.). Esta misma zona ha sido identificada por el grupo de Barski et al., (2007) como una región enriquecida en CTCF y puesto que los sitios de unión a CTCF también están conservados en vertebrados (Siepel et al., 2005; Kim et al., 2007), propusimos que en el genoma murino el factor de transcripción CTCF también juega un papel regulatorio a nivel epigenético.

Para ponderar esta teoría evaluamos *in silico* la región promotora del gen *ogg1* murino en busca de sitios potenciales de unión a CTCF (University of Essex, n.d.) e identificamos cuatro sitios probables para la unión del factor de transcripción en la secuencia analizada. Ahora bien, dado que se sabe de la unión de cerca de 15000 sitios para CTCF en el genoma (Xie et al., 2007) y que dichos sitios se encuentran muy conservados, se puede deducir que en el genoma murino la región promotora de *ogg1* también está flanqueada por CTCF. Esto permitiría una cromatina permisiva a la transcripción pero, ante la disociación de este factor de transcripción inducida por la mezcla de Pb-Cd-As, el

promotor se vuelve susceptible al efecto de las metil-transferasas, lo cual conduce al eventual silenciamiento del gen, favoreciendo el proceso de transformación celular. Sin embargo, aún resta comprobar dicho supuesto de manera experimental en los fibroblastos murinos empleados en el modelo de transformación de dos fases.

CONCLUSIÓN

El proceso de transformación celular desencadenado por la mezcla de Pb-Cd-As se vale de varios mecanismos, dentro de los cuales se encuentran aquellos que involucran la regulación epigenética. El trabajo realizado corroboró esto con el análisis del estado global de metilación y el estudio de secuencias específicas y nos permitió confirmar que la des-localización de CTCF observada después de una exposición a Pb-Cd-As, es capaz de alterar los patrones celulares de metilación del DNA. Aunado a esto, el estudio nos permitió ratificar que se puede presentar una hipermetilación específica en los promotores de los genes asociados a islas CpGs, lo que nos permite suponer que la sub-expresión de los genes detectados con el microarreglo se puede deber al silenciamiento causado por la metilación de sus promotores. Si bien únicamente se evaluó un gen blanco (*ogg1*) de los muchos candidatos que arrojó el microarreglo del transcriptoma analizado, el resultado indica que la hipótesis es correcta y que la des-localización de CTCF propicia la hipermetilación y el silenciamiento de algunos de los genes que impiden la transformación celular.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos muestran que los patrones de metilación se ven alterados ante la exposición a la mezcla de Pb-Cd-As, pero resta verificar que dicho fenómeno sea ocasionado por el desplazamiento del factor nuclear CTCF. Por esta razón, conviene refinar el trabajo aquí descrito puntualizando el análisis de la localización del factor de transcripción. Para conocer la proporción de la des-localización de ésta proteína, se propone evaluar su concentración en fracciones nucleares y citoplásmicas. De este modo

se pueden comprobar de manera cuantitativa los resultados de las inmunofluorescencias y las reconstrucciones realizadas a partir de ellas.

En cuanto al desplazamiento del factor de transcripción, se propone confirmar esta hipótesis inmuno-precipitando las secuencia a las que se une CTCF en los genes analizados y así corroborar si el efecto evidenciado en este trabajo se genera por la disociación de la proteína después del tratamiento con la mezcla de Pb-Cd-As. Sin embargo, aún falta confirmar si los metales de la mezcla utilizada son capaces de desplazar al Zn del sitio de coordinación que ocupa en las estructuras de dedos zinc. Esto puede ser evaluado por microscopía electrónica, a fin de identificar la ubicación de los iones metálicos en el interior de la célula y a la vez verificar si éstos colocalizan con la proteína CTCF.

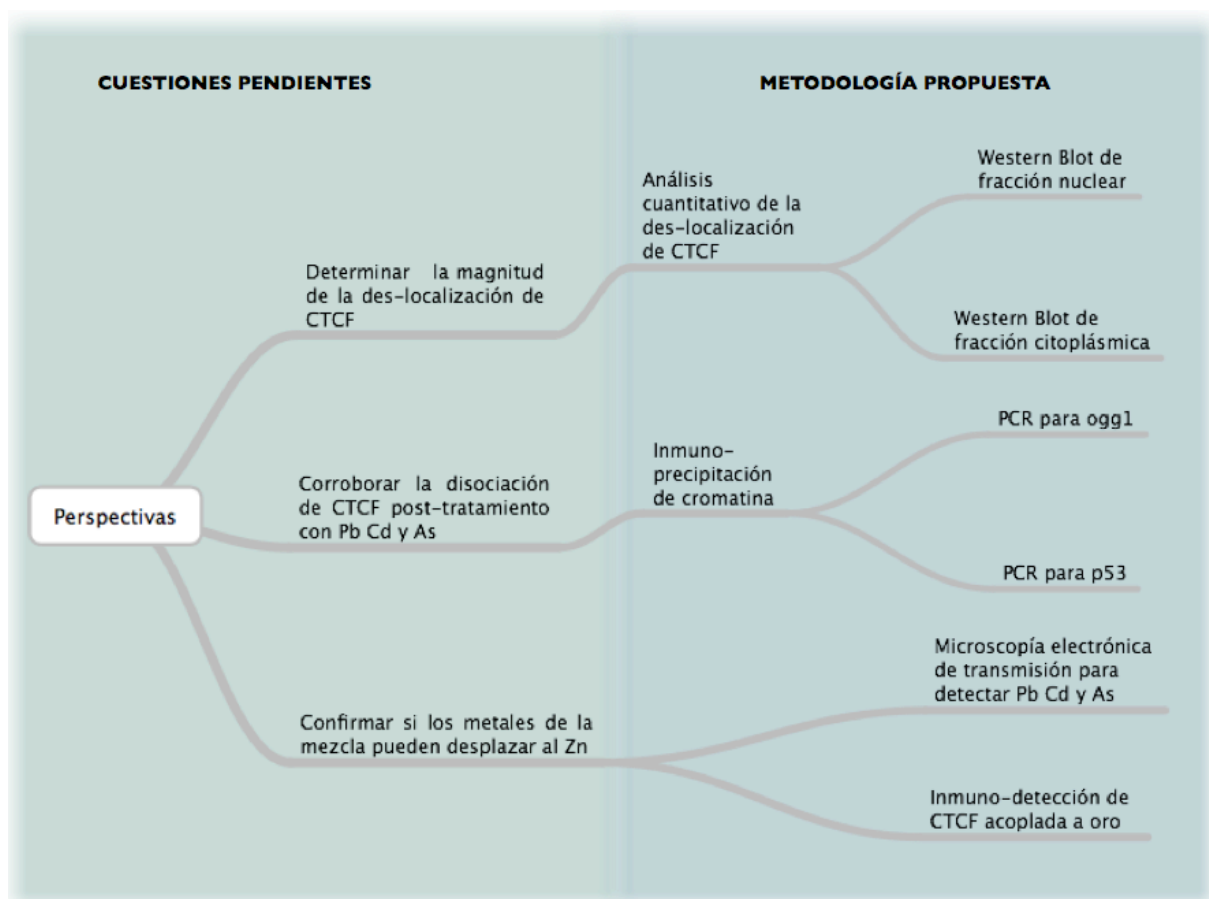


Fig 14. Diagrama de flujo de las perspectivas del proyecto. El panel izquierdo muestra las cuestiones del proyecto que quedan pendientes por estudiar y el panel derecho muestra la metodología con la que se propone resolver cada una de ellas.

REFERENCIAS

- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahy, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., et al. (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *The EMBO Journal*, 23(3), 605–615.
- Allis, C. D. (2007). *Epigenetics*. CSHL Press, Capítulos 3, 19 pp. 41, 371-372.
- Ames, B. N. (1991). Carcinogenesis mechanisms: the debate continues. *Science*, 252(5008), 902–904.
- Ames, B. N., y Gold, L. S. (1990). Carcinogenesis debate. *Science*, 250(4987), 1498–1499.
- Arita, A., y Costa, M. (2009). Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics*, 1(3), 222.
- Asmuss, M., Mullenders, L. H. F., Eker, A., y Hartwig, A. (2000). Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis*, 21(11), 2097–2104.
- ATSDR. (2004). Interaction profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead. (M. Costa, I. Harding-Barlow, y D. Hodgson, Eds.) *ATCDR*, 1–181.
- Bandyopadhyay, D., Curry, J. L., Lin, Q., Richards, H. W., Chen, D., Hornsby, P. J., Timchenko, N. A., et al. (2007). Dynamic assembly of chromatin complexes during cellular senescence: implications for the growth arrest of human melanocytic nevi. *Aging Cell*, 6(4), 577–591.
- Barros, S. P., y Offenbacher, S. (2009). Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease. *Journal of Dental Research*, 88(5), 400–408.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., et al. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823–837.

- Basha, M. R., Wei, W., Brydie, M., Razmiafshari, M., y Zawia, N. H. (2003). Lead-induced developmental perturbations in hippocampal Sp1 DNA-binding are prevented by zinc supplementation: in vivo evidence for Pb and Zn competition. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 21(1), 1–12.
- Baylin, S. B., Höppener, J. W., de Bustros, A., Steenbergh, P. H., Lips, C. J., y Nelkin, B. D. (1986). DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Research*, 46(6), 2917–2922.
- Baylin, S. B., y Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews in Cancer*, 7, 1–9.
- Benbrahim-Tallaa, L., Waterland, R. A., Dill, A. L., Webber, M. M., y Waalkes, M. P. (2007). Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo DNA methyltransferase. *Environmental Health Perspectives*, 115(10), 1454–1459.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315–326.
- Beyersmann, D., y Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82(8), 493–512.
- Bhusari, S. S., Dobosy, J. R., Fu, V., Almassi, N., Oberley, T., y Jarrard, D. F. (2010). Superoxide dismutase 1 knockdown induces oxidative stress and DNA methylation loss in the prostate. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 5(5), 402–409.
- Boban, M., Braun, J., y Foisner, R. (2010). Lamins: “structure goes cycling.” *Biochemical Society Transactions*, 38(1), 301.

- Branco, M. R., Ficz, G., y Reik, W. (2011). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 7–13.
- Breivik, J., y Gaudernack, G. (1999). Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*, 9(4), 245–254.
- Butcher, D. T., y Rodenhiser, D. I. (2007). Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 43(1), 210–219.
- Butcher, D. T., Mancini-DiNardo, D. N., Archer, T. K., y Rodenhiser, D. I. (2004). DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 111(5), 669–678.
- Casarett, L. J., Doull, J., y Klaassen, C. D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. (7th ed., Klaassen C. D., Ed.), McGraw-Hill Medical Publishing Division. pp. 1–1331.
- Chi, P., Allis, C. D., y Wang, G. G. (2010). Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 10(7), 457–469.
- Chung, A. S., Lee, J., y Ferrara, N. (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 10, 505–514.
- Collins, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation research*, 681(1), 24–32.
- Crea, F. (2012). Histone code, human growth and cancer. *Oncotarget*, 3(1) 1-2.
- Creton, S., Aardema, M. J., Carmichael, P. L., Harvey, J. S., Martin, F. L., Newbold, R. F., O'donovan, M. R., et al. (2011). Cell transformation assays for prediction of

- carcinogenic potential: state of the science and future research needs. *Mutagenesis*, 27(1), 1–9.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D. E., Roh, T.-Y., Cui, K., y Zhao, K. (2008). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Research*, 19(1), 24–32.
- Dávalos-Salas, M., Furlan-Magaril, M., González-Buendía, E., Valdes-Quezada, C., Ayala-Ortega, E., y Recillas-Targa, F. (2011). Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC cancer*, 11, 232.
- De la Rosa-Velazquez, I. A., Rincon-Arano, H., Benitez-Bribiesca, L., y Recillas-Targa, F. (2007). Epigenetic Regulation of the Human Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene Promoter by CTCF. *Cancer Research*, 67(6), 2577–2585.
- Di Nardo, D. N., Butcher, D. T., Robinson, D. P., Archer, T. K., y Rodenhiser, D. I. (2001). Functional analysis of CpG methylation in the BRCA1 promoter region. *Oncogene*, 20(38), 5331–5340.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286–298.
- Esteller, M. (2005). Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *The Journal of Pathology*, 205(2), 172–180.
- Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports*, 3(9), 1–6.
- Fang, M. Z., Kim, D. Y., Lee, H. W., y Cho, M. H. (2001). Improvement of in vitro two-stage transformation assay and determination of the promotional effect of cadmium. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 15(3), 225–231.
- Felsenfeld, G. y Bell, A. C. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 405(6785), 482–485.

- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., y Ames, B. N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(12), 4533–4537.
- Fraga, M. F., y Esteller, M. (2005). Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, *4*(10), 1377–1381.
- Galaris, D., y Evangelou, A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, *42*(1), 93–103.
- Gan, Q., Yoshida, T., Mcdonald, O. G., y Owens, G. K. (2007). Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *25*(1), 2–9.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- Handoko, L., Xu, H., Li, G., Ngan, C. Y., Chew, E., Schnapp, M., Lee, C. W. H., et al. (2011). CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nature Genetics*, *43*(7), 630–638.
- Hartwig, A., Asmuss, M., y Ehleben, I. (2002). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environmental Health Perspectives* *110*(5), 797-799.
- Holliday, R., y Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, *187*(4173), 226–232.
- Hou, C., Dale, R., y Dean, A. (2010). Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(8), 3651–3656.

- Hou, L., Wang, D., y Baccarelli, A. (2011). Environmental chemicals and microRNAs. *Mutation research*, 714(1-2), 105–112.
- Issa, J.-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 988–993.
- Jiang, G., Duan, W., Xu, L., Song, S., Zhu, C., y Wu, L. (2009). Biphasic effect of cadmium on cell proliferation in human embryo lung fibroblast cells and its molecular mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 23(6), 973–978.
- Jiang, G., Xu, L., Song, S., Zhu, C., Wu, Q., Zhang, L., y Wu, L. (2008). Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology*, 244(1), 49–55.
- Kajiwara, Y., y Ajimi, S. (2003). Verification of the BALB/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicology in vitro*, 17(4), 489–496.
- Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., Smith, A. D., Ching, K. A., Loukinov, D. I., Green, R. D., Zhang, M. Q., et al. (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*, 128(6), 1231–1245.
- Klaunig, J. E., y Kamendulis, L. M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 239–267.
- Larsen, F., Glenn, G., Rodrigo, L., y Prydz, H. (1992). CpG Islands as Gene Markers in the Human Genome. *Genetics*, 1095–1107.
- Lienert, F., Wirbelauer, C., Som, I., Dean, A., Mohn, F., & Schübeler, D. (2011). Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature*, 43(11), 1091–1097.
- Madden, E. F., Akkerman, M., y Fowler, B. A. (2002). A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52 and human HK-2 kidney cell lines

- following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(1), 24–32.
- Martin, D. I., Cropley, J. E., y Suter, C. M. (2011). Epigenetics in disease: Leader or follower? *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 6(7), 843–848.
- Martin-Kleiner, I. (2011). BORIS in human cancers – A review. *European Journal of Cancer*, 1–7.
- Martinez-Zamudio, R., y Ha, H. C. (2011). Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 6(7), 820–827.
- Mass, M. J., y Wang, L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation research*, 386(3), 263–277.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein B. E., Nusbaum C., Jaffe D. B., Gnirke A., Jaenisch R., Lander E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766–770.
- Mena, S., Ortega, A., y Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation research*, 674(1-2), 36–44.
- Méndez-Gómez, J., García-Vargas, G.-G., López-Carrillo, L., Calderón-Aranda, E.-S., Gómez, A., Vera, E., Valverde, M., et al. (2008). Genotoxic Effects of Environmental Exposure to Arsenic and Lead on Children in Region Lagunera, Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1140(1), 358–367.
- Merzenich, H., Hartwig, A., Ahrens, W., Beyersmann, D., Schlepegrell, R., Scholze, M., Timm, J., et al. (2001). Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention :*

a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 10(5), 515–522.

NCBI. (n.d.). National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. NCBI.

Ohlsson, R., Lobanenkov, V., y Klenova, E. (2010). Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *BioEssays*, 32(1), 37–50.

Ohmori, K., Sasaki, K., Asada, S., Tanaka, N., y Umeda, M. (2004). An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutation research*, 557(2), 191–202.

Ong, C.-T., y Corces, V. G. (2009). Insulators as mediators of intra- and inter-chromosomal interactions: a common evolutionary theme. *Journal of biology*, 8(8), 73.

Ottaviani, A., Schluth-Bolard, C., Rival-Gervier, S., Boussouar, A., Rondier, D., Foerster, A. M., Morere, J., et al. (2009). Identification of a perinuclear positioning element in human subtelomeres that requires A-type lamins and CTCF. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(16), 2428–2436.

Pérez Duarte, F. Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA1-1993. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas suspendidas totales (PST). NOM-024-SSA1-1993.

Predki, P. F., y Sarkar, B. (1992). Effect of replacement of “zinc finger” zinc on estrogen receptor DNA interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(9), 5842–5846.

Predki, P. F., y Sarkar, B. (1994). Metal Replacement in “Zinc Finger” and Its Effect on DNA Binding. *Environmental Health Perspectives*, 102(3), 195–198.

Ramírez, A. (2002). Cadmium toxicology. Current concepts to determine environmental or occupational exposition by means of biological indicators. *Anales de la Facultad*

de Medicina. http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/Anales/v63_n1/Toxicologia.htm

- Rebois, R. V. R., y Patel, J. J. (1985). Phorbol ester causes desensitization of gonadotropin-responsive adenylate cyclase in a murine Leydig tumor cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(13), 8026–8031.
- Recillas-Targa, F., La Rosa-Velázquez, De, I. A., y Soto-Reyes, E. (2011). Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 89(5), 479–488.
- Reichard, J. F., y Puga, A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics*, 2(1), 87–104.
- Ren, X., Mchale, C. M., Skibola, C. F., Smith, A. H., Smith, M. T., y Zhang, L. (2010). An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation in Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 119(1), 11–19.
- Riggs, A. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 14, 9–25.
- Rodríguez-Paredes, M., y Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*, 330–339.
- Rojas, E., Herrera, L. A., Poirier, L. A., y Ostrosky-Wegman, P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutation research*, 443(1-2), 157–181.
- Rojas, E., Valverde, M., Lopez, M. C., Naufal, I., Sanchez, I., Bizarro, P., Lopez, I., Fortoul T. I., Ostrosky-Wegman P. (2000). Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutation research*, 468(1), 11–17.

- Sanders, S. L., Portoso, M., Mata, J., Bähler, J., Allshire, R. C., y Kouzarides, T. (2004). Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage. *Cell*, 119, 603–614.
- Sakai, A. (2007). BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *AATEX*, 267–373.
- Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D., Phrakonkham, P., Poth, A., et al. (2012a). Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1–6.
- Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D., Poth, A., Sakai, A., et al. (2012b). Photo catalogue for the classification of foci in the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1–12.
- Siepel, A. A., Bejerano, G. G., Pedersen, J. S. J., Hinrichs, A. S. A., Hou, M. M., Rosenbloom, K. K., Clawson, H. H., et al. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research*, 15(8), 1034–1050.
- Silva-Aguilar, M., Rojas, E., y Valverde, M. (2011). Role of Oxidative Stress in Transformation Induced by Metal Mixture. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 1–11.
- Somji, S., Garrett, S. H., Toni, C., Zhou, X. D., Zheng, Y., Ajjimaporn, A., Sens, M. A., et al. (2011). Differences in the epigenetic regulation of MT-3 gene expression between parental and Cd+2 or As+3 transformed human urothelial cells. *Cancer Cell International*, 11(1), 2–2.

- Soto-Reyes, E., y Recillas-Targa, F. (2010). Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene*, 29, 2217-2227.
- Stewart, M. D., Li, J., y Wong, J. (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Molecular and Cellular Biology*, 25(7), 2525–2538.
- Suter, C. M., Martin, D. I. K., y Ward, R. L. (2004). Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nature Genetics*, 36(5), 497–501.
- Takiguchi, M., Achanzar, W. E., Qu, W., Li, G., y Waalkes, M. P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental cell research*, 286(2), 355–365.
- Tokar, E. J., Qu, W., Liu, J., Liu, W., Webber, M. M., Phang, J. M., y Waalkes, M. P. (2010). Arsenic-Specific Stem Cell Selection During Malignant Transformation. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 638–649.
- Tsuchiya, T. (2005). Inorganic Arsenic Compounds and Methylated Metabolites Induce Morphological Transformation in Two-Stage BALB/c 3T3 Cell Assay and Inhibit Metabolic Cooperation in V79 Cell Assay. *Toxicological Sciences*, 84(2), 344–351.
- UCSC. (n.d.). UCSC Genome Browser Home. *UCSC*, <http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg18&hgsid=268526087>. USCS Genome Bioinformatics.
- University of Essex. (n.d.). Dr Elena Klenova's Laboratory Website. *essexacuk*, <http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/>. University of Essex.
- Valadez-Graham, V., Razin, S. V., & Recillas-Targa, F. (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1354–1362.

- Valverde, M., Fortoul, T. I., Díaz-Barriga, F., Mejía, J., y del Castillo, E. R. (2002). Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*, 17(1), 55–61.
- Van De Nobelen, S., Rosa-Garrido, M., Leers, J., Heath, H., Soochit, W., Joosen, L., Jonkers, I., et al. (2010). CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics & Chromatin*, 3(1), 19.
- Wallace, J. A., y Felsenfeld, G. (2007). We gather together: insulators and genome organization. *Current opinion in genetics & development*, 17(5), 400–407.
- Wang, G., y Fowler, B. A. (2008). Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 233(1), 92–99.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., y Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–466.
- Weth, O., y Renkawitz, R. (2011). CTCF functions is modulated by neighboring DNA binding factors. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 89, 459–468.
- Williams, A., y Flavell, R. A. (2008). The role of CTCF in regulating nuclear organization. *Journal of Experimental Medicine*, 205(4), 747–750.
- Wirth, M., y Jedrusik-Bode, M. A. (2009). Interplay between histone deacetylase SIR-2, linker histone H1 and histone methyltransferases in heterochromatin formation. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 4(6), 353–356.
- Wolff, H., Wolff, H., y Perry, L. (2010). Trends in Clean Air Legislation in Europe. Particulate Matter and Low Emission Zones, 1–23.

- Wu, L.-P., Wang, X., Li, L., Zhao, Y., Lu, S., Yu, Y., Zhou, W., *et al.* (2008). Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Activates Silenced Genes through Decreasing both CpG and H3K9 Methylation on the Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3219–3235.
- Xie, X., Mikkelsen, T. S., Gnirke, A., Lindblad-Toh, K., Kellis, M., y Lander, E. S. (2007). Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7145–7150.
- Valadez-Graham, V., Razin, S. V., & Recillas-Targa, F. (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1354–1362.
- Yañez, L. (2003). DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area*1. *Environmental Research*, 93(3), 231–240.
- Yusufzai, T. M., Tagami, H., Nakatani, Y., y Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Molecular Cell*, 13(2), 291–298.
- Zawia, N. H., Crumpton, T., Brydie, M., Reddy, G. R., y Razmiafshari, M. (2000). Disruption of the zinc finger domain: a common target that underlies many of the effects of lead. *Neurotoxicology*, 21(6), 1069–1080.
- Zhu, F., Zykova, T. A., Peng, C., Zhang, J., Cho, Y.-Y., Zheng, D., Yao, K., *et al.* (2011). Phosphorylation of H2AX at Ser139 and a new phosphorylation site Ser16 by RSK2 decreases H2AX ubiquitination and inhibits cell transformation. *Cancer Research*, 71(2), 393–403.
- Zlatanova, J., y Caiafa, P. (2009). CCCTC-binding factor: to loop or to bridge. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(10), 1647-1660.