



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

11281  
UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE LOS PATRONES DE METILACION  
DE LOS GENES DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA EN  
DIFERENTES TEJIDOS DE HUMANO Y SU  
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)**

**P R E S E N T A :**

**BIÓL. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES**

DIRECTOR DE TESIS : DR. MARCO A. CERBON

MÉXICO, D. F.

2005

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

m. 346656



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



# Doctorado en Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/073Jur/2003

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevo a cabo el día 19 de febrero del 2003, **se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del BIOL. EXP. MAURICIO RODRIGUEZ DORANTES** con número de expediente 12981706 y número de cuenta 9885155-5 con la tesis titulada: *"ESTUDIO DE LOS PATRONES DE METILACION DE LOS GENES DE LA 5 ALFA-REDUCTASA EN DIFERENTES TEJIDOS DE HUMANO Y SU RELACION CON LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA"*, dirigida por el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA  
SECRETARIO: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES  
VOCAL: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET  
VOCAL: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON  
VOCAL: DRA. MARIA CRISTINA FERNANDEZ MEJIA  
SUPLENTE: DR. VICENTE MADRID MARINA  
SUPLENTE: DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de agosto de 2004.

**Dra. Yolanda López Vidal**  
Responsable  
Facultad de Medicina

**Dr. J. Javier Espinosa Aguirre**  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.  
Tutor(a) Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
Coordinación de Doctorado

***"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir. "***

***Albert Einstein***

***"La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano."***

***Marcus Jacobson***

## **DEDICATORIA**

**A MIS PADRES:**

**A MIS HERMANOS:**

**A NURIA Y MAURI JR.**

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Marco Cerbón por permitirme ser parte de su grupo, por sus sabios consejos y comentarios, por esas largas horas de discusión, por su disponibilidad para el diálogo, por las llamadas de atención y por mostrar siempre un gran entusiasmo por la ciencia. Gracias.

Al Dr. Ignacio Camacho por sus comentarios académicos y personales que ayudaron a mejorar este trabajo.

A todos los miembros del lab. 202 con quien compartí muchas horas de trabajo y gratas experiencias, en especial a “mi equipo”.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por darme un espacio en su laboratorio durante la huelga y por sus consejos.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón por su amistad y apoyo durante los experimentos de secuencia.

A los miembros de mi comité tutorial: al Dr. Vicente Madrid Marina y al Dr. José Moreno Rodríguez por sus observaciones al proyecto en cada etapa del doctorado.

A la Dra. Patricia Ostrosky, por sus observaciones siempre atinadas y por sus consejos.

Al Dr. Jorge Morales Montor por el apoyo académico y por compartir sus experiencias.

A todos aquellos que ayudaron a la realización de este proyecto y que contribuyeron en mi formación académica.

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MARCO ANTONIO CERBON Y CON EL APOYO DEL PROYECTO DE CONACYT 34861-N, ASI COMO UNA BECA DE ESTUDIOS DE POSGRADO OTORGADA POR EL CONACYT (REG. No. 117986).

## INDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
1. 1. Diferenciación Sexual.....	6
1. 1. 1. Etapa gonadal.....	6
1. 2. Diferenciación testicular.....	8
1. 1. 3. Etapa fenotípica.....	8
1. 2. Síntesis de Andrógenos.....	9
1. 2. 1. Mecanismo de acción de Andrógenos.....	10
2. La enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....	11
2.1. Expresión, clonación y regulación de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	11
2. 2. Estructura del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	12
2. 3. Mutaciones en el gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	13
2. 4. Participación de la 5 $\alpha$ -reductasa en la hiperplasia prostática benigna (BPH) Cáncer.....	14
2.5. Artículo de revisión: <i>Metilación del ADN un mecanismo epigenético de importancia médica</i> .....	18
3. Planteamiento del problema.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	21
5. 1. Objetivo General.....	21
5. 2. Objetivos Particulares.....	21
6. Materiales y Métodos.....	23
6. 1. Muestras de Tejido.....	23
6. 2. Fibroblastos de área genital.....	23
6. 3. Tratamiento de los fibroblastos con un agente desmetilante.....	23
6. 4. Sangre periférica.....	23

6. 5. Extracción de RNA .....	24
6. 6. RT-CR.....	25
6. 7. Extracción de DNA.....	26
6. 8. MSP-PCR.....	26
6. 9. Tratamiento con Bisulfito de Sodio.....	27
6. 9. 1. Desulfonación.....	27
6. 10. Diseño de oligonucleótidos .....	28
6. 11. Digestión del DNA obtenido de linfocitos con enzimas de restricción.....	29
6. 12. Diseño de oligonucleótidos específicos.....	31
7. Resultados.....	33
7. 1. Expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5- $\alpha$ reductasa en tejidos periféricos.....	33
7. 2. Identificación de islas CpG en el promotor de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	34
7. 3. Expresión de los genes de 5 $\alpha$ -reductasa en los fibroblastos tratados con diferentes hormonas esteroides y con un agente desmetilante.....	37
7. 4. Patrón de metilación tejido específico en linfocitos y fibroblastos.....	40
7. 5. Estudio de los patrones de metilación de los genes de 5 $\alpha$ reductasa en pacientes con deficiencia primaria de la enzima.....	41
7. 5. 1. Southern Blot utilizando enzimas sensibles a metilación.....	41
7. 6. Detección de mutaciones en el exón 4 de pacientes con deficiencia primaria de la enzima.....	44
8. Discusión.....	46
8. 1. Expresión diferencial de 5- $\alpha$ reductasa en tejidos periféricos.....	46
8. 2. Diferenciación sexual.....	46
8. 3. Patrón de metilación de la región promotora de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	51
8. 4. Patrón de metilación en regiones intragénicas de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	51
8. 5. Patrón de metilación y mutaciones en el exón 4 del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa.....	52
9. Conclusiones.....	55

10. Perspectivas.....	56
11. Referencias.....	57
11. Apéndice.....	65
11. 1. Artículos publicados.....	65

## Resumen

La determinación del sexo ocurre en los mamíferos durante el periodo fetal y es un proceso fundamental para la persistencia de la especie. El desarrollo de las gónadas masculinas está dado por una serie de eventos genéticos y moleculares que dirigen la maquinaria necesaria en tiempo y espacio para dar origen a los genitales externos masculinos y por ende las características del sexo fenotípico. Las hormonas esteroides son de vital importancia para el establecimiento de las características sexuales en el varón. La  $5\alpha$ -reductasa es la enzima responsable de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, dos de las hormonas masculinas más importantes. Una deficiencia en la actividad de la enzima da origen a diversas patologías resultado de la deficiencia primaria o secundaria de  $5\alpha$ -reductasa. El origen de esta disminución en la actividad de la enzima se debe a mutaciones en el gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa en el caso de la deficiencia primaria. Uno de los mecanismos epigenéticos implicados de manera importante en la aparición de mutaciones y que también está involucrado en la regulación transcripcional de genes es la metilación del DNA. En este trabajo se evaluó el patrón de metilación para los genes tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa en sujetos normales y deficientes de la enzima. Se compararon los patrones de metilación entre sujetos normales y afectados. Se demostró que en los pacientes con deficiencia de la enzima la cantidad de sitios CpG metilados es mayor que en los sujetos normales lo cual sugiere que cambios en la estructura de la cromatina por sitios CpG metilados y la interacción con moléculas que reconocen estos sitios podrían estar relacionados con el incremento en las mutaciones observadas en el gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa y con cambios en la expresión de la enzima.

## **Abstract**

One of the most important events in mammals during the fetal period is the sexual determination . The development of the male gonads is given due to several genetic and molecular changes that conduct the temporal and spatial machinery to generate external genitalia of the male, and the characteristics of phenotypical sex. The steroid hormones are fundamental in mammals during this process. Testosterone and dihydrotestosterone are the androgens more prevalent in males. The  $5\alpha$  reductase catalyze the action of many steroids in the ring alpha. This is the most important enzyme during the development of external genitalia in males. Two isozymes have been cloned with different biochemical and pharmacological properties. In this work we have studied the differential regulation of both genes in different cell types, and epigenetic factors like DNA methylation which may be are involved in the regulation of these genes. This data showed that type 1 gene is expressed in lymphocytes and genital skin fibroblast. In contrast the type 2 gene is tissue specific only expressed in fibroblast. Many mutations have been reported in the type 2 gene. The appearance of these mutations has not been well understood. One of the mechanism that has been involved in this phenomenon is the DNA methylation. The DNA methylation can participate like a mechanism that promotes mutations, and also modulates the expression of genes. We showed that the DNA methylation was more higher in patients with primary deficiency of  $5\alpha$ -reductase in the exon 4 of type 2 gene, compared with lymphocytes in normal individuals. The influence of the methylation in this gene could be determinant in the appearance of these mutations.

## **1. Introducción.**

La diferenciación sexual es un proceso dinámico que está sujeto a un programa secuencial ordenado e interrelacionado que se lleva a cabo en tres etapas consecutivas: el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, el desarrollo del sexo gonadal y el desarrollo de las características sexuales secundarias, colectivamente denominadas sexo fenotípico (Hiort y Holterhus, 2000 Viger et. al. , 2004).

El sexo genético masculino del embrión es determinado por su constitución cromosómica través de los cromosomas 46, XY. Este patrón cromosómico es el inicio de una cascada de eventos genéticos que conllevan al desarrollo de la gónada masculina, el testículo. A este proceso determina el sexo gonadal. Las gónadas a su vez secretan hormonas esteroides y peptídicas que son esenciales para el desarrollo de los genitales internos y externos. La acción hormonal dirige el sexo fenotípico (Hiort y Holterhus 2000, Viger et. al. , 2004).

El término determinación sexual es también utilizado para los procesos del desarrollo que conducen a la función testicular global. En contraste la diferenciación sexual describe acciones hormonales específicas que llevan a un individuo a tener un fenotipo sexual específico. Esto involucra tanto el desarrollo de los genitales internos y externos como el progreso en la maduración sexual durante la pubertad. El género de un individuo es el sexo de asignación y normalmente depende de una determinación y diferenciación sexual normal (Hiort y Holterhus 2000, Viger et. al., 2004)

### **1. 1 Diferenciación Sexual**

#### **1. 1. 1 Etapa gonadal**

El proceso de diferenciación sexual se inicia después de la fertilización con el establecimiento del sexo cromosómico y la expresión de diferentes genes como *WT-1*,

*LIM-1* y *SF1* que llevan a la formación de la gónada indiferenciada (Hiort y Holterhus, 2000) Fig. 1.

Durante mucho tiempo se pensó que existía una molécula que era esencial para el desarrollo del testículo a la cual se le llamó factor determinante testicular (TDF). Actualmente a este gen se le conoce como *SRY* ("sex-determining region, Y-chromosome"). Es un gen evolutivamente conservado y consiste de un solo exón que codifica para una proteína con un motivo de unión a DNA. Esta actúa como un factor de transcripción que a su vez regula la expresión de otros genes. Existe evidencia de que *SRY* se une al promotor de *AMH* y que también participa en la regulación de enzimas esteroideogénicas. Probablemente *SRY* induce la expresión de *AMH* para prevenir la formación de derivados de los ductos Mullerianos (Hiort y Holterhus, 2000, Mittwoch 2004 ).

En el progreso de la gónada bipotencial hacia la diferenciación del testículo, además del *SRY*, otros genes intervienen en la diferenciación de la gónada, tales como *SOX 9* que participa en la diferenciación de los condrocitos en las células mesenquimales durante la condrogenénesis, adicionalmente es un activador del gen de colágeno tipo II que es esencial para la formación de la matriz extracelular del cartílago. Un gen que está involucrado en el desarrollo adrenal, testicular y del ovario es *DAX-1*, este es expresado durante la formación del ovario pero suprimido por el *SRY*, lo cual es clave durante el desarrollo testicular (Hiort y Holterhus 2000, Mittwoch 2004).

Finalmente los genes *DMRT-1* y *2* también participan en la diferenciación de la gónada. En casos en donde se ha observado disgenesia gonadal estos genes se encuentran deletados, sugiriendo que la disgenesia gonadal puede ser debida a la hemicigocidad combinada de ambos genes. Existen al menos una docena de genes que participan en la determinación del sexo (Hiort y Holterhus 2000, Mittwoch 2004).

Defectos en genes responsables de la diferenciación gonadal dan por resultado una disgenesia gonadal parcial o completa y por lo tanto una falla global de la función testicular. Así en el sexo fenotípico, ambos genitales internos y externos son anormales (Swain y Lovell-Badge 1999, Canning y Lovell-Badge, 2002).

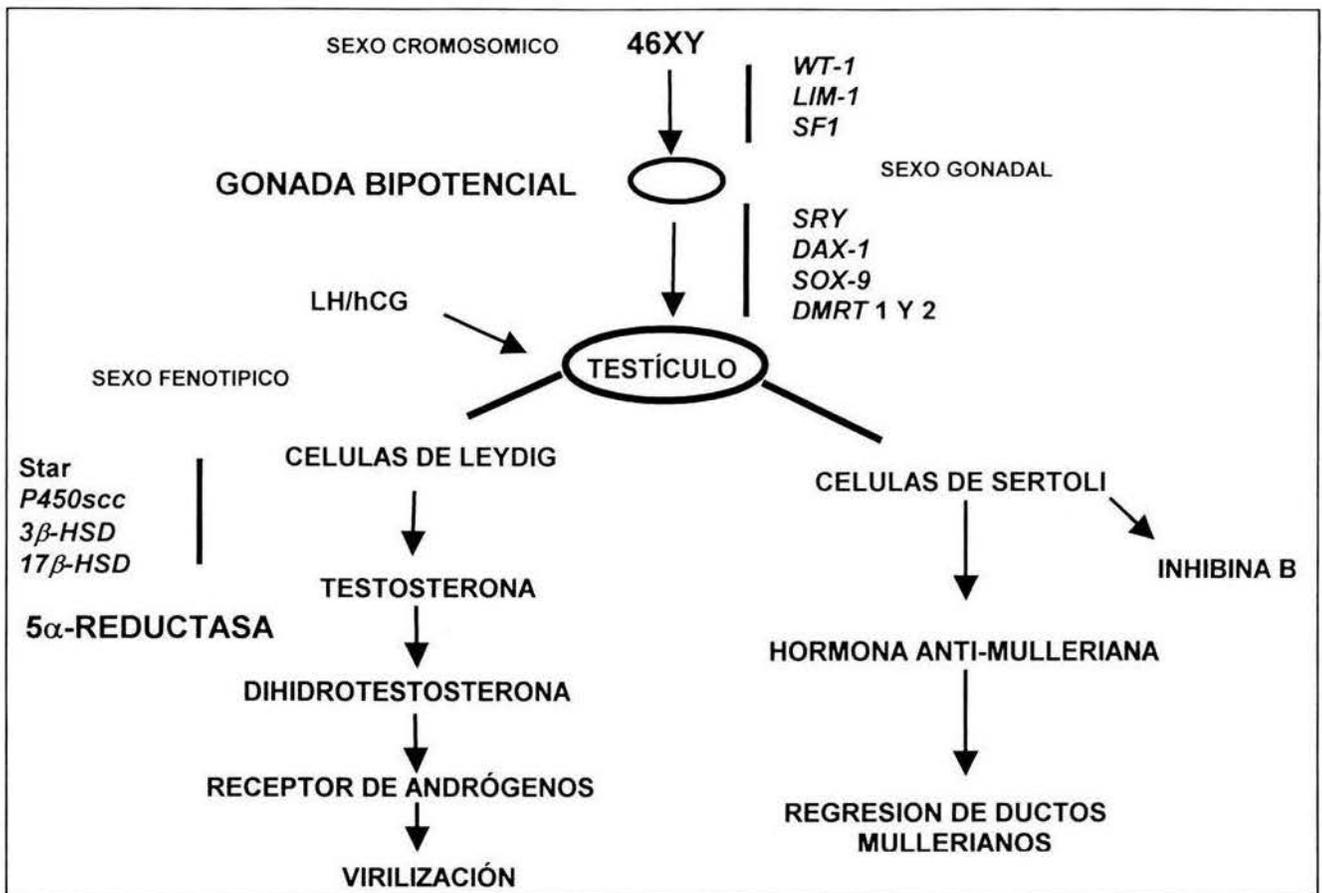
### **1. 1. 2 Diferenciación testicular**

En el embrión XY, la gónada primitiva se diferencia hacia testículo. Una función temprana del testículo fetal es la producción de la hormona antimulleriana (AMH) por las células de Sertoli. Esta produce regresión de los ductos Mullerianos que son estructuras precursoras de los genitales externos femeninos. La formación de ductos Mullerianos es fundamental en el caso de las hembras. Para el caso de los machos la acción de la hormona antimulleriana determina la formación de las características sexuales primarias (Swain y Lovell-Badge 1999, Canning y Lovell-Badge, 2002). Fig. 1

Por otro lado las células de Leydig se observan aproximadamente en el día 60 de la gestación y proliferan rápidamente hasta la mitad de cuarto mes, después de la diferenciación de los cordones testiculares primitivos. Las células de Leydig secretan testosterona, que es la hormona reguladora de la diferenciación masculina de los conductos Wolffianos. La síntesis de Testosterona en el desarrollo del testículo es controlada durante el inicio de la vida fetal por la gonadotropina coriónica (hCG) y solo después por la hormona luteinizante (LH). Ambas hCG y LH estimulan la síntesis de testosterona vía el receptor de LH (LHR) (Swain y Lovell-Badge 1999, Canning y Lovell-Badge et al, 2002).

### **1. 1. 3 Etapa fenotípica**

La diferenciación fenotípica subsiguiente es consecuencia de las diferencias anatómicas y estructurales de las gónadas de las tres etapas de diferenciación sexual masculina: sexo cromosómico gonadal y fenotípico (Hiort y Holterhus, 2000). Fig. 1



**Figura 1. Diferenciación sexual gonadal en el macho.** Diferentes aspectos moleculares, junto con la acción de las hormonas esteroides masculinas que actúan durante la diferenciación sexual gonadal.

## 1. 2 Síntesis de Andrógenos

Las hormonas esteroides son sintetizadas a partir del colesterol en la mitocondria. La estimulación de la síntesis de esteroides es mediada por la proteína reguladora esteroidogénica (StAR), que es un transportador activo de colesterol a través de la membrana interna de la mitocondria. Los pasos iniciales en la síntesis de andrógenos están compartidos entre glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales. (Hiort y Holterhus, 2000). Los últimos pasos en la síntesis de esteroides en

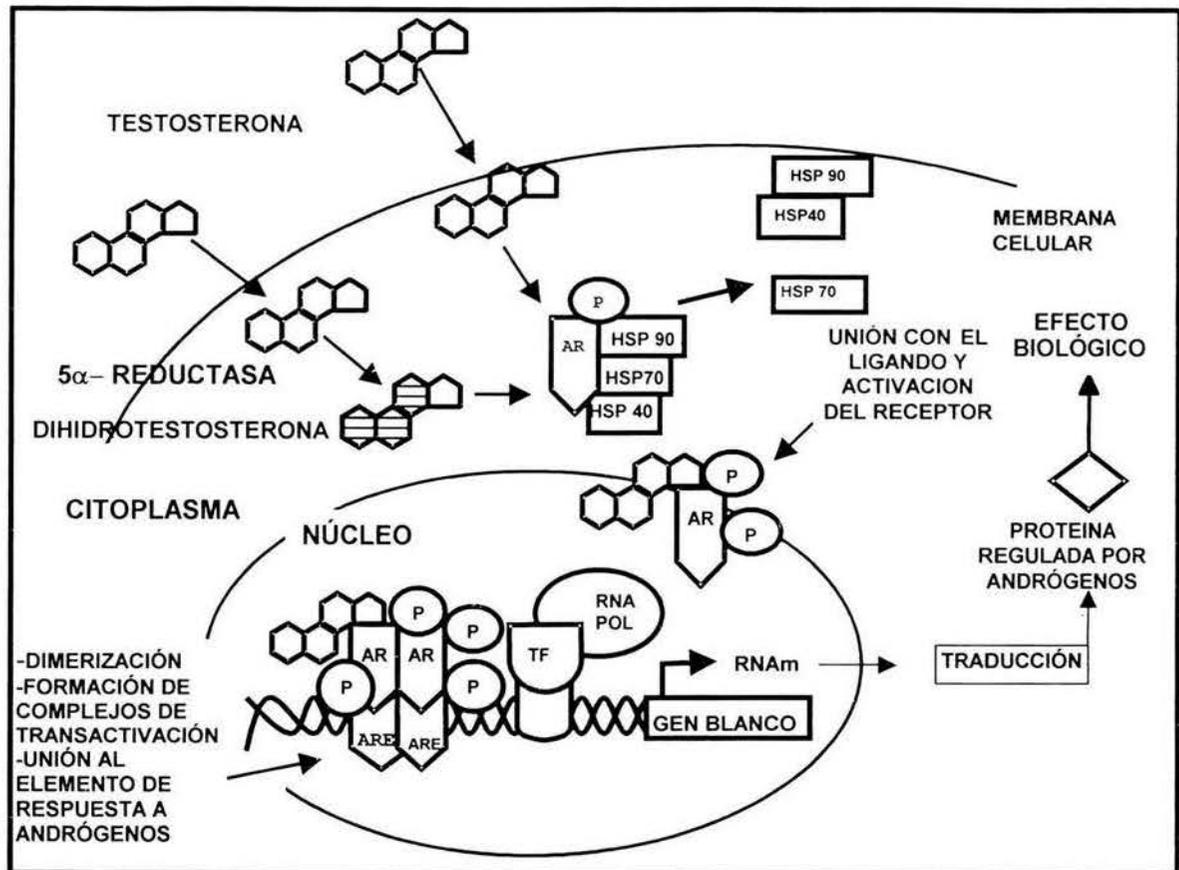
el macho son mediados por diferentes reacciones enzimáticas. Estas reacciones son solamente confinadas a la síntesis de andrógenos y no inhiben la formación de glucocorticoides y mineralocorticoides (Hiort y Holterhus, 2000).

La enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) convierte androstendiona a testosterona en el testículo y esta promueve el desarrollo de los genitales internos en el macho (epidídimo, vaso deferente y vesículas seminales). La acción de la 5 $\alpha$ -reductasa es el último evento en el desarrollo sexual masculino, un proceso complejo que requiere de la exacta coordinación entre las señales genéticas y hormonales (Andersson 1989). Esta enzima convierte la Testosterona (T) a Dihidrotestosterona (DHT) dando lugar a la diferenciación de las estructuras externas del varón (pene, escroto y próstata)(Andersson et. al., 1989, Hiort y Holterhus 2000, Viger et. al. 2005).

### **1. 2. 1 Mecanismo de Acción de Andrógenos**

La acción de andrógenos T y DHT en tejidos blanco son claves para el desarrollo masculino, dependen de la acción del receptor de andrógenos (AR) un miembro de la familia de receptores de esteroides. La regulación transcripcional de genes blanco por receptores de esteroides involucra mecanismos moleculares ampliamente descritos como la unión hormonal, la fosforilación del receptor, disociación de las proteínas de choque térmico, dimerización, tráfico intracelular y translocación nuclear. La unión al DNA y la activación de la transcripción dan por resultado una variedad de efectos biológicos en diversos tejidos. (Hiort y Holterhus, 2000). Fig. 2

Se ha demostrado que la DHT se une al receptor de andrógenos con una afinidad más alta que la testosterona, promoviendo la diferenciación de los genitales masculinos (Beato et al, 1996). Defectos genéticos en el receptor de andrógenos provocan defectos en la diferenciación de las estructuras masculinas internas y externas (Hiort y Holterhus, 2000).



**Figura 2. Mecanismo de acción de Andr6genos.** El receptor de andr6genos (AR) se une a las prote3nas de choque t6rmico. Despu3s de la uni3n a la hormona ocurre una intensa fosforilaci3n. Posteriormente se da el paso al n3cleo en donde se dimeriza y ejerce su efecto a trav3s de la uni3n con elementos de respuesta a andr6genos (ARE). Bajo la influencia de diversos factores de transcripci3n (TF) se inicia la transcripci3n del gen blanco dando lugar a distintos efectos biol3gicos (Hjort y Holterhus 2000)

## 2. La enzima 5α-reductasa

### 2.1. Expresi3n, clonaci3n y regulaci3n de los genes de la 5α- reductasa

Desde que se descubri3 la actividad de la 5α-reductasa en un homogenado de h3gado de conejo en 1954, la presencia de esta enzima se ha descrito en 3rganos y tejidos de diferentes especies animales incluyendo al humano (Thigpen et. al. 1993). La 5α-

reductasa transforma selectivamente un 4-ene-3-oxoesteroide (testosterona) irreversiblemente a 5-alfa-3-oxoesteroide ( $5\alpha$ - dihidrotestosterona) en presencia de NADPH como coenzima esencial a un pH óptimo (Normington y Russell 1992).

Aunque el papel de la  $5\alpha$ -reductasa en la diferenciación sexual masculina ha sido bien establecida, muchas observaciones acerca del gen y la proteína no se han descrito. La enzima fue parcialmente purificada de la rata y se ha observado que es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico o de la membrana nuclear. El gen que codifica para la enzima fue clonado y secuenciado por Andersson y Russell en 1989 y se demostró que la  $5\alpha$ -reductasa está bajo control hormonal en el hígado y en la próstata ventral (Andersson et. al. 1989, Torres y Ortega 2003).

Estudios subsecuentes se llevaron a cabo para identificar el gen que codifica para la enzima de la  $5\alpha$ -reductasa dándose a conocer su estructura. El análisis de DNA indica que el mensajero codifica para una proteína hidrofóbica de 29000 Da. La enzima humana consta de 259 aminoácidos. La comparación entre la proteína del humano y la rata muestra una identidad del 60 % y un solo transcrito para la  $5\alpha$ -reductasa en el hígado y en la próstata de la rata. (Andersson et. al. 1989)

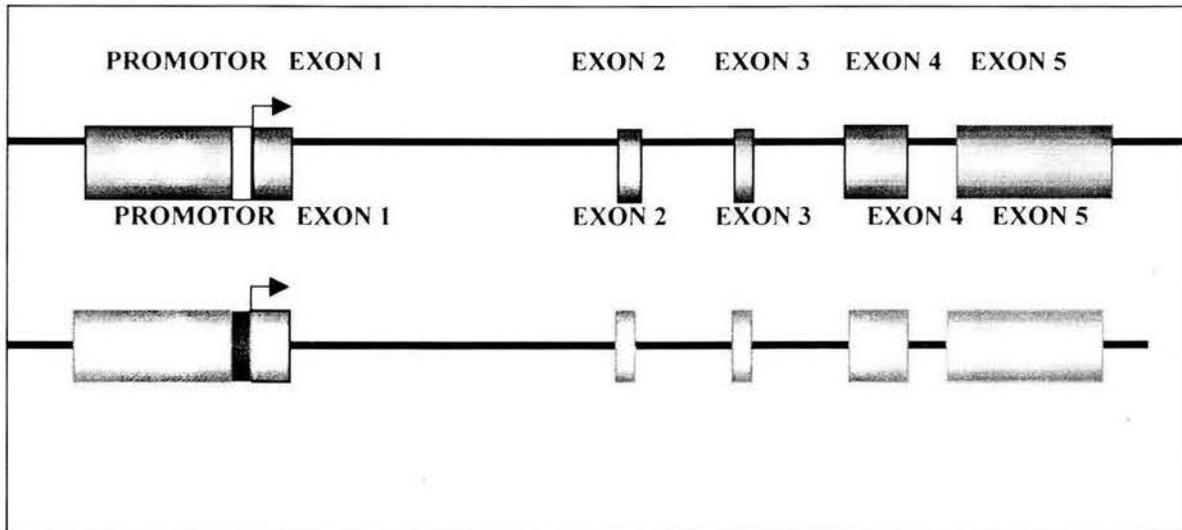
## **2. 2. Estructura del gen de la $5\alpha$ - reductasa.**

Años más tarde se demostró la existencia de dos genes que codifican para isoenzimas con características estructurales similares pero diferentes propiedades bioquímicas y farmacológicas (Andersson et. al. 1991, Jenkins et al 1992 ) tabla 1

El gen tipo 1 y 2 de la  $5\alpha$ -reductasa tiene 5 exones de 352,164,102,151 y 1695 pares de bases respectivamente, que comparten entre 43.8 y 64.1 % de homología con los exones del gen tipo 1 (Labrie et. al. 1992) Fig. 3.

A lo largo de los años se han hecho diferentes aportaciones acerca de los posibles mecanismos que participan en la regulación de esta enzima fundamental para

el establecimiento de las características sexuales fenotípicas en el varón y por otro lado tan importante también en enfermedades como la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata. (Andriole et. al., 2004, Bosland , 2000)



**Figura 3. Estructura de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5α-reductasa.** La estructura de los genes de la 5α-reductasa es similar en las dos isoenzimas, contiene 5 exones y 4 intrones, pero muestran diferencias bioquímicas y farmacológicas (Jenkins et al 1992)

### 2. 3. Mutaciones en el gen tipo 2 de la 5α-reductasa

Los primeros estudios acerca de la patología ocasionada por deficiencia de la enzima por Imperato y cols. en 1974 fueron hechos en una población en República Dominicana, en donde se había observado que ciertas niñas al llegar a la pubertad, mostraban engrosamiento de la voz y características masculinas, además de ser infértiles y mostrar cambios en la identidad sexual (Imperato McGinley et. al. 1974).

Análisis bioquímicos revelaron que estos individuos tenían niveles de testosterona (T) elevados o normales pero niveles bajos de dihidrotestosterona (DHT), lo cual indicaba una anomalía en la enzima que convierte T en DHT (Imperato McGinley et. al. 1974). Estudios posteriores mostraron que los individuos deficientes en DHT, al nacer tenían genitales externos ambiguos, presentaban hipospadias y no

había descenso testicular. Al conjunto de características que presentan estos individuos se le conoce con el nombre de deficiencia primaria de 5 $\alpha$ - reductasa (Tigphen et. al. 1992).

Uno de los hallazgos relacionados con la inactividad de la enzima fue la observación de mutaciones a lo largo del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Esto demostró que las deficiencias en la actividad de la enzima eran debidas a mutaciones puntuales del gen, originando cambio de un codon en la secuencia y por lo tanto una enzima anormal (Tigphen et. al. 1992). Se han descrito mutaciones en el gen tipo 2, tanto de tipo heterocigotas como homocigotas. Mientras que en el gen tipo 1 aún no se han descrito mutaciones que afecten la diferenciación sexual, comprobándose así que el gen tipo 2 es el responsable de los cambios fenotipicos en el varón durante el desarrollo (Tigphen et. al. 1992, Fernández-Cancio et. al. 2004. Skordis et. al. 2005, Hackel et. al. 2005 ).

#### **2. 4. Participación de la 5 $\alpha$ -reductasa en la hiperplasia prostática benigna (BPH) y cáncer.**

La producción excesiva de 5 $\alpha$ -reductasa se ha relacionado con la aparición de diversos trastornos relacionados con la actividad androgénica, como son la hiperplasia prostática benigna, el cáncer de próstata, la alopecia androgénica, etc..(Smith et al 1996, Marcelli and Cunningham 1999, Jaffe et al 2000, Asada et al 2001, Carson III and Rittmaster,2003, Andriole et al 2004).

La importancia de esta enzima no solo radica en el hecho de la deficiencia de la enzima sino también en diferentes procesos patológicos como la Hiperplasia prostática benigna (BPH por sus siglas en inglés) y el cáncer de próstata (Marcelli y Cunningham, 1999). Se ha descrito una correlación importante entre los niveles de DHT, la aparición de BPH el cáncer prostático (Marcelli y Cunningham 1999, Jaffe et. al. 2000). Esta relación ha llevado a los investigadores a centrarse en el papel de la 5 $\alpha$ -reductasa durante el desarrollo de estas enfermedades. Diferentes estudios

demuestran que la isoenzima tipo 2 es la responsable del incremento en el tamaño de la próstata (BPH), y en ciertos casos se ha observado que después de un cuadro de hiperplasia se puede desarrollar un patrón canceroso (Marcelli y Cunningham, 1999).

Por otro lado, en pacientes en los que las biopsias determinaron un primer grado de cáncer, también se ha observado un incremento notable en la producción de DHT ocasionada por una regulación a la alta de  $5\alpha$ -reductasa (Marcelli y Cunningham 1999). Tal es la importancia de estos estudios, que la mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento de estos trastornos están enfocados a inhibir la actividad de la enzima, tales como el finasteride, que se utilizó en un inicio y el dutasteride actualmente en uso (Rodees et. al. 1994, Vaarala et. al. 2000, Andriole et. al. 2004, Chapple et. al. 2004, Clark et al 2004). Todo esto en conjunto con otro tipo de terapias como la inhibición farmacológica de los andrógenos por flutamida y otros (Pitts et. al. 2003, Moul y Chodak 2004) y la remoción total de los testículos así como de la quimioterapia e inmunoterapia. Este tipo de terapias asociadas al metabolismo de andrógenos son ampliamente utilizados para un mejor manejo de estos pacientes, sin embargo aún no existe un tratamiento preciso para la cura del cáncer de próstata (Marcelli et. al. 1999, Bosland 2000).

Durante las pasadas dos décadas, la investigación de la  $5\alpha$ -reductasa se ha centrado en la comprensión de las funciones biológicas y en los efectos de sus metabolitos reducidos, sin embargo los mecanismos precisos por los cuales se regula esta enzima aún no han sido bien establecidos y menos aún cual es el origen de las mutaciones observadas en el gen tipo 2. Se han propuesto diferentes mecanismos que podrían responder a esta pregunta. Los mecanismos denominados epigenéticos tales como las modificaciones postraduccionales de las histonas acetilación, metilación del DNA y de histonas, quizá podrían explicar como es que se regulan los genes de la  $5\alpha$ -reductasa y la aparición de mutaciones que a su vez también han sido implicadas con algunas patologías relacionadas a los andrógenos (Hollyday y Grigg 1993, Green et. al. 1990, Hoque et. al.2005). El ampliar los conocimientos acerca de la  $5\alpha$ -reductasa nos permitirá un mejor entendimiento de sus funciones a diferentes niveles y quizá

está información podría dirigirse un futuro al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2.

Para entender un poco mas acerca de los mecanismos epigenéticos y su participación en algunas enfermedades en el humano, a continuación se incluye una revisión acerca de los aspectos mas importantes descritos acerca de este tema.

**TABLA 1. Características generales de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa de humano.**

	<b>5<math>\alpha</math>-reductasa tipo 1 (humano y rata)</b>	<b>5<math>\alpha</math>-reductasa tipo 2 (humano y rata)</b>
<b>EXPRESION</b>	TEJIDO PERIFÉRICO (hígado, piel, etc.) No se inhibe con finasteride	TEJIDO ANDRÓGENO REGULADO (epidídimo, testículo, próstata, etc.) Se inhibe con finasteride y dutasteride
<b>pH OPTIMO</b>	BASICO A NEUTRO	ACIDO
<b>ACTIVIDAD</b>	CATABOLICA	ANABOLICA

**Rodríguez-Dorantes Mauricio**, Nelly Téllez-Ascencio , Marco A. Cerbón,  
Marisol López, Alicia Cervantes. Metilación del ADN un fenómeno  
epigenético de importancia médica.

*Rev. Invest. Clín.* 2004; 56:56-71

# Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica

Mauricio Rodríguez-Dorantes,\* Nelly Téllez-Ascencio,\* Marco A. Cerbón,\* Marisol López,\*\* Alicia Cervantes\*\*\*

\* Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

\*\* Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.

\*\*\* Servicio de Genética, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM.

*DNA methylation:  
an epigenetic process of medical importance*

## ABSTRACT

*Methylation of CpG dinucleotides is an epigenetic mechanism involved in the regulation of gene expression in mammals. The patterns of CpG methylation are specie and tissue specific. The biological machinery of this system comprises a variety of regulatory proteins including DNA methyltransferases, putative demethylases, methyl-CpG binding proteins, histones modifying enzymes and chromatin remodeling complexes. DNA methylation maintains gene silencing and participates in normal development, genomic imprinting and X chromosome inactivation. In contrast, alterations in DNA methylation participate in the induction of some human diseases, especially those involving developmental defects and tumorigenesis. This review summarizes the molecular aspects of DNA methylation and its implications in cancer and other human diseases in which this epigenetic mechanism has been involved. Our understanding of the epigenetic changes that occur in human diseases will be very important for future management. Changes in the patterns of methylation can be used as markers in cancer and their potentially reversible state creates a target for therapeutic strategies involving specific gene re-activation or re-silencing.*

**Key words.** DNA methylation. Epigenetics. Histone modifications. Genomic imprinting. Cancer.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años el Proyecto del Genoma Humano ha tenido un gran avance, lo que resultó en la publicación del primer borrador de su secuencia

## RESUMEN

La metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Los patrones de metilación son específicos para cada especie y tipo de tejido. La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las ADN metiltransferasas, desmetilasas putativas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. La metilación del ADN es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X. En contraste, alteraciones en ella están implicadas en algunas enfermedades humanas, especialmente aquellas relacionadas con defectos en el desarrollo y el proceso neoplásico. Esta revisión resume los aspectos moleculares de la metilación del ADN y su participación en el desarrollo normal, el cáncer y en algunas patologías humanas en las que los mecanismos epigenéticos han sido implicados. El conocimiento de las modificaciones epigenéticas que ocurren en las enfermedades humanas será importante para su manejo futuro. Los cambios en los patrones de metilación podrán ser empleados como marcadores en cáncer y el estado potencialmente reversible de este proceso constituye un blanco ideal para crear estrategias terapéuticas que impliquen la reactivación o el re-silenciamiento de genes específicos.

**Palabras clave.** Metilación del ADN. Epigenética. Modificaciones de histonas. Impronta genómica. Cáncer.

hace dos años.<sup>1,2</sup> Sin embargo, aún queda por dilucidar la estructura y funcionamiento de la mayoría de los genes que lo constituyen. Las células somáticas de un organismo multicelular tienen básicamente la misma información genética, no obstante, cada uno

de los tipos celulares que forman parte del organismo tiene una estructura y función características. Esto se debe a la expresión diferencial del genoma, la cual es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos.

El término epigenética ha sido definido como "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN."<sup>3</sup> Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina que regulan la expresión génica.<sup>4</sup>

La metilación del ADN se ha observado en diversas especies de bacterias, algunos hongos, plantas y organismos superiores. En las bacterias, la metilación es parte de un mecanismo de defensa para reducir la cantidad de transferencia génica horizontal entre las especies.<sup>5</sup> Inicialmente no se había detectado metilación del ADN en *Drosophila melanogaster*, sin embargo, se ha demostrado un nivel bajo de metilación en estadios tempranos del desarrollo.<sup>6</sup> En contraste, en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* aparentemente no se presenta este fenómeno.<sup>5</sup>

En los mamíferos, la metilación del ADN y su significado funcional es un área activa de investigación.

Este proceso afecta las interacciones ADN-proteína, puede alterar la estructura y replicación del ADN, la expresión de los genes y la diferenciación celular, la latencia de virus celulares, y la inactivación transcripcional de elementos genéticos móviles, además de aumentar el riesgo de mutaciones espontáneas; lo que hace de este tema un tópico de gran relevancia médica. Esta revisión se centra en describir los mecanismos generales de la metilación del ADN y su relación con diferentes patologías en el humano, en particular con el proceso neoplásico (Figura 1).

## METILACIÓN DEL ADN EN MAMÍFEROS

En el genoma de los vertebrados la única modificación epigenética en la molécula del ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN de mamíferos están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' y en la cadena complementaria en el dinucleótido 3'-GpC-5'. También pueden estar metiladas secuencias no CpG como 5'-CpNpG-3' o no simétricas como 5'-CpA-3' y 5'-CpT-3', pero con menor frecuencia.<sup>7,8</sup>

En las células somáticas humanas, la 5mC constituye 1% del total de las bases del ADN y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo cual+ podría actuar como una señal específica para



Figura 1. Participación de la metilación del ADN en los procesos celulares normales y en diferentes procesos patológicos.

otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica.<sup>9</sup>

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (> 60% de CG), denominadas "islas CpG". Aproximadamente 60 a 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas.<sup>9-11</sup>

El análisis computacional de la secuencia del genoma humano predice cerca de 29,000 islas CpG<sup>1,2</sup> y se ha demostrado que la gran mayoría no están metiladas en todos los estados del desarrollo ni en todos los tipos de tejidos. Esto es válido aun para las islas CpG que están localizadas en muchos de los genes que tienen un patrón de expresión tejido específico, tal es el caso de los genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  de la hemoglobina<sup>12</sup> y para las cadenas  $\alpha$ -2 de la colágena tipo 1<sup>13</sup> y poseen islas CpG que se mantienen desmetiladas en todos los tejidos estudiados. Sin embargo, una proporción pequeña, pero significativa, de estas islas CpG puede mantenerse libre de metilación sólo hasta el momento en que el gen asociado es silenciado durante el desarrollo embrionario. Esto ocurre, particularmente, en algunos de los genes improntados y en los localizados en el cromosoma X inactivo de las mujeres.<sup>4,9</sup>

### **Establecimiento de los patrones de metilación**

Un prerrequisito para entender las funciones de la metilación del ADN es conocer la existencia de patrones heredables del estado de metilación en el genoma de los mamíferos. Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación *de novo* particularmente activa en estos estadios.<sup>14</sup> En

general, el genoma de las células germinales femeninas se encuentra menos metilado que el de las masculinas. El patrón de metilación de los gametos es borrado por una desmetilación generalizada cerca del estadio 8 células. A partir de entonces, la metilación del ADN adquiere patrones específicos durante el desarrollo embrionario y se establece el patrón de metilación de las células somáticas.<sup>9,15</sup> Se ha sugerido que los patrones de metilación de las islas CpG pueden servir para compartimentalizar al genoma en zonas transcripcionalmente activas e inactivas.<sup>4</sup>

La metilación *de novo* también puede ocurrir en las células somáticas adultas, un número significativo de islas CpG son susceptibles de metilación progresiva en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos. Sin embargo, la velocidad con que ocurren estos cambios parece ser muy lenta.<sup>9,16</sup> Recientemente se ha observado que existen patrones de metilación anormales en muchos tipos de cáncer, los cuales conducen principalmente a la inactivación de genes supresores de tumores y a la inestabilidad del genoma.<sup>17</sup>

Una gran interrogante ha sido cómo se generan los patrones de ADN metilado y desmetilado durante el desarrollo y cómo se mantienen en las células diferenciadas. Estos procesos parecen ser el resultado de la acción combinada de enzimas que se encargan de metilar y de mantener los patrones de metilación, llamadas metiltransferasas *de novo* y de mantenimiento, respectivamente.<sup>18</sup>

Diferentes líneas de investigación sugieren que los patrones de metilación del ADN son vitales para el desarrollo normal de los vertebrados. Esto ha sido demostrado en ratones transgénicos homocigotos para mutaciones en alguno de los genes que codifican para las ADN metiltransferasas, los cuales mueren durante el desarrollo embrionario. El nivel de metilación de células pluripotenciales embrionarias en estos animales comparado con el de células normales y de animales heterocigotos se redujo alrededor de un tercio con respecto a lo observado en los heterocigotos o en las células de embriones normales. Aunque no se observaron diferencias en el fenotipo de las células pluripotenciales embrionarias homocigotas en cultivo, los embriones homocigotos mostraron atrofia severa, retardo en el desarrollo y muerte a mitad de la gestación.<sup>19,20</sup>

### **Maquinaria celular de la metilación y desmetilación del ADN**

La metilación del ADN es un proceso dinámico eficientemente regulado, las secuencias no metiladas

pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación.

La reacción de metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas e involucra la transferencia del grupo metilo de la S adenosil- L-metionina al carbono 5 de la citosina.<sup>21</sup> En células de mamífero se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción y se han clasificado en dos grupos: las ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasas *de novo* (DNMT3A y DNMT3B).<sup>18,20</sup>

La acción de las ADN metiltransferasas de mantenimiento ocasiona que el ADN sea metilado al inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular. En el ratón, la DNMT1 tiene una preferencia de cinco a 30 veces mayor por sustratos hemimetilados, por lo que se le asignó una función en el mantenimiento de los patrones de metilación.<sup>22</sup> Esta enzima se expresa de forma ubicua en los tejidos somáticos y su principal actividad se observa durante la replicación del ADN, interactuando con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la proteína que ancla a la ADN polimerasa en la horquilla de replicación.<sup>23</sup> Sin embargo, existen evidencias de que la Dnmt1 también está implicada en ciertos tipos de metilación *de novo*, siendo específica para el dinucleótido CpG. Además, la Dnmt1 interactúa con complejos proteicos implicados en la represión transcripcional que incluyen a las desacetilasas de histonas (HDAC).<sup>8,18,24</sup>

En el humano, las ADN metiltransferasas con actividad *de novo*, DNMT3A y DNMT3B, adicionan un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado, creando un nuevo CpG altamente hemimetilado.<sup>20</sup> Las DNMT3A y DNMT3B murinas están poco relacionadas con la familia de la DNMT1.<sup>18</sup> Las DNMT3A y DNMT3B, al igual que la DNMT1, también reclutan a las HDAC para silenciar genes, utilizando un motivo de unión homólogo al homeodominio de plantas (PHD), que es un arreglo conservado de residuos de cisteína e histidina observado en diferentes proteínas implicadas en la regulación transcripcional.<sup>24</sup> Al parecer, las actividades de las metiltransferasas de *de novo* no se superponen durante el desarrollo embrionario del ratón y la DNMT3B metila específicamente las secuencias satélites centroméricas,<sup>20</sup> tal como ha sido sugerido por los datos encontrados en los pacientes con síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y ano-

malías faciales) debido a mutaciones en el gen *DNMT3B*.<sup>25</sup>

Adicionalmente, existe un tercer miembro de la familia DNMT3, denominado DNMT3L, el cual se cree que no codifica para una metiltransferasa funcional dada la pérdida de diferentes motivos conservados del dominio catalítico de la enzima. Sin embargo, DNMT3L contiene el motivo conservado PHD a través del cual se asocia con la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) para reprimir la transcripción. Se ha postulado que la DNMT3L podría tener un papel en la regulación del establecimiento de la metilación en la impronta genómica, y que la asociación con las HDAC podría ser relevante para su funcionamiento.<sup>18,24</sup>

Se ha sugerido que las DNMT no sólo ejercen su función en la represión transcripcional metilando al DNA, sino que su interacción con las HDAC es independiente de la actividad de metiltransferasas. Por otra parte, las DNMT parecen ser dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones proteína-proteína, su asociación con factores de transcripción específicos, proteínas de unión a histonas metiladas o a correpresores como el complejo RB/E2F parecen ser importantes para que su actividad de ADN metiltransferasas participe en la represión transcripcional.<sup>24,26,27</sup>

Aunque los mecanismos responsables de la desmetilación aún no han sido completamente dilucidados, se han propuesto dos posibles procesos para remover los grupos metilo del ADN. Un mecanismo es pasivo y resulta de la ausencia de metilación de mantenimiento durante varios ciclos de replicación del ADN. El segundo mecanismo sugiere la existencia de un proceso activo de desmetilación, aun cuando existe controversia sobre las características de esta actividad. Se ha reportado que una proteína de unión a ADN metilado (MBD2b) tiene actividad de desmetilasa,<sup>28</sup> sin embargo, este resultado aún no ha podido ser reproducido por otros investigadores.<sup>9,29,30</sup> Por otro lado, se ha propuesto que la desmetilación activa sea el resultado de un proceso de reparación del ADN, sugiriéndose que una 5-metilcitosina ADN glicosilasa realice esta actividad.<sup>31</sup>

Existen evidencias a favor de que ocurren ambos tipos de desmetilación. Un proceso activo se observa predominantemente durante la desmetilación del genoma paterno en el cigoto, mientras que los cromosomas de origen materno son desmetilados pasivamente en estados de división posteriores.<sup>15,16,32</sup> Diferentes observaciones apoyan la idea de que los patrones de metilación son mantenidos no sólo por un balance dinámico de activida-

des de metilación y desmetilación del ADN, sino también por el estado local de acetilación y metilación de las histonas.<sup>9, 29,30,33</sup>

### Funciones de la metilación

La metilación del ADN constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de regiones improntadas, regula a los transposones, la impronta genómica y la expresión génica.<sup>8,9,15,17</sup> Generalmente la metilación en elementos reguladores de los genes tales como promotores, potenciadores, aislantes y represores suprime su función.<sup>3,4,17</sup> La metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas.<sup>4,9</sup> También se ha sugerido que la metilación constituya un mecanismo de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles.<sup>9,34</sup>

### Represión transcripcional

Se han propuesto dos mecanismos por los cuales la metilación bloquea la transcripción. La 5mC inhibe la unión de ciertos factores de transcripción que contienen secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento. Por ejemplo, modifica las actividades de unión de factores de transcripción como: E2F, CREB, AP2, cMyc/ Myn y NFkB;<sup>4,35,36</sup> aunque otros como SP1 no son inhibidos.<sup>37</sup> El otro mecanismo es más general e involucra proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores. Estas proteínas contienen dominios conservados de unión a ADN metilado (MBD, *methyl binding domain*)<sup>38,39</sup> y el primer miembro de la familia identificado fue la proteína MeCP2.<sup>39,40</sup> Posteriormente se caracterizaron otras cuatro proteínas con MBD conservados, MBD1, MBD2, MBD3, implicadas al igual que MeCP2 en la represión transcripcional,<sup>11,41,42</sup> y MBD4 que muestra actividad de ADN glicosilasa y remueve timinas de sitios T-G mal apareados.<sup>43</sup>

Además del dominio MBD, MeCP2 es una proteína que contiene un dominio de represión transcripcional (TRD, *Transcriptional Represión Domain*),<sup>44</sup> y está codificada por un gen localizado en el cromosoma X que se encuentra mutado en pacientes con síndrome de Rett.<sup>45</sup> La proteína MBD2 es parte de un complejo llamado MeCP1 que muestra baja afinidad por el ADN metilado, lo que sugiere que tiene

una función de represión transitoria.<sup>11</sup> Existen dos isoformas, MBD2a y MBD2b, dependiendo del sitio de inicio de la traducción del gen.<sup>41</sup> De manera interesante, la isoforma MBD2b no ha sido observada *in vivo*, aun cuando se ha postulado que tiene actividad de desmetilasa.<sup>46</sup> La proteína MBD3 tiene una alta homología con MBD2, aun fuera del dominio de unión a ADN metilado y forma un complejo proteico diferente al de MBD2.<sup>41,42</sup>

Las proteínas MBD median la interacción entre el ADN metilado y los componentes de la cromatina debido a que son capaces de reclutar complejos represores que incluyen a las desacetilasas de histonas<sup>41,42,47,48</sup> (Figura 2). Las HDAC remueven grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 y parecería que la carga positiva resultante facilita la condensación de la cromatina y limita el acceso de los factores de transcripción a los promotores localizados cercanamente.<sup>48,49</sup>

### Modificaciones en la estructura de la cromatina

El ADN nuclear está asociado con un complejo multiproteico formando la cromatina. El nucleosoma es la unidad estructural fundamental y consiste del ADN genómico enrollado sobre un octámero de histonas, formado por un tetrámero de H3/H4 y dos dímeros de H2A y H2B, más una molécula de la histona H1 que participa en la formación de estructuras de orden superior. En los organismos eucariontes la actividad transcripcional es generalmente impedida por el empaquetamiento nucleosomal. Activadores y represores tienen influencia sobre la expresión de los genes por reclutamiento de los complejos remodeladores de la cromatina en las regiones promotoras. Grandes segmentos del genoma y primariamente secuencias repetidas, son empaquetadas e inactivadas permanentemente en forma de heterocromatina. El estado silente puede persistir a través de las divisiones celulares meióticas y mitóticas, indicando que la estructura de la cromatina es heredada durante el proceso de replicación. Por el contrario, los genes transcripcionalmente activos generalmente se encuentran en regiones de cromatina con una estructura menos compacta o relajada, la eucromatina.<sup>4,50,51</sup>

Las modificaciones epigenéticas que influyen sobre los cambios en la estructura de la cromatina incluyen la metilación del ADN y la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de las histonas. Tomando en cuenta el gran número de sitios de modificación postraduccio-



de las HAT. Estos estudios también demostraron que en ausencia de metilación del ADN se produce la metilación en K9 de H3 y el silenciamiento de genes supresores de tumores, tal como ocurre durante la inactivación del cromosoma X.<sup>63-65</sup>

### Inactivación del cromosoma X

La inactivación de uno de los cromosomas X en las hembras de mamíferos, para compensar la dosis génica en relación con el sexo masculino, constituye un ejemplo de cómo la metilación del ADN puede mantener apagado transcripcionalmente casi todo un cromosoma.<sup>66</sup> El proceso de inactivación se produce al azar, inactivándose el X paterno o el materno durante el estado de blastocisto y la progenie celular mantiene el mismo cromosoma X inactivo, es decir, la inactivación es clonal. Las islas CpG localizadas en los promotores de la mayoría de los genes del cromosoma X inactivo, incluyendo las de genes de mantenimiento como *HPRT*, *G6PD* y *PGK1*, se encuentran metiladas.<sup>67</sup> Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en muchos de estos genes el silenciamiento transcripcional precede a la metilación,<sup>68</sup> por lo que parecería que ésta es responsable de mantener el estado inactivo más que de iniciarlo. El proceso de inactivación se inicia con la expresión del gen *XIST* (*X inactive specific transcript*), localizado en el centro de inactivación del cromosoma X (*XIC*, *X inactivation center*) en Xq13.<sup>69</sup> Este gen se encuentra desmetilado en el cromosoma X inactivo y metilado en el cromosoma activo.<sup>66</sup> En las células totipotenciales de ratón en que se han eliminado ambas copias del gen *Dnmt1* se observa la expresión del gen *XIST*, normalmente inactivo en el cromosoma X de los machos.<sup>70</sup> El producto del gen *XIST* es un ARN que envuelve en *cis* un cromosoma X y desencadena una serie de eventos que conducen a la inactivación.<sup>72</sup> El primero de ellos es la metilación en K9 de la histona H3,<sup>61</sup> conforme se acumulan los transcritos de *XIST* se observa la represión transcripcional de los genes ligados al cromosoma X,<sup>61,68,72</sup> posteriormente existe una hipoacetilación global de la histona H4<sup>73</sup> y la incorporación de la macro histona H2A en los nucleosomas;<sup>74</sup> siendo la metilación de las islas CpG el evento final.<sup>68,72</sup> Al parecer, el estado de metilación del cromosoma X inactivo es mantenido durante su replicación por ambos tipos de ADN metiltransferasas (*DNMT1* y *DNMT3*).<sup>72</sup> En las hembras de ratón, en el centro de inactivación existe otro gen, *Tsix* un gen antisentido a *XIST*, que parecería ser el responsable de regular el proceso de inactivación y de definir que cromosoma X será inactivado.<sup>75</sup>

La impronta se ha definido como el marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental. La impronta afecta la expresión de algunos, pero no de todos los genes y los genes improntados se caracterizan por la expresión de sólo uno de los alelos. La impronta es un mecanismo epigenético particularmente importante en los mamíferos y parecería estar relacionado en la regulación de la transferencia de nutrientes de la madre al feto y al recién nacido. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los genes improntados tienden a afectar el crecimiento *in utero* y el comportamiento después del nacimiento. Aproximadamente 50 genes improntados han sido identificados en el ratón, la mayoría de los cuales tienen homólogos en el humano y se ha calculado que existan cerca de 100.<sup>15,76,77</sup>

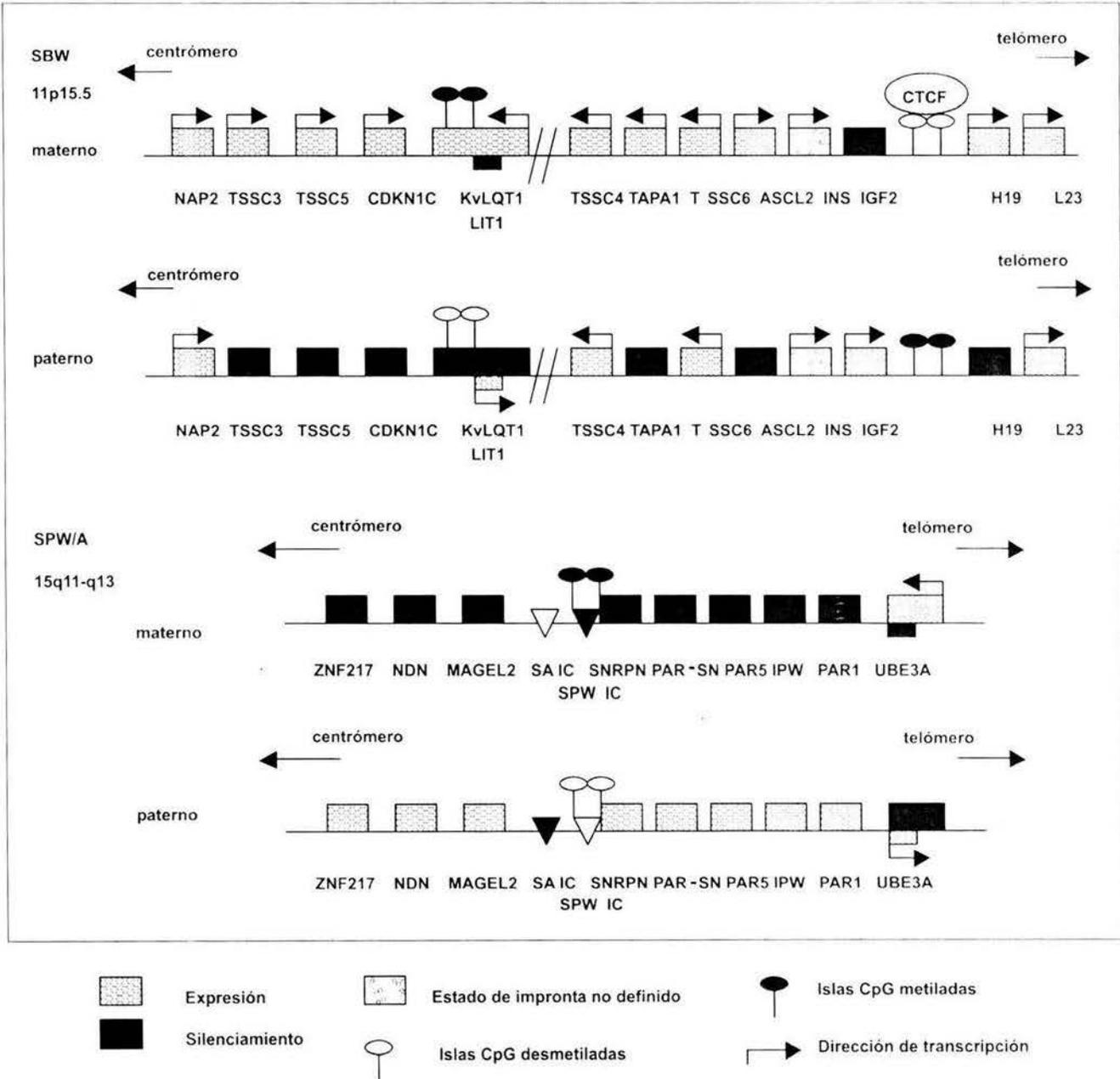
Los genes improntados presentan características genéticas y epigenéticas comunes. La mayoría se localizan físicamente ligados en agrupamientos con otros genes improntados, esta agrupación sugiere una regulación coordinada de los genes contenidos en un dominio cromosómico. Por analogía con la inactivación del cromosoma X, en algunas regiones sujetas a impronta se han identificado centros de impronta (*IC*, *imprinting center*) o elementos de control de la impronta. Generalmente no hay homología en las proteínas codificadas por los genes improntados, pero existen relaciones funcionales en algunos genes implicados en el crecimiento y desarrollo fetal. Las regiones improntadas, frecuentemente son ricas en islas CpG y cerca o incluso dentro de ellas contienen grupos de secuencias repetidas directas.<sup>9,15,76</sup>

La modificación epigenética más importante implicada en la impronta es la metilación en dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferencial (*DMR*, *differentially methylated region*), las cuales son específicas para cada alelo parental. Los genes improntados también pueden diferir con respecto a la estructura de la cromatina y al estado de acetilación y metilación de las histonas.<sup>15,77</sup> En algunos genes, las *DMR* se establecen en las células germinales femeninas y masculinas y el patrón de metilación es mantenido durante todos los estadios del desarrollo, mientras que en otros genes, las *DMR* son reprogramadas significativamente durante el desarrollo. La herencia de este marcaje epigenético conduce a la expresión génica diferencial.<sup>9,15,78</sup> Sin embargo, ha resultado difícil identificar las señales que participan en la herencia y la reprogramación de la metilación del ADN en la impronta, recientemente se ha sugerido que algunas de estas señales pudie-

ran estar dadas por el código de las histonas, principalmente la metilación en el aminoácido K4 o K9 de la histona H3.<sup>62</sup>

Las DMR pueden tener propiedades distintas, algunas están metiladas en el alelo inactivo, mientras que otras lo están en el activo. Un ejemplo de la función de las DMR se observa en el gen que codifica para el factor de crecimiento tipo insulina 2 (Igf2) con expresión del alelo paterno y el gen *H19* expresado

maternalmente que codifica para un transcrito no traducido. Ambos genes se encuentran en una región de 80 kb, en la región distal del cromosoma 7 del ratón y en el cromosoma 11p15.5 humano, localizada dentro de un agrupamiento que incluye 14 genes improntados. La alteración de la impronta y por consiguiente de la expresión de algunos de estos genes se asocia con el síndrome de Beckwith Wiedemann.<sup>15,79,80</sup> La represión transcripcional por la me-



**Figura 3.** Regiones improntadas de los cromosomas humanos 11p15.5 y 15q11-q13 implicadas en los síndromes de Beckwith Wiedemann y Prader Willi/Angelman, respectivamente. Se muestra la expresión de los alelos maternos y paternos en cada caso, la localización de los centros de impronta (IC), las DMR y los transcritos antisentido de expresión exclusivamente paterna.<sup>15,79,80,84,110</sup>

tilación del ADN puede ser mediada por factores proteicos que se unan específicamente a sitios metilados o no metilados. Uno de ellos es la proteína de unión CTCF (factor proteico que reconoce la secuencia CCCTC) que actúa como un aislante en la regulación de la impronta de *H19/Igf2*.<sup>81-83</sup> El factor CTCF se asocia al ADN en regiones específicas y aísla a los promotores de la influencia de potenciadores de transcripción remotos. La copia materna del gen *Igf2* se encuentra transcripcionalmente inactiva debido a la unión de CTCF en una DMR localizada entre su promotor y un potenciador río abajo. Sin embargo, en el *locus* paterno, estos sitios de unión ricos en CpG se encuentran metilados, previniendo la unión de CTCF y de alguna manera permitiendo al potenciador localizado río abajo activar la expresión de *Igf2*<sup>84</sup> (Figura 3).

Una considerable proporción de genes improntados se asocian con transcritos antisentido. Sorprendentemente, todos los transcritos antisentido de los genes improntados también presentan impronta con expresión del alelo paterno (a excepción de *Tsix*), sin importar que sea el alelo paterno o el materno el que se exprese en el gen sentido. La mayoría de los transcritos antisentido no codifican para un producto proteico y deben tener funciones reguladoras.<sup>76</sup> Entre los mejor estudiados están los que se encuentran sobrelapados con el gen *Igf2r* del ratón y con los genes del ratón y del humano *Kcnq1/KCNQ1*, que presentan expresión de los alelos maternos, y se llaman *Air* y *Kcnq1ot1/LIT1*, respectivamente.<sup>85,86</sup> Ambos transcritos antisentido se originan en intrones de los genes sentido (Figura 3). El gen *Air* se encuentra sobrelapado con el promotor del gen *Igf2r*, las regiones promotoras de los genes antisentido son ricas en CpG que se encuentran metiladas en los alelos maternos. La delección de estas DMR lleva a la falta de los transcritos antisentido y a la pérdida de la impronta de los genes sentido y de otros genes improntados localizados en el mismo dominio cromosómico.<sup>76,85,86</sup> Es por ello que se ha propuesto que los transcritos antisentido podrían interferir con la expresión de los genes sentido, ya sea alterando la estructura de la cromatina, excluyendo directamente a los promotores o por interferencia con los ARN. Alternativamente, se ha sugerido que podrían actuar sobre otros elementos reguladores tales como silenciadores o aislantes.<sup>15,76</sup>

#### ENFERMEDADES POR ALTERACIONES EN LA METILACIÓN

Los patrones de metilación del ADN son importantes para regular de manera adecuada la expresión

de los genes y asegurar un desarrollo normal del ser humano, por lo que su alteración se relaciona con enfermedad. Los cambios en la expresión génica pueden deberse a problemas en la maquinaria encargada de producir y mantener la metilación, tales como mutaciones en los genes que codifican para las ADN metiltransferasas, o en aquellos que codifican para las proteínas de unión al ADN metilado o por cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN o en los complejos remodeladores de la cromatina que conducen a cambios en su patrón de metilación. Entre este tipo de padecimientos se encuentran los síndromes: ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales), de Rett, de X frágil y ATR-X (alfa talasemia y retraso mental ligados al X). Otras enfermedades humanas, como los síndromes de Beckwith Wiedemann y de Prader Willi /Angelman, están asociadas con cambios en la dosis funcional de genes sujetos a impronta genómica, y pueden originarse por diferentes mecanismos que incluyen microdeleciones o duplicaciones de la región improntada, disomía uniparental y alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética.<sup>8,15,87,88</sup> Por otra parte, la metilación aberrante es un fenómeno relativamente frecuente en los procesos neoplásicos caracterizados por inestabilidad genómica y alteraciones en la expresión génica.<sup>8,89</sup>

#### Síndrome ICF

El síndrome ICF es un padecimiento autosómico recesivo raro, en el cual los pacientes cursan con deficiencia de al menos dos tipos de inmunoglobulinas y ocasionalmente defectos en la inmunidad celular. Presentan retraso mental y una facies peculiar que incluye una cara redonda, hipertelorismo, puente nasal plano, micrognatia y macroglosia; además de infecciones respiratorias recurrentes y quizá el dato más característico sea la elongación de la heterocromatina centromérica de los cromosomas 1, 9 y 16 en linfocitos en cultivo.<sup>90</sup> Normalmente, el ADN satélite de estas regiones se encuentra metilado en las células somáticas, pero en los pacientes con ICF presenta una marcada hipometilación, indicando que la metilación es esencial para una adecuada estructura centromérica y estabilidad cromosómica. En estos pacientes también se encuentra hipometilación de elementos repetitivos dispersos en el genoma y de algunos genes del cromosoma X inactivo.<sup>91</sup> Este síndrome es debido a mutaciones en el gen *DNMT3B* localizado en 20q11.2;<sup>25,92</sup> la mayoría de ellas afectan el dominio catalítico de la enzima que se encuentra en el extremo carboxilo.<sup>8,87,88</sup> En el ratón homocigoto

para mutaciones en *DNMT3B* se observa un patrón de desmetilación pericentromérico similar al del síndrome ICF; sin embargo, la pérdida total de la función de *DNMT3B* produce letalidad embrionaria,<sup>20</sup> por lo que se ha propuesto que el dominio regulador del extremo amino de la enzima debe ser crítico para la supervivencia y que mutaciones en él o la pérdida total de la actividad de la enzima también debe ser letal en el humano.<sup>87,88</sup> Sin embargo, resulta difícil explicar cómo alteraciones en la metilación del ADN conducen a una expresión génica anormal que lleve a retraso mental y a alteraciones faciales e inmunológicas, recientemente se ha postulado que puedan deberse a que no exista un silenciamiento normal de genes autosómicos o a que la *DNMT3B* tenga una localización tisular y subcelular específica.<sup>87,88</sup>

### Síndrome de Rett

El síndrome Rett es un padecimiento dominante ligado al cromosoma X, que afecta principalmente a mujeres (1:10 000). Se caracteriza por un desarrollo normal hasta los 6-18 meses, seguido de un periodo de regresión que incluye una desaceleración en el crecimiento de la cabeza, pérdida del lenguaje y del uso adecuado de las manos con la aparición de movimientos repetitivos (lavado de manos). Las pacientes frecuentemente son autistas y presentan apraxia y una severa disfunción respiratoria. Después de este periodo de regresión, las condiciones se estabilizan y muchas pacientes sobreviven hasta la vida adulta.<sup>93,94</sup> La mayoría de las afectadas son heterocigotas para mutaciones de *novo* en el gen *MECP2* localizado en Xq28.<sup>45</sup> Debido a la inactivación al azar del cromosoma X, sólo la mitad de las células de estas mujeres expresan el alelo no mutado del gen. En este padecimiento, contrariamente a lo que ocurre en otros padecimientos debidos a mutaciones en genes esenciales localizados en el cromosoma X, el patrón de inactivación no es sesgado. Sin embargo, existen portadoras asintomáticas en las cuales la inactivación al azar lleva al apagado del alelo mutado en la mayoría de sus células.<sup>94,95</sup> Hasta hace poco se creía que los niños hemicingotos para mutaciones en *MECP2* morían pre o perinatalmente. Sin embargo, existen reportes de niños afectados en familias con casos recurrentes de síndrome de Rett, demostrándose que los masculinos con un síndrome clásico tienen un cromosoma X extra o son mosaicos somáticos para la mutación. Recientemente se describieron recién nacidos masculinos con problemas respiratorios severos, hipotonía y encefalopatía neonatal que son hemicingotos para mutaciones en *MECP2*, y

que fallecen por problemas respiratorios en los primeros años de vida.<sup>96</sup> La mayoría de las mutaciones de *novo* se producen en el cromosoma X paterno, el cual sólo puede ser heredado a sus hijas o a los productos con síndrome de Klinefelter, lo que explica por qué existen más mujeres que hombres afectados.<sup>93,94</sup>

La mayoría de las mutaciones reportadas en *MECP2* son sin sentido o de sentido equivocado y afectan tanto el dominio MBD como el dominio TRD. Se han identificado dentro del gen algunas zonas calientes de mutación en dinucleótidos CpG implicadas en transiciones de C por T. Se ha postulado que el síndrome de Rett es el resultado de un patrón aberrante de la expresión génica, ya sea debido a la falla de *MECP2* para unirse en los sitios genómicos adecuados (mutaciones en MBD) o a la incapacidad para reclutar a los complejos de represión, debido a que la proteína no pueda unirse al ADN o porque sea incapaz de interaccionar con ellos (mutaciones en TRD). En apoyo a esta propuesta se ha documentado que existe un incremento de histona H4 acetilada en líneas celulares derivadas de pacientes con Síndrome de Rett.<sup>93,94,97,98</sup>

En los últimos dos años se han reportado formas leves de retraso mental en sujetos masculinos con mutaciones en *MECP2*.<sup>94,99</sup> Estos datos enfatizan la importancia de *MECP2* en el cerebro, ya que aun cuando el gen *MECP2* se expresa ampliamente, es particularmente abundante en este tejido. Recientemente se ha sugerido que *MECP2* sea un regulador transcripcional específico del sistema nervioso central. A partir de trabajos realizados en ratones, en los cuales el gen es deletado postcigóticamente únicamente en las neuronas del SNC y presentan el fenotipo de la enfermedad, se ha sugerido que el síndrome de Rett debe ser un problema neurodegenerativo más que un problema de neurodesarrollo.<sup>94,98</sup>

### Síndrome ATRX

Las mutaciones en el gen *ATRX* están relacionadas con un desorden recesivo ligado al cromosoma X, que incluye alfa talasemia, retraso mental severo, microcefalia, dismorfismo facial y anomalías urogenitales.<sup>87,88</sup> El gen *ATRX* codifica para una proteína nuclear similar a SWI/SNF (complejo remodelador de la cromatina), contiene un dominio PHD y colocaliza con la heterocromatina pericentromérica.<sup>100</sup> En los pacientes con este síndrome se observan cambios en los patrones de metilación de las secuencias altamente repetitivas, tales como el ADNr y los repetidos subteloméri-

cos.<sup>101</sup> Se ha propuesto que la pérdida de la función de *ATRX* puede estar relacionada con cambios en la estructura de la cromatina y de la metilación del ADN que conduzcan a la desregulación de la expresión génica, debido a que *ATRX* podría ser miembro de un gran complejo represor que incluya a las HDAC.<sup>87,88</sup>

### Síndrome de X frágil

El síndrome de X frágil tiene una incidencia de 1 en 4,000 varones y 1 en 6,000 mujeres.<sup>102</sup> Se hereda de forma dominante ligado al cromosoma X con una penetrancia reducida, 80% en hombres y 30% en mujeres.<sup>103,104</sup> Este síndrome se asocia con un sitio frágil, *FRAXA* (*fragile site, X chromosome, A site*) localizado en Xq27.3. Los datos clínicos del síndrome incluyen retraso mental de moderado a severo, con IQ de 20 a 60, anomalías faciales con una mandíbula prominente y orejas grandes y macroorquidismo en los varones pospúberes.<sup>103,104</sup> El defecto molecular fue demostrado en 1991, al identificar por clonación posicional al gen *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*).<sup>105</sup>

El gen *FMR1* tiene 17 exones y abarca aproximadamente 38kb. El transcrito tiene 4.4kb y dentro del primer exón, en la región 5' no traducida, contiene un repetido CGG altamente polimórfico en número y contenido, normalmente espaciado por interrupciones AGG; el tamaño normal del repetido varía de 7 a 60, con 30 repetidos en el alelo más común. En la mayoría de los individuos afectados, los repetidos CGG se encuentran masivamente amplificados (> 230) y anormalmente metilados, lo que constituye la mutación completa que resulta en el silenciamiento transcripcional del gen *FMR1* y falta del producto proteico, una proteína citoplasmática de unión a RNA que parecería participar en la localización de los RNAm en las neuronas para la síntesis proteica.<sup>106,107</sup> Recientemente se sugirió que FMR1P actúa como un regulador negativo de la traducción en los sinaptosomas y espinas dendríticas.<sup>108</sup> Los alelos con 60 a 230 repetidos son considerados premutaciones, debido a que generalmente no se encuentran metilados y los niveles de transcripción y proteína *FMR1* son normales; sin embargo, estos alelos son extremadamente inestables durante su transmisión a la siguiente generación, principalmente en la meiosis femenina, donde generalmente se amplifican y metilan.<sup>103,104</sup>

### Síndrome de Beckwith Wiedemann

El síndrome de Beckwith Wiedemann (SBW) es una enfermedad congénita que se caracteriza por

presentar problemas de sobrecrecimiento y neoplasias. Las principales características son macrosomía, macroglosia y defectos de línea media de la pared abdominal, junto con predisposición a cánceres embrionarios. La mayoría de los casos se deben a modificaciones epigenéticas más que a alteraciones genéticas que llevan a la pérdida de la impronta (*LOI, lost of imprinting*) de un grupo de genes localizados en una región con impronta en 11p15. Aproximadamente 15% de los pacientes con este síndrome tienen un patrón de metilación aberrante de los genes *H19* e *IGF2* y alrededor de la mitad presentan modificaciones en la metilación e impronta del gen *LIT1*, que codifica para un ARN no traducido y se encuentra dentro del gen *K<sub>v</sub>LQT1* (*KCNQ1*) que codifica para un canal de potasio que se encuentra mutado en los pacientes con síndrome de QT largo, un defecto en la conducción cardiaca heredado en forma dominante. *LOI* puede implicar hipo o hipermetilación, dependiendo del gen.<sup>79,80</sup> En el caso de *H19* se observa hipermetilación, lo que conduce a la activación aberrante de *IGF2*, en el caso de *LIT1* la hipometilación del alelo materno, que normalmente se encuentra metilado, lleva a la inactivación anormal del gen *P57<sup>KIP2</sup>*, también llamado *CDKN1*, que codifica para un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas. *LIT1* se encuentra normalmente metilado en el cromosoma materno y desmetilado en el paterno, en los pacientes con síndrome de Beckwith Wiedemann por un defecto en la impronta, el alelo materno se encuentra aberrantemente hipometilado (Figura 3). En ambos casos, la activación de *IGF2* o la inactivación de *CDKN1*, las células adquieren una ventaja proliferativa, lo que explica la alta incidencia de neoplasias en estos pacientes.<sup>15,76,79,80,84</sup> Recientemente se demostró, que en los pacientes con SBW, la metilación aberrante de *LIT1* se asocia específicamente con problemas de sobrecrecimiento y defectos congénitos y que las alteraciones en la metilación de *H19* incrementan el riesgo de cáncer.<sup>109</sup>

### Síndromes de Prader Willi/ Angelman

Los síndromes de Prader Willi (SPW) y de Angelman (SA) son desórdenes neurogenéticos producidos por la pérdida de función de genes improntados de forma opuesta y localizados en 15q11-q13. Esta región contiene al menos 7 genes improntados, cinco de los cuales se expresan exclusivamente del cromosoma paterno y dos muestran expresión materna tejido específica, uno de estos genes *UBE3A* está improntado sólo en ciertas regiones del cerebro<sup>110</sup> (Figura 3). Deleciones de ~ 4 Mb del cromosoma paterno causan

SPW, el cual se caracteriza por hipotonía y retraso en el desarrollo infantil, con aparición posterior de hiperfagia que conduce a obesidad;<sup>111</sup> deleciones de la misma región del cromosoma materno producen SA, el cual presenta retraso mental severo carencia del lenguaje, convulsiones y episodios de risa.<sup>15,110</sup> La mayoría de los pacientes con estos padecimientos presentan una deleción cromosómica *de novo*, algunos presentan disomía uniparental y en el caso del síndrome de Angelman pueden presentar mutaciones en el gen *UBE3A*. En pocos pacientes, 1% para SPW y 2-4% para SA, la enfermedad es producto de un patrón aberrante de impronta que conduce al silenciamiento génico.<sup>110,112</sup> En el SPW, el cromosoma paterno presenta un patrón materno de impronta, mientras que en el SA el cromosoma materno presenta impronta paterna. En algunos pacientes, la metilación anormal del ADN puede ser consecuencia de una microdeleción que afecta el centro regulador de la impronta. Se ha observado que microdeleciones maternas que afectan una región de 880 bp (IC Angelman) localizada a 35 kb del exón 1 del gen *SNURF-SNRPN* impiden el establecimiento de la impronta materna y producen SA (Figura 3). La impronta en el cromosoma paterno no puede ser mantenida durante la embriogénesis temprana si ocurren deleciones de 4.3kb (IC Prader Willi) alrededor del exón 1 del gen *SNURF-SNRPN* en el cromosoma paterno.<sup>113</sup> Sin embargo, la mayoría de los pacientes que presentan patrones anormales de impronta no tienen este tipo de deleciones, lo que ha llevado a postular que adicionalmente otros mecanismos podrían estar implicados, tales como alteraciones en el marcaje epigenético durante las meiosis femenina o masculina, incluyendo la metilación en K9 de la histona H3<sup>62</sup> o modificaciones a la impronta durante los primeros estadios embrionarios.<sup>114</sup>

Datos recientes han demostrado que las técnicas de reproducción asistida, principalmente la inyección intracitoplasmática de esperma, pueden afectar los procesos epigenéticos en la embriogénesis temprana causando defectos congénitos, específicamente síndromes de Angelman y de Beckwith-Wiedemann.<sup>115-117</sup>

## METILACIÓN Y CÁNCER

Probablemente uno de los procesos patológicos en los que intensamente se está estudiando la participación de la metilación del ADN es en el cáncer. Aunque este tema junto con otras enfermedades en el humano es motivo de una revisión especial, podemos introducir algunos aspectos de esta importante relación. El

proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que son acumuladas en la célula y que terminan por permitir un crecimiento no regulado de ésta. Entre los cambios genéticos podemos mencionar la presencia de mutaciones en genes claves que participan en la regulación del ciclo y crecimiento celulares y promueven el crecimiento anormal. Por otro lado, los fenómenos epigenéticos, como la metilación de citosinas, favorecen la aparición de mutaciones. Un desbalance en el patrón de metilación del ADN ha sido particularmente observado en los cánceres esporádicos. Los cambios en la metilación que con mayor frecuencia han sido detectados en células cancerosas, incluyen la pérdida de ésta en secuencias normalmente metiladas (hipometilación) y la metilación aberrante de secuencias usualmente no metiladas (hipermetilación), localizada principalmente en islas CpG. Este tipo de alteraciones se presenta generalmente en tumores donde la resultante es en general una disminución en el nivel total de metilación. La hipometilación y la hipermetilación ocurren en sitios específicos del genoma, pero éstos son diferentes dependiendo del tipo de células tumorales, lo que sugiere una etiología distinta. Además, ambos defectos pueden preceder a la malignidad, lo que indica que no son una simple consecuencia del proceso neoplásico.<sup>8,15,89,118</sup>

En la actualidad se han acumulado un número importante de observaciones sobre las alteraciones en la metilación que participan en los diferentes estadios del cáncer. Dichas alteraciones pueden aparecer antes de su inicio, en células premalignas o durante la progresión del tumor, y participar en la severidad y/o en el grado de malignidad. Aunque en algunos casos no hay datos precisos, las observaciones en lesiones premalignas, tumores primarios y en diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo* permiten hacer estas suposiciones.<sup>89,119</sup>

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica en los mamíferos, es vital en el desarrollo embrionario y tiene un papel crítico en el silenciamiento de genes específicos durante la diferenciación celular. Participa en la represión de los elementos genéticos móviles, como secuencias virales y transposones, siendo un mecanismo de defensa, aunque podría participar también en el proceso evolutivo.

La metilación del ADN es importante en diversos procesos como mantener la estabilidad del genoma, la

inactivación del cromosoma X y la impronta genómica entre otros. En los últimos años ha habido grandes avances en el conocimiento de cómo la metilación del ADN afecta diversos procesos como la regulación transcripcional, la estructura de la cromatina, la estabilidad del genoma y el proceso neoplásico. Es por ello que resulta de vital importancia determinar las funciones precisas, blancos específicos, localización nuclear y las proteínas o complejos con que interacciona la maquinaria encargada de crear y mantener los patrones de metilación del ADN, metiltransferasas de mantenimiento y de novo, así como desmetilasas. Los descubrimientos recientes parecen confirmar que la presencia de 5mC es indispensable para mantener el estado de represión transcripcional más que para iniciarlo y enfatizan la necesidad de identificar a los factores implicados en el inicio del silenciamiento génico y en la remodelación de la cromatina. Fuertes candidatos son las metilasas de histonas, cuya función parece ser primordial, incluso en organismos como las levaduras que no metilan su ADN, para la regulación epigenética de la expresión génica. Hoy en día éste es un campo de intensa investigación para tratar de entender los complejos mecanismos que asocian a las metilasas, acetilasas y desacetilasas de histonas con las ADN metiltransferasas y desmetilasas, y las proteínas de unión a ADN metilado, incluyendo a los aislantes, en la regulación de la expresión génica. Dado que los mecanismos epigenéticos pueden ser influenciados por factores externos como la dieta, se ha sugerido que constituye una forma de respuesta del organismo al medio a través de cambios en la expresión génica.

Las alteraciones en la metilación del ADN se asocian con diferentes patologías y principalmente con el proceso de transformación celular. En este sentido, diversas evidencias han demostrado la importancia de los mecanismos epigenéticos en la regulación transcripcional de genes supresores de tumores y oncogenes. Cambios en el estado de metilación de genes que participan en la reparación del ADN, regulación del ciclo celular, crecimiento celular y adhesión célula-célula promueven junto con la inestabilidad intrínseca de la 5-mC, para incrementar la tasa de mutación, el proceso neoplásico.

La modulación selectiva de los fenómenos epigenéticos, particularmente la metilación del ADN, podría tener implicaciones de importancia clínica, en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del cáncer. El conocimiento de los patrones de metilación en las diferentes regiones del genoma nos permitirán establecer en forma precisa la aparición de cambios asociados con el estado de malignidad de diversos tu-

mores. Asimismo, debido a que los cambios epigenéticos son reversibles, el diseño de estrategias terapéuticas encaminadas a corregir las alteraciones en la metilación del ADN y en el código de las histonas, principalmente mediante el uso de inhibidores de las DNMT y las HDAC, parece ser una ruta promisoría para mejorar el manejo y pronóstico de los pacientes con padecimientos que involucran alteraciones en los patrones de metilación del ADN y primordialmente en aquellos con cáncer.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Rubén Lisker la revisión y comentarios al manuscrito.

Este trabajo fue parcialmente financiado por: Proyecto CONACYT 34861-N y Facultad de Química, UNAM. Rodríguez Dorantes M. es becario de CONACYT (117986).

## REFERENCIAS

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
3. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-6.
4. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 2001; 278: 25-31.
5. Brown TA. Genomes. 2nd. Ed. U.K.: Wiley-Liss Manchester; 2002, p. 572.
6. Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 2000; 408: 538-40.
7. Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. None-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and maybe mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5237-42.
8. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303.
9. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
10. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11995-9.
11. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999; 23: 58-61.
12. Bird AP, Taggart MH, Nicholls RD, Higgs DR. None-methylated CpG-rich islands at the human  $\alpha$  globin locus: implications for evolution of the  $\alpha$  globin pseudogene. *EMBO J* 1987; 6: 999-1004.
13. McKeon C, Ohkubo H, Pastan I, de Crombrugge B. Unusual methylation pattern of the  $\alpha 2(1)$  collagen gene. *Cell* 1982; 29: 203-10.
14. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 1992; 6: 705-14.

15. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001; 195: 97-110.
16. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-93.
17. Bird A, Wolffe AP. Methylation induces repression-belts, braces and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-4.
18. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-402.
19. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915-26.
20. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
21. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 93-124.
22. Araujo FD, Knox JD, Szyf M, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3475-82.
23. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997; 277: 1996-2000.
24. Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 2002; 18: 275-7.
25. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh L, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Ku X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-91.
26. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; 25: 338-42.
27. Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 32282-7.
28. Cervoni N, Bhattacharya S, Szyf M. DNA demethylase is a processive enzyme. *J Biol Chem* 1999; 274: 8363-6.
29. Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5894-6.
30. Kress C, Thomassin H, Grange T. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett* 2001; 494: 135-40.
31. Zhu B, Zheng Y, Hess Angliker H, Schwarz S, Siegmann M, Thiry S, Jost JP. %Methylcytosine DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5135-39.
32. Oswald J, Engemann S, Lane E, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000; 10: 475-8.
33. Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 40778-87.
34. O'Neill RJW, Oncill MJ, Graves JAM. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 1998; 393: 68-72.
35. Iguchi-Arigo SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 1989; 3: 612-19.
36. Tate PH, Bird AP. Effects of DN methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-31.
37. Holler M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 1988; 2: 1127-35.
38. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989; 58: 499-507.
39. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 4886-92.
40. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5085-92.
41. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001; 23: 1131-7.
42. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG binding proteins. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1-6.
43. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 1999; 401: 301-4.
44. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-9.
45. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23: 185-8.
46. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579-83.
47. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-91.
48. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-6.
49. Wade P. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 693-8.
50. Cervantes-Peredo A, López-López M. Bases moleculares de la herencia. En: Guízar Vázquez JJ. (ed.). *Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3a. Ed. México, D.F.: Manual Moderno; 2001, p. 5-71.
51. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 2002; 108: 489-500.
52. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-80.
53. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. The marks, mechanism and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J* 2001; 356: 1-10.
54. Marmonstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 155-61.
55. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 1999; 13: 1924-35.
56. Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14967-72.
57. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewald SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 2001; 292: 110-3.

58. Bannister A, Schneider R, Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 2002; 109: 801-6.
59. Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; 414: 277-83.
60. Richards EJ. Chromatin methylation: who's on first? *Curr Biol* 2002; 12: R694-5.
61. Mermoud JE, Popova B, Peters AH, Jenuwein T, Brockdorff N. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 2002; 12: 247-51.
62. Xin Z, Allis D, Wagstaff J. Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at Prader-Willi syndrome imprinting center. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1389-94.
63. Brachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B. Histone modifications and silencing prior DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3: 89-95.
64. Nguyen CT, Weisenberg DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JCY, Liang G, Jones PA. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002; 62: 6456-61.
65. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 7213-8.
66. Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 571-610.
67. Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 1997; 7: 157-65.
68. Brockdorff N. 2002. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *Xist* RNA. *Trends Genet* 18: 352-8.
69. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tolorenzi R, Willard H. A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991; 349: 38-44.
70. Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 1996; 10: 1991-2002.
71. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 59-67.
72. Boumil RM, Lee JT. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2225-32.
73. Gilbert SL, Sharp PA. Promotor-specific hypoacetylation of X inactivated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13825-30.
74. Chadwick BP, Willard HF. Cell cycle-dependent localization of macro H2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 2002; 157: 1113-23.
75. Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation center. *Nat Genet* 1999; 21: 400-4.
76. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
77. Lopes S, Lewis A, Hajkova P, Dean W, Oswald J, Forné T, Murrell A, Constância M, Walter J, Reik W. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 295-305.
78. Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* 2002; 192: 245-58.
79. Feinberg AP. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106: 739-40.
80. Maher E, Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in cluster revisited. *J Clin Invest* 2000; 105: 247-52.
81. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000; 405: 482-5.
82. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorso JM, Tighman SM. CTCF mediates methylation sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature* 2000; 405: 486-9.
83. Szabo P, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the *H19* imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 2000; 10: 607-10.
84. Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 2001; 293: 1086-9.
85. Zwart R, Sleutels F, Wutz A, Schinkel AH, Barlow DP. Bidirectional action of the *Igf2r* imprint control element on upstream and downstream imprinted genes. *Genes Dev* 2001; 15: 2361-6.
86. Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz TC, Shirayoshi Y, Oshimura M. Targeted disruption of the human *LIT* locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1829-41.
87. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 11-19.
88. Hendrick B, Bickmore W. Human disease with underlying defects in chromatin structure and modification. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2233-42.
89. Plass C. Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2479-88.
90. Franceschini P, Martino S, Ciocchini M, Ciuti E, Vardeu MP, Guala A, Signorile F, Camerano P, Franceschini D, Tovo PA. Variability of clinical and immunological phenotype in immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 840-6.
91. Tao Q, Huang H, Geiman TM, Lim CY, Qiu GH, Robertson KD. Defective *de novo* methylation of viral and cellular sequences in ICF syndrome cells. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2091-102.
92. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236: 87-95.
93. Dragich J, Houwink-Manville I, Schanen C. Rett syndrome: a surprising result of a mutation in *MECP2*. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2365-75.
94. Webb T, Latif F. Rett syndrome and the *MECP2* gene. *J Med Genet* 2001; 38: 217-23.
95. Webb T, Watkiss E. A comparative study of X inactivation in Rett syndrome probands and control subjects. *Clin Genet* 1996; 49: 189-95.
96. Imessaoudene B, Bonnefont JP, Royer G, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Lyon G, Munnich A, Amiel J. *MECP2* mutation in non-fatal, non progressive encephalopathy in a male. *J Med Genet* 2001; 38: 171-4.
97. Ballestar E, Yuzufzai TM, Wolffe AP. Effects of rett syndrome mutations on the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA. *Biochemistry* 2000; 39: 7100-6.
98. Shahbazian MD, Zoghbi HY. Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1259-72.
99. Orrico A, Lam CW, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, Poon PMK, Zapella M, Federico A, Sorrentino V. *MECP2* mutation in male patients with non specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000; 481: 285-8.
100. Picketts DJ, Higgs DR, Bachhoo S, Blake DJ, Quarrell OW, Gibbons RJ. *ATRX* encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism

- underlying the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1899-907.
101. Gibbons RJ, Mc Dowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. Mutations in ATRX encoding a SWI/SNF-like protein cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000; 24: 368-71.
  102. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. The prevalence of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-7.
  103. Oostra BA, Chiurazzi P. The fragile X Gene and its function. *Clin Genet* 2001; 60: 399-408.
  104. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 901-8.
  105. Vertek AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-14.
  106. Oberle I, Rosseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
  107. Coffe B, Zhang F, Ceman S, Warren ST, Reines D. Histone modifications depict and aberrantly heterocromatinized *FMR1* gene in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 923-32.
  108. Mzroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian W. Trapping of messenger RNA by the fragile X mental retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3007-17.
  109. De Baun MR, Niemitz EL, Mc Neil DE, Bradenburg SA, Lee MP, Freinberg AP. Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 604-11.
  110. Mann MR, Bartolomei MS. Towards a molecular understanding of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1867-73.
  111. Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001; 108: 1-5.
  112. Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 1998; 14: 194-200.
  113. Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *EMBO J* 2002; 21: 5807-14.
  114. Buiting K, Grob S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, El-Maari O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with imprinting defect. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 571-7.
  115. Cox GF, Bürger J, Lip V, Ulrike A, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162-4.
  116. Óstavik KH, Eiklid K, Ven Der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skejeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 218-9.
  117. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 156-60.
  118. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.
  119. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 2002; 111: 115-27.

*Reimpresos:*

**Dr. Marco A. Cerbón**  
 Departamento de Biología  
 Facultad de Química, UNAM  
 Circuito interior  
 04510, México, D.F.  
 Tel.: 52 56223098  
 Fax: 52 56162010  
 Correo electrónico: macer@servidor.unam.mx  
 mcerbon85@hotmail.com

*Recibido el 5 de mayo de 2003.  
 Aceptado el 25 de septiembre de 2003.*

### 3. Planteamiento del Problema.

Se ha establecido que los andrógenos tienen un papel muy importante en el desarrollo de los mamíferos. La enzima responsable de la conversión de Testosterona a DHT es la  $5\alpha$ -reductasa. El conocimiento de las características de las isoenzimas de la  $5\alpha$ -reductasa, de los mecanismos involucrados en su regulación, así como el origen de mutaciones observadas en el gen tipo 2 es fundamental para comprender los diferentes procesos fisiológicos en los que participa la  $5\alpha$ -reductasa en diferentes tejidos.

A pesar de que existen numerosos datos acerca de estas enzimas en cuanto a la regulación de su expresión por andrógenos, aún no han sido establecido cuales son los mecanismos por los cuales se da una regulación diferencial de las dos isoenzimas en diferentes tejidos. Como se describió en la revisión titulada "*Metilación del ADN un Mecanismo Epigenético de Importancia Médica*", uno de los mecanismos epigenéticos relacionados con la regulación transcripcional es la metilación del ADN. La hipermetilación de un gen en citosinas en islas CpG, particularmente en la región del promotor inhibe la transcripción,

Por otro lado se ha observado que la ausencia de actividad de la enzima es ocasionada por una deficiencia en la expresión de la proteína, debido a una mutación puntual que provoca cambio de un aminoácido y con ello una baja en la actividad de la enzima (cambios en el  $K_m$ ). Mutaciones en el gen tipo 2 han sido asociadas a la enfermedad llamada deficiencia primaria la  $5\alpha$ -reductasa. Sin embargo no se ha establecido cual es el origen de estas mutaciones.

Esta información es fundamental para establecer los mecanismos por los cuales los genes de la  $5\alpha$ -reductasa ejercen sus efectos en diferentes tejidos. Por lo que en este trabajo se estudió la expresión diferencial de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa en dos diferentes tipos celulares: linfocitos y fibroblastos de área genital en el humano, a su vez se tratará de correlacionar el grado de metilación de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa

en la región del promotor con la expresión del gen. Así mismo se tratarán de establecer los patrones de metilación que presentan pacientes con deficiencia de la enzima.

Para corroborar la regulación de la expresión del gen paralelamente se estudiaron las regiones que se encuentran metiladas particularmente en la región del promotor. Se realizaron experimentos con fibroblastos de área genital aplicando diferentes tratamientos con andrógenos y con inhibidores de la metilación.

#### **4. Hipótesis**

Es posible que los cambios en el patrón de metilación de los genes de  $5\alpha$ - reductasa participen en la aparición de mutaciones y por otra parte este podría ser un mecanismo de regulación transcripcional de este gen permitiendo su expresión solo en tejidos específicos. Además los andrógenos podrían afectar los patrones de metilación del gen durante el desarrollo.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Analizar el grado de metilación de los genes que codifican para las isoenzimas de la  $5\alpha$ -reductasa esteroidea en tejidos reproductivos y no reproductivos en el humano y su participación como uno de los posibles mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión diferencial de estos genes.

### 5.2 Objetivos Particulares

-Estudiar posibles diferencias en la expresión y en los patrones de metilación entre los genes tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa en el DNA de linfocitos de sujetos normales y deficientes de la enzima tipo 2

-Analizar los sitios de metilación de la región del promotor del gen de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2.

-Conocer los patrones de metilación de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa en DNA de fibroblastos de área genital y compararlos con los de linfocitos.

-Comparar el efecto de diferentes dosis de andrógenos en cultivos de fibroblastos sobre los patrones de metilación y sobre la tasa de transcripción de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa esteroidea.

-Iniciar tratamientos con andrógenos a corto, mediano y largo plazo y observar si hay cambios en los patrones de metilación en relación a su expresión.

-Comparar el efecto de un agente desmetilante como la 5-aza-2-deoxicitidina en cultivos de fibroblastos de área genital sobre la transcripción de ambos genes

-Analizar el patrón de metilación del gen tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa de sujetos normales y con deficiencia de la enzima utilizando endonucleasas de restricción.

-Comparar el patrón de metilación entre sujetos normales y sujetos con deficiencia de la enzima.

## **6. Materiales y Métodos.**

### **6. 1 Muestras de Tejido**

En este estudio se utilizaron dos tipos celulares con diferente sensibilidad a la acción de Andrógenos, fibroblastos de área genital y linfocitos periféricos

### **6. 2 Fibroblastos de área genital**

Se utilizaron fibroblastos obtenidos de prepucio de niños entre los 9 meses y 2 años y medio de edad. Se cultivaron de acuerdo a lo descrito previamente en la literatura. Los fibroblastos se cultivaron en dos diferentes condiciones. Una con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FCS) (Gibco , BRL) y el otro grupo de cultivo fue con medio libre de rojo fenol tratado previamente con carbón para eliminar trazas de hormonas .

Las células fueron cosechadas con una mezcla de 0.025 % tripsina/ 0.01 % EDTA y contadas. Los fibroblastos sembrados en cajas de 75 cm<sup>2</sup> a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ ml en medio de cultivo libre de rojo fenol tratado previamente con carbón. Después de 24 hrs, el medio fue reemplazado por medio fresco con cantidades apropiadas para la concentración final de 10 nM de Testosterona y 10 nM de dihidrotestosterona (DHT). Se continuó la incubación por seis días. Las células control solo fueron expuestas al vehículo (la concentración final de etanol o de agua destilada nunca excedió el 1 % en las muestras tratadas y en las muestras control).

### **6. 3 Tratamiento de los fibroblastos con un agente desmetilante**

Los fibroblastos se cultivaron con diferentes dosis de un inhibidor de metilación, llamado 5-aza-2-deoxicitidina, a diferentes dosis, (0, 10, 20 50, 100 nM) para establecer una curva dosis respuesta. Después de seis días de exposición a los

fármacos, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se obtuvieron las pastillas celulares para la posterior extracción de RNA y DNA.

Los fibroblastos se cultivaron en las condiciones descritas anteriormente y a un grupo se le adicionó 5-aza-2-deoxicitidina a una concentración de 50nm por 6 días. Se cosecharon en el día 7, y se lavaron con PBS. La pastilla se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El primero grupo se utilizó para extracción de RNA total y el segundo para la extracción de DNA.

Se hizo la extracción de RNA y DNA total de los fibroblastos tratados con 5-aza-2-deoxicitidina.

#### **6. 4 Sangre periférica**

Se tomaron de 10 a 50 ml de sangre de 7 sujetos normales y 5 con deficiencia primaria de la enzima en tubos previamente tratados con heparina como anticoagulante.

Para cumplir con el primer objetivo particular se realizó un gradiente de Ficoll/Hypaque para aislar únicamente los linfocitos. Posteriormente los linfocitos se lavaron cuatro veces con medio de cultivo RPMI-1640 a 2500 rpm por 5 minutos para eliminar las trazas del Ficoll/Hypaque . La pastilla se congeló a  $-70$  para su posterior extracción de RNA y DNA.

## **6. 5 Extracción de RNA total**

Se realizó la extracción de RNA total de los linfocitos cultivados y de los fibroblastos de área genital, por el método del isotiocianato de guanidina (Chomzinsky ). La concentración de RNA se determinó por la medición de la absorbancia a 260 nm y su integridad fue verificada por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1 %.

## **6. 6 RT-PCR**

La expresión de las dos isoenzimas en los diferentes tejidos se determinó utilizando transcripción reversa y posteriormente reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones se realizaron a 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min. Los ciclos del PCR fueron a 95°C por 30 s para la desnaturalización y 72°C para la extensión en todos los casos. Un ciclo final fue realizado a 72°C por 5 min en todos los casos.

Se depositaron 25 µl de cada reacción en geles de agarosa al 2 % para su corrimiento por electroforésis. Los productos fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ ml). En todos los caso se detectó una sola banda del peso molecular esperado (Tabla 2). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se describen en la tabla 2. Se utilizó β-actina como gen constitutivo.

## 6. 7 Extracción de DNA

La pastilla final obtenida de los cultivos de fibroblastos y de las muestras de linfocitos se proceso para la extracción de DNA por el método de fenol/cloroformo/ proteínasa K que se describe brevemente a continuación:

Cada muestra se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis ( Tris -HCL, pH 7.4, 0. 1 M de EDTA 20 µg /ml de RNAsa pancreática, 0.5% de SDS. Después de 1 hora de incubación los lisados fueron digeridos con proteínasa K (100 µg/ ml) a 37° C toda la noche. Las proteínas fueron removidas con una mezcla de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico (50:49:1) dos veces y una extracción final de cloroformo/ alcohol isoamílico (49:1). El sobrenadante obtenido se precipitó con 1/10 de acetato de amonio y 2.5 volúmenes de alcohol absoluto. El DNA obtenido se centrifugó a 1500 RPM durante 10 min. Se lavó con alcohol al 75 % dos veces y con alcohol absoluto una vez a 6500 rpm. Se dejó secar y se resuspendió en TE (Tris-EDTA, ph= 7) a temperatura ambiente.

**TABLA 2. Oligonucleotidos utilizados para determinar la expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en diferentes tipos celulares.**

Gen	Secuencia	Tamaño pb	Tm
<b>SRD5A1 T</b>	5'- GGC TTG TGG TTA ACA GGC AT - 3' 5'- CAA ATT TCC GGA GGT ACC AC- 3'	<b>268</b>	58 ° C
<b>SRD5A2 T</b>	5'- GCA CTG GCC TTG TAC GTC G - 3' 5'- GGA TAA GGC CTC CCT CGA T- 3'	<b>258</b>	58 ° C
<b><math>\beta</math> - ACTINA</b>	5'- GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG - 3' 5'- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG - 3'	<b>220</b>	58 ° C

**Falta página**

**N° 28**

### **6. 9. 1 Desulfonación**

Después del periodo de incubación del DNA se procede a la desulfonación, para eliminar los restos de metabisulfito de sodio. Se precipita la pastilla con 2 volúmenes de Etanol.

La pastilla se disuelve en 200 $\mu$ l de NaOH 0.2 M y se deja reposar a temperatura ambiente por 15 min. El DNA es precipitado adicionando 0.5 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M y 2 volúmenes de Etanol. Se centrifuga por 10 minutos.

El DNA modificado fue resuspendido en 50  $\mu$ l de TE ( 0.1 M de Tris- HCl, 1mM de EDTA) y almacenado inmediatamente a  $-70^{\circ}$  C. También el DNA puede disolverse en H<sub>2</sub>O.

El producto se analizó utilizando un gel de agarosa e inmediatamente se utilizó para PCR.

### **6. 10 Diseño de oligonucleótidos selectivos.**

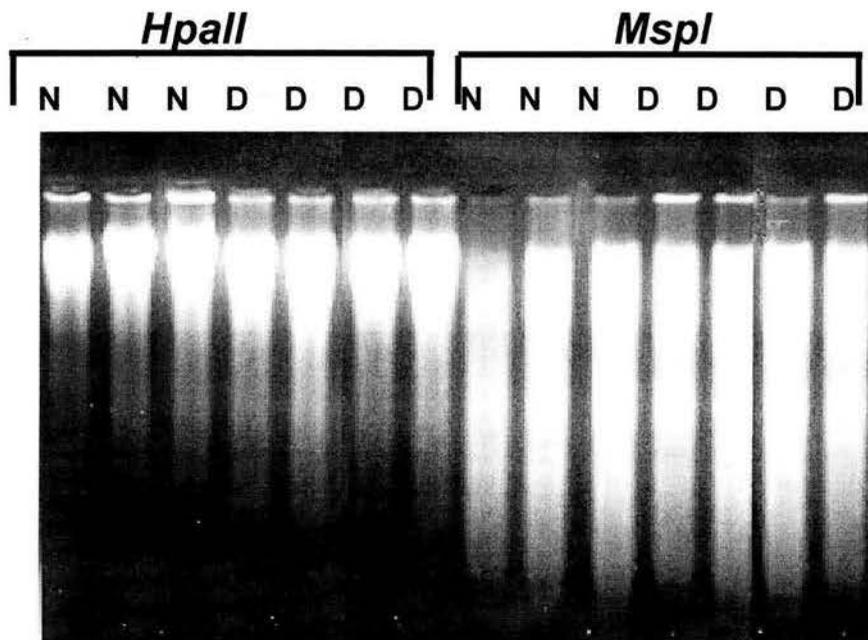
Se diseñan a partir de la secuencia original, tomando en cuenta que las citosinas que no están metiladas se convierten a uracilos (U) después del tratamiento del DNA con metabisulfito y que estos son reconocidos por la taq polimerasa como timinas T. Entonces los nuevos oligonucleótidos se diseñan tomando en cuenta la secuencia con los cambios que ocurren después del tratamiento con bisulfito. Se hacen tres juegos de oligonucleótidos partiendo de la secuencia original.

**TABLA 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa del DNA tratado con metabisulfito de sodio.**

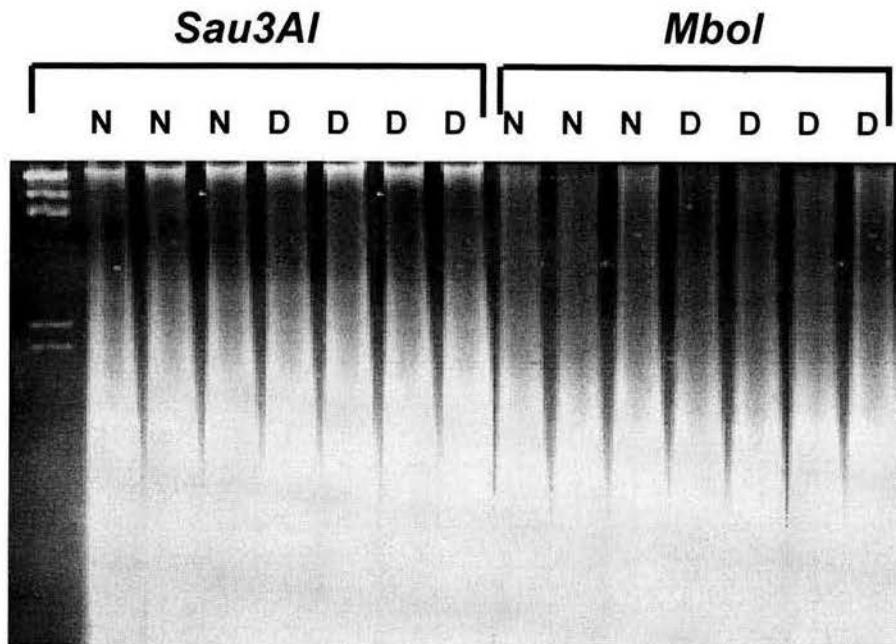
<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Tm</b>
<b>PSRD5A1-W S</b>	5' - GAA AGA GAC GTC TAC CCC G - 3'	<b>418</b>	62° C
<b>PSRD5A1-W AS</b>	5' - TGT TTT CCC TGT CAC GCC G - 3'		
<b>PSRD5A1-U S</b>	5' - GAA AGA GAT GTT TAT TTT G - 3'	<b>418</b>	52° C
<b>PSRD5A1-U AN</b>	5' - TAT TTT CCC TAT CAC ACC A - 3'		
<b>PSRD5A1-M S</b>	5' - GAA AGA GAC GTT TAT TTC G - 3'	<b>418</b>	52° C
<b>PSRD5A1-M AN</b>	5' - TAT TTT CCC TAT CAC GCC G - 3'		
<b>PSRD5A2-W S</b>	5' - GAG GAC GCG CAG AAT CTC G - 3'	<b>578</b>	62° C
<b>PSRD5A2-W AN</b>	5' - GGC CTT CTT AGT TCG CCC G - 3'		
<b>PSRD5A2-U S</b>	5' - GAG GAT GTG TAG AAT TTT G - 3'	<b>578</b>	52° C
<b>PSRD5A2-U AN</b>	5' - AAC CTT CTT AAT TCA CCC A - 3'		
<b>PSRD5A2-M S</b>	5' - GAG GAC GCG TAG AAT TTC G - 3'	<b>578</b>	52° C
<b>PSRD5A2-M AN</b>	5' - AAC CTT CTT AAT TCG CCC G - 3'		

## 6. 11 Digestión del DNA obtenido de linfocitos con Enzimas de restricción

Para la digestión con enzimas de restricción se utilizaron 15  $\mu\text{g}$  de DNA los cuales fueron digeridos con 6 U/ $\mu\text{g}$  de las siguientes enzimas *HpaII*, *MspI*, *Sau 3 A* y *MboI*. La digestión se llevó a cabo durante toda la noche en las condiciones descritas por el fabricante. Pasado este tiempo se detuvo la reacción de digestión con 1mM de EDTA. Posteriormente el DNA digerido fué separado por electroforésis en geles de agarosa al 1-1.5 % en 0.5 amortiguador TAE (Tris Acetato EDTA) por 12 horas a 30 V.



**FIGURA 4. Digestión del DNA obtenido de linfocitos con Enzimas de restricción** DNA de sujetos normales (N) y deficientes de 5 $\alpha$ - reductasa (D) digeridos con *Hpa II* (sensible a metilación en citosinas) y *Msp I* no sensible. Se puede observar que con *HpaII* no hay una digestión completa del DNA.



**FIGURA 5. DNA digerido con enzimas sensibles a metilación.** DNA extraído de linfocitos de tres sujetos normales (N) y cuatro deficientes de  $5\alpha$ -reductasa digeridos con una enzima sensible a metilación en citosinas (*Sau 3AI*) y una enzima insensible (*Mbo I*). Se puede observar que la digestión DNA es completa, aunque en el caso de *Sau 3AI* se observa una pequeña cantidad de DNA sin digerir.

Los geles de agarosa fueron hidrolizados con NaOH 0.5 M y 1.5M de NaCl por 45 min. Se lavaron con agua estéril y se neutralizaron con una solución 1M de Tris-HCl (Ph=7.4), 1.5 M de NaCl. Una vez que se realizó este procedimiento los geles fueron transferidos a membranas de nylon utilizando la solución amortiguadora SSC 10X (1.5 M de NaCl 0.15 M de citrato de sodio pH=7). Después de la transferencia las membranas se lavaron con SSC 6X por tres minutos y se calentaron a 80 ° C por dos horas.

Las membranas se prehibridaron toda la noche con una solución 1X del reactivo de Denhart's. La hibridación fue realizada con la solución de prehibridación (0.1 ml/ cm<sup>2</sup>) y utilizando como sonda el cDNA del gen tipo 1 de la  $5\alpha$ - reductasa que fue marcado con <sup>32</sup>P-dCTP por el método de Iniciadores aleatorios (Random Primer).

**Después de la hibridación, las membranas se lavaron con una solución de SSC 2X a temperatura ambiente seguida de dos lavados en condiciones de alta astringencia. Finalmente las membranas fueron expuestas en placas de radiografía  $\beta$ -max (Amersham) por 72 horas a  $-70^{\circ}$  C. Esta misma membrana se lavó y se rehibridó pero ahora con el cDNA del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ - reductasa en las mismas condiciones descritas anteriormente.**

## **6. 12 Diseño de oligonucleótidos específicos**

Oligonucleótidos específicos fueron diseñados para amplificar la secuencia completa del exón 4 para distinguir el DNA no modificado del modificado). Para esta determinación se sintetizaron tres grupos de oligonucleótidos (U, M, W). Los oligos (U) se alinean para amplificar DNA que no está metilado y que está bajo una modificación química por el MB. Los oligonucleótidos (M) amplifican DNA metilado que está bajo una modificación química (Tabla 4).

EL DNA no modificado fue amplificado con los oligonucleótidos (W) que fue utilizado como control positivo para el PCR. Las reacciones se realizaron a 40 ciclos con un paso de desnaturalización a  $95^{\circ}$  C por 5 min. Los ciclos del PCR fueron a  $95^{\circ}$  C por 30 s para la desnaturalización y  $72^{\circ}$  C para la extensión. Un ciclo final fue realizado a  $72^{\circ}$  C por 5min en todos los casos W, U, M.

25  $\mu$ l de cada reacción fueron depositados en geles de agarosa al 2 % para su posterior corrimiento por electroforesis. Los productos fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ ml). En todos los caso se detectó una sola banda. El tamaño del producto amplificado fue de 196 pb. Este experimento se llevó a cabo por triplicado.

La banda fue recortada del gel de agarosa y purificada con un kit de purificación de QIAGEN. El DNA obtenido fue resuspendido en 20  $\mu$ l de  $H_2O$ . La muestra fue secuenciada manualmente utilizando un kit de termo secuenasa marcada radioactivamente en los terminadores con  $^{33}$ P-dd-NTP. (Amersham).

4 $\mu$ l de la reacción final de secuencia fueron depositados para la electroforesis en un gel desnaturalizante de acrilamida al 6 % a 1300 V, 60 watts por 3 horas. El gel fue secado en papel filtro y expuesto a placas de autoradiografía por 24 horas a 70 °C.

**TABLA 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el exon 4 del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa .**

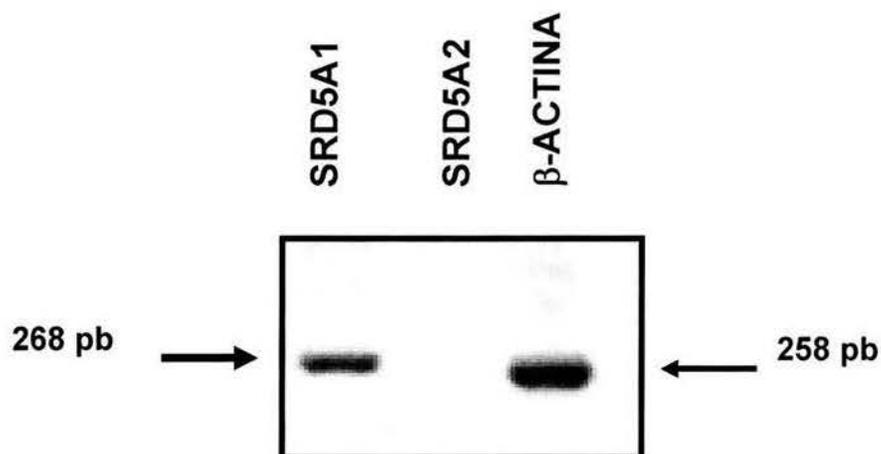
<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Tm</b>
<b>SRD5A2EX4-W S</b>	5'- ACG CAG GTG GCT TGT TTA CG - 3'	<b>196</b>	60 ° C
<b>SRD5A2EX4-W AS</b>	5'- AAG CTA CGT GAA TGC TGC CG - 3'		
<b>SRD5A2EX4-U S</b>	5'- ATG TAG GTG GTT TGT TTA TG - 3'	<b>196</b>	50 ° C
<b>SRD5A2EX4-U AS</b>	5'- AAA CTA CAT AAA TAC TAC CA - 3'		
<b>SRD5A2EX4-M S</b>	5'- ACG TAG GTG GTT TGT TTA CG - 3'	<b>196</b>	50 ° C
<b>SRD5A2EX4-M AS</b>	5'- AAA CTA CGT AAA TAC TAC CG - 3'		

## 7. Resultados

### 7. 1 Expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5- $\alpha$ reductasa en tejidos periféricos.

En todos los experimentos de expresión usando RT-PCR se observaron bandas únicas de 268 pb y de 258 pb que correspondieron a los fragmentos esperados de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa respectivamente. No se observaron bandas de amplificación en los controles negativos. En diferentes experimentos utilizando linfocitos se observó expresión del gen tipo 1 pero no del tipo 2. Fig. 6

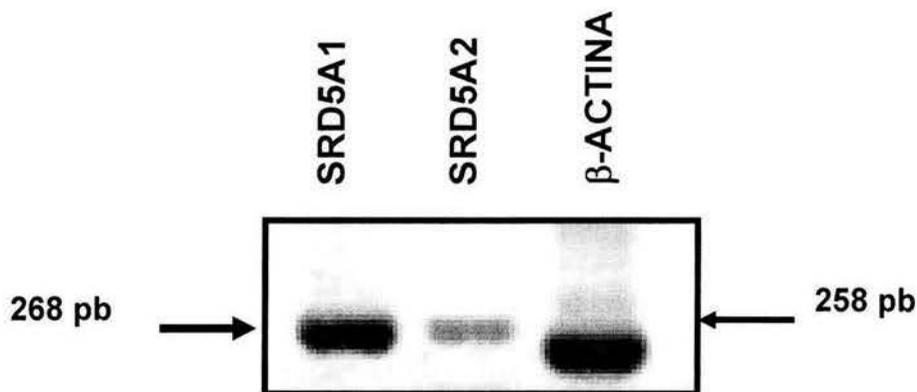
En el caso de la expresión de los genes de 5 $\alpha$ -reductasa en fibroblastos de área genital que fueron cultivados *in vitro* se observó que estos expresan ambas isoenzimas (Fig. 7). Sin embargo se puede apreciar una mayor expresión del gen tipo 1 en fibroblastos de área genital con respecto a la expresión en linfocitos.



**FIGURA 6. Expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5- $\alpha$  reductasa en linfocitos.** Se muestra un experimento representativo de RT-PCR del gen tipo 1, tipo 2 y  $\beta$ -actina realizado a partir de RNA total obtenido de linfocitos de 7 individuos. Como se puede apreciar solo se observa una banda intensa que corresponde a la expresión de la isoenzima 1, pero no a la tipo 2.

## 7. 2 Identificación de islas CpG en el promotor de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa

Utilizando el programa de computadora Meth-primer (San Francisco , CA) se identificaron las islas CpG de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Se observó que el gen tipo 1 presenta 2 islas CpG de que incluyen al exon 1 (Fig. 8), mientras que el gen tipo 2 presenta 3 islas CpG una de las cuales incluye también el exon 1. Fig. 9 Se observa un patrón de dinucleótidos CpG diferente entre las dos isoenzimas.

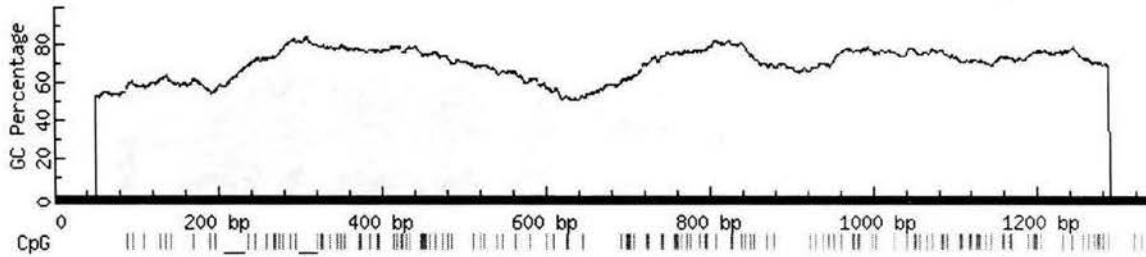


**FIGURA 7. Expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en fibroblastos de área genital.** Se muestra un experimento representativo de RT-PCR del gen tipo 1, tipo 2 y  $\beta$ -actina realizado a partir de RNA total obtenido de fibroblastos de área genital. Como se puede apreciar se observa una banda intensa que corresponde a la expresión de la isoenzima 1, y una banda menor que corresponde a la expresión del gen tipo 2. El experimento se realizó al menos en 7 individuos mostrando el mismo resultado.

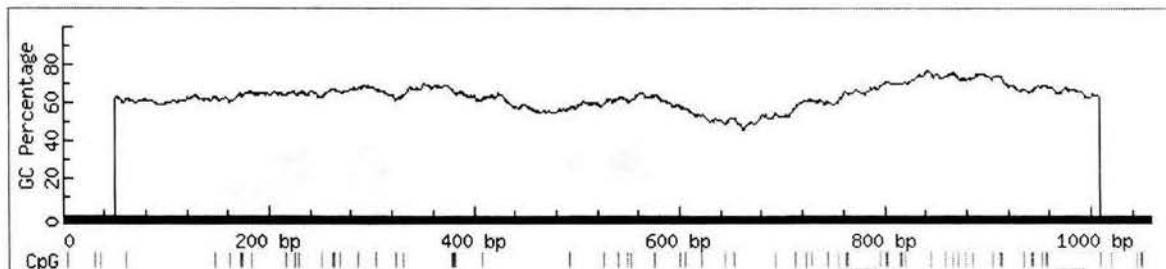
Tomando en cuenta que el gen tipo 2 ha sido considerado como el de mayor importancia por su participación en la diferenciación y mantenimiento de tejidos sexuales andrógeno regulados como la próstata y que pudiera estar regulado por metilación, se realizó el análisis del promotor.

El análisis de la región 5' del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa mostró un promotor con diferentes factores de transcripción (FT) asociados al gen (Fig. 9) Para el análisis

del patrón de metilación se consideró únicamente la región promotora mas cercana al exon 1 dado que se observaron la mayor cantidad de FT que pudieran estar asociados a la regulación del gen.



**FIGURA 8. Identificación de las islas CpG del promotor del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa.** Para identificar las posibles islas CpG del promotor del gen tipo 1 se utilizó un programa de computadora (*Methprimer*) analizando 1336 pb. Se puede observar que existen 2 islas CpG de 531 y 627 pb



**FIGURA 9. Identificación de las islas CpG del promotor del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa.** Para identificar las posibles islas CpG del promotor del gen tipo 1 se utilizó un programa de computadora (*Methprimer*), se analizó una región de 1037 pb. Se puede observar que existen 3 islas CpG de 159, 118 y 297 pb respectivamente

4741 gaagagtgaa aatgagaag gactggggtg gagcccaag tagggaccag aggagaaaac

4801 agggataaag taatcaaggg agatgggaca ggaagatgaa agaatgaggt aaacagcagg  
**VDR/ VXR**

4861 **tggaagagg aggtcaacct** aaaggagaaa gcggggtcga agaaagaagg aagagaagaa  
**IK2 CEBPB**

4921 aagaaggggtt **gggaaacaga ggaggaggca** gccaaagaaag cctggaagct gaatcataga

4981 **acggaagagg tagaagacgg aggggctgga** **GATA1** **RBPJK**  
**ggataacata aaggtgggaa acggaagaga**

5041 **gaaagaaccg cgtctgcgtg** **EGR3** **tatgacgct** agacaggagt tcagadaaca ggggggtcgc **2220-2239**

5101 **caggccacca cctgatgggc** **SMAD3** **FLI** **STAT1**  
**caaggctcat tggctctagg** agctgggaaa **gggcatccca**

5161 **ggaagaagc cctagacttt** **ATF6** **FLI**  
**agcctgagtc tgggccactc** taggggaccg **ggagtggggt**

5221 **ggcgggagag gacggcaga** **SRBP**  
**atctcgaact ctgcccac** **atcaccgag**

5281 **ctcagcggac gctctctct** **TST1** **gaccagga** **ggcagctca** **ggagcgtac** **gggagtgg**

5341 **agagaaccg ctgaggaatt** **agggccggga** gagactggta cctgcccggg gctgtggtg

5401 gggcagagct ggcaactgat ctgagagtgg ctaaggagcg gggcccaca gagcagaagg

5461 gctggcagac gctcagagag ccaggatggt tcagggtcca aggaaggtcc **tatgttgggt**

5521 **gggagctgtg** **FLI** **agggagtgaa** agtgcagtag **gaaccggagg** **agatggaaa** **accttggctt**

5581 ggggtgttca ggggtggact gctgtgtgac ggaagcaca gagggtgtgt gttgggggag

5641 aagaaccacc ccagctgaat cgtcccgtg gggttttctt cctgtgtctt agttccagaa

5701 gttgcacat cagaagctaa tagttgagga acaagtcag gaggagcag ctaagggga

5761 ggtgaatgta aagcctgga **gaggccgggc** **gaactaagaa** ggccttcggt cctctcaggc

5821 **caccgggct gcatccttga** **CPBP** **gaa** **gcccggccag** **ggtgggac**

**MAZ** **SP1**

5881 **ggcgaggtg gaggcagat** **ggagggcgg** **gagccaagc** **ggagggggc** **gacaggggtg**

5941 **gctctggc** **MTATA** **CMYB** **MAZ**  
**ctccataaag cggttgcgg** **ggcccgcct** **tcttctggga** **gggcagcgc**

6001 **caccgggag gaacacggc** **cgatgcaggt** **tcagtccag** **cagagcccag** **tctgtgcagg**

6061 **cagcgcact ttggtgcgcc** **ttggggcact** **ggccttgta** **gtcaggaagc** **cctcaggcta**

6121 **cggaagcac acgagagcc** **tgaagccgc** **ggctaccgc** **ctgcagccc** **ggcgcctg**

6181 **gttctgcag gagctgctt** **ccttcgggt** **gcccgggg** **atctcgc** **ggcagccc**

6241 **tctcctctt cgggccact** **gggacgtac** **ttctggcct** **ctctgcta** **cattacttc**

6301 **acagggagc** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc**

636 **cagggcga** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc** **ggggagc**

**Isla CpG**  
**2616-2458**

**Isla CpG**  
**2792-3410**

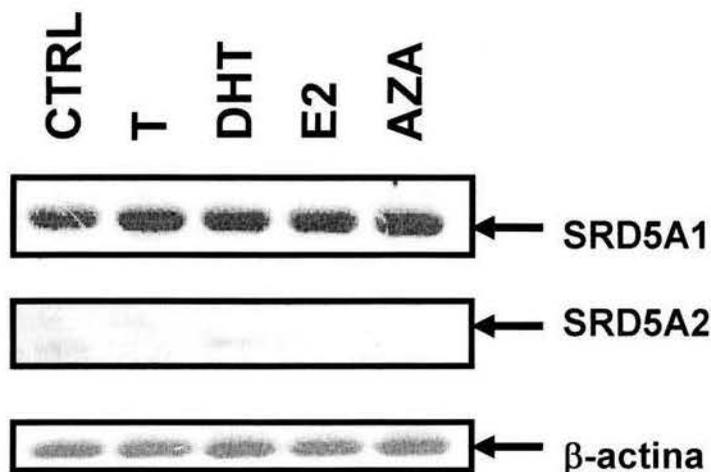
**Exon1**

**FIGURA 10. Análisis de la región del promotor del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Utilizando el programa de computadora McVector (Inglaterra, Cambridge) se analizó la secuencia del promotor del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa, para tratar de identificar los posibles factores de transcripción asociados a este promotor.**

### 7. 3 Expresión de los genes de 5 $\alpha$ -reductasa en los fibroblastos tratados con diferentes hormonas esteroides y con un agente desmetilante.

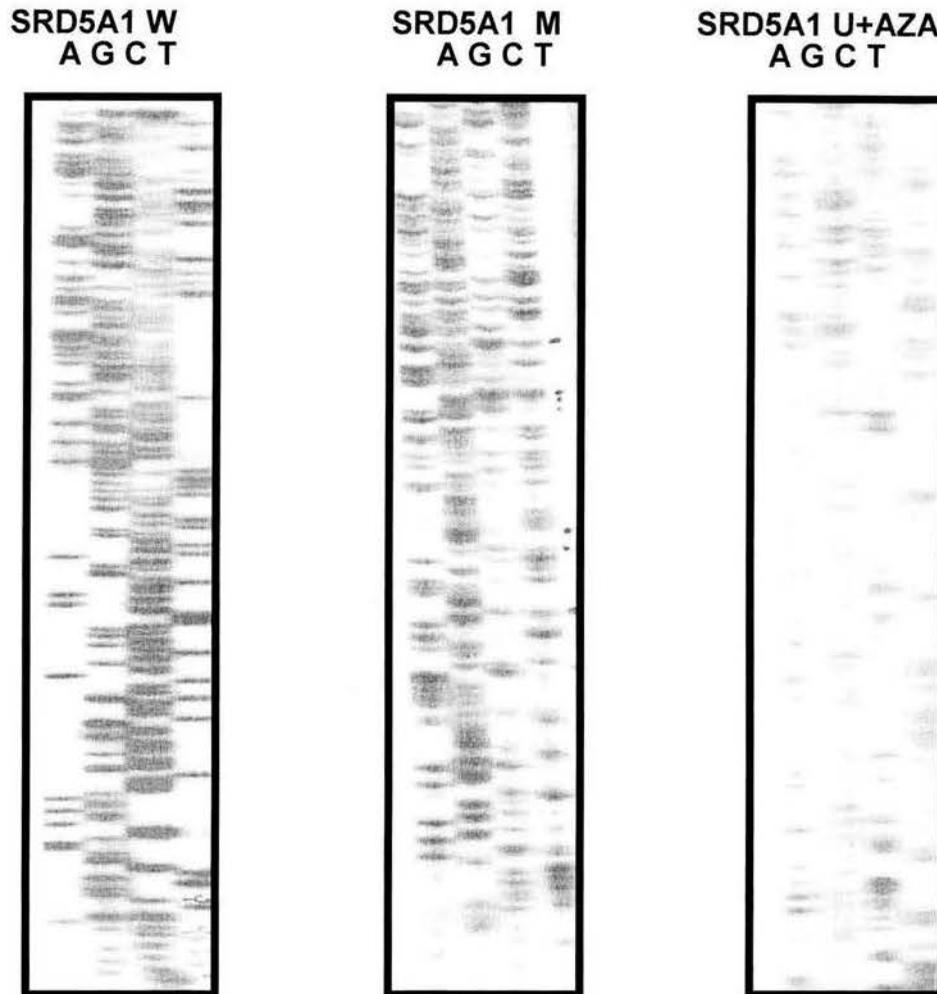
Se cultivaron los fibroblastos de área genital con diferentes hormonas para evaluar si estas tenían un efecto sobre la expresión de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa y sobre el patrón de metilación. Después del tratamiento se observó que estos no afectaban la expresión del gen tipo 1. Fig. 11

En el caso del gen tipo 2 y después del tratamiento con DHT en fibroblastos cultivados en suero libre de hormonas y sin rojo fenol solo se observó una banda. No se observó expresión del gen después del tratamiento con el agente desmetilante azacitidina (fig. 11).

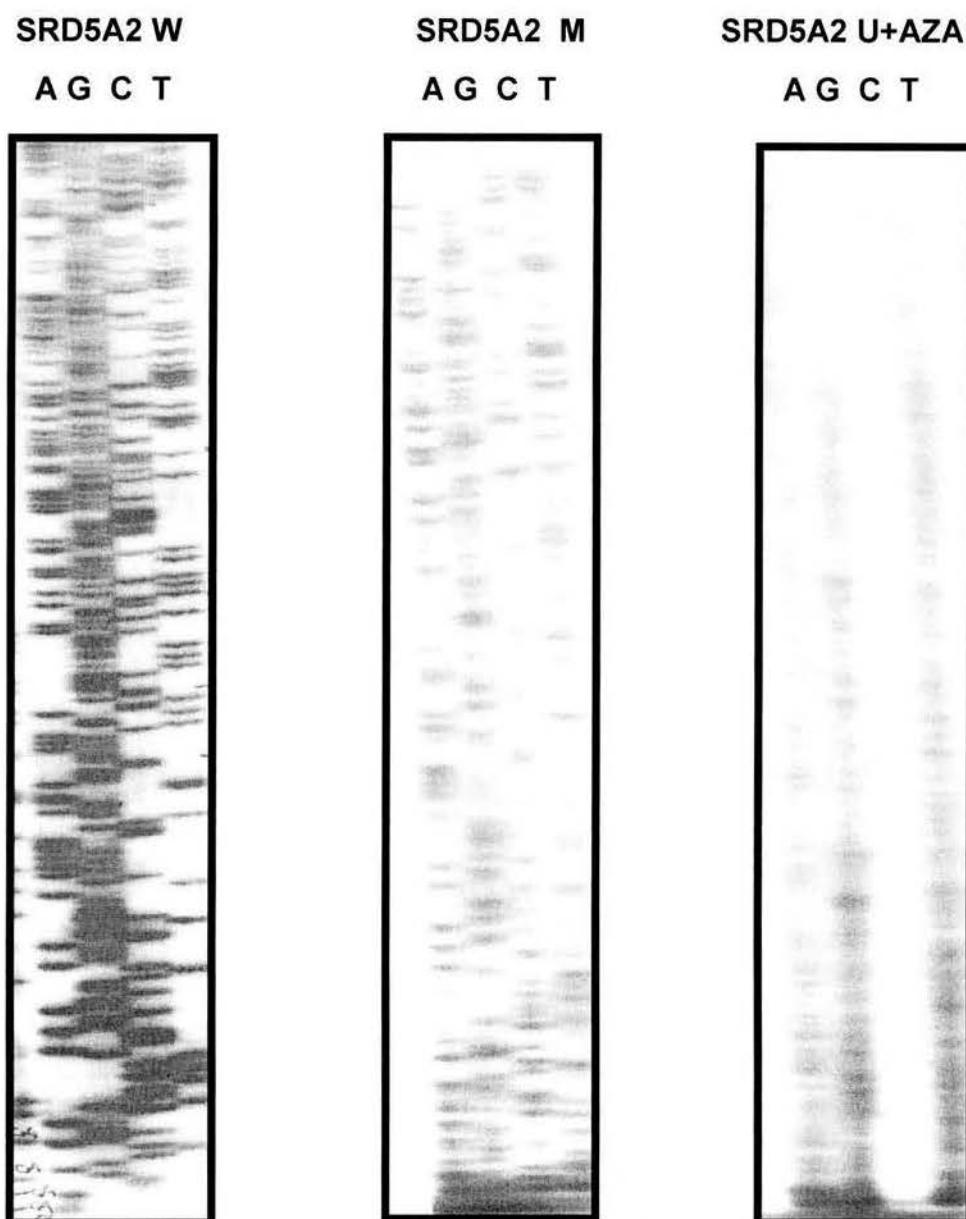


**FIGURA 11. Expresión del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa después del tratamiento con Hormonas Esteroides y 5-aza-2-deoxi-citidina.** Se muestra un experimento representativo de RT-PCR del gen tipo 1, tipo 2 y  $\beta$ -actina realizado a partir de RNA total obtenido de fibroblastos de área genital cultivados con diferentes tratamientos hormonales. Se observa una expresión constitutiva del gen tipo 1 con todos los tratamientos. En el gen tipo 2 solo se observa expresión del gen después del tratamiento con DHT. No se observó expresión del gen después del tratamiento con el agente desmetilante (azacitidina).

Después del tratamiento con bisulfito de sodio se secuenció el DNA tratado para el gen tipo 1 y se observó que una gran parte de citosinas se encuentran metiladas. Al tratar el DNA con azacitidina se observó una conversión a timinas de las citosinas no metiladas mostrando que sí existe desmetilación de esta región del gen (Fig. 12).



**FIGURA 12. Patrón de metilación del promotor del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa.** Se muestra la secuencia de DNA del gen tipo 1 de fibroblastos de área genital de individuos normales (W). El DNA W, fue tratado con bisulfito de sodio las citosinas no metiladas son reconocidas por la polimerasa como timinas. Se pueden observar diferentes citosinas metiladas que no se afectan después del tratamiento (M). Cultivos en paralelo fueron tratados con (100nM) de un agente desmetilante para demostrar el efecto del fármaco sobre el patrón de metilación, lo cual se observa en el panel (U+AZA).



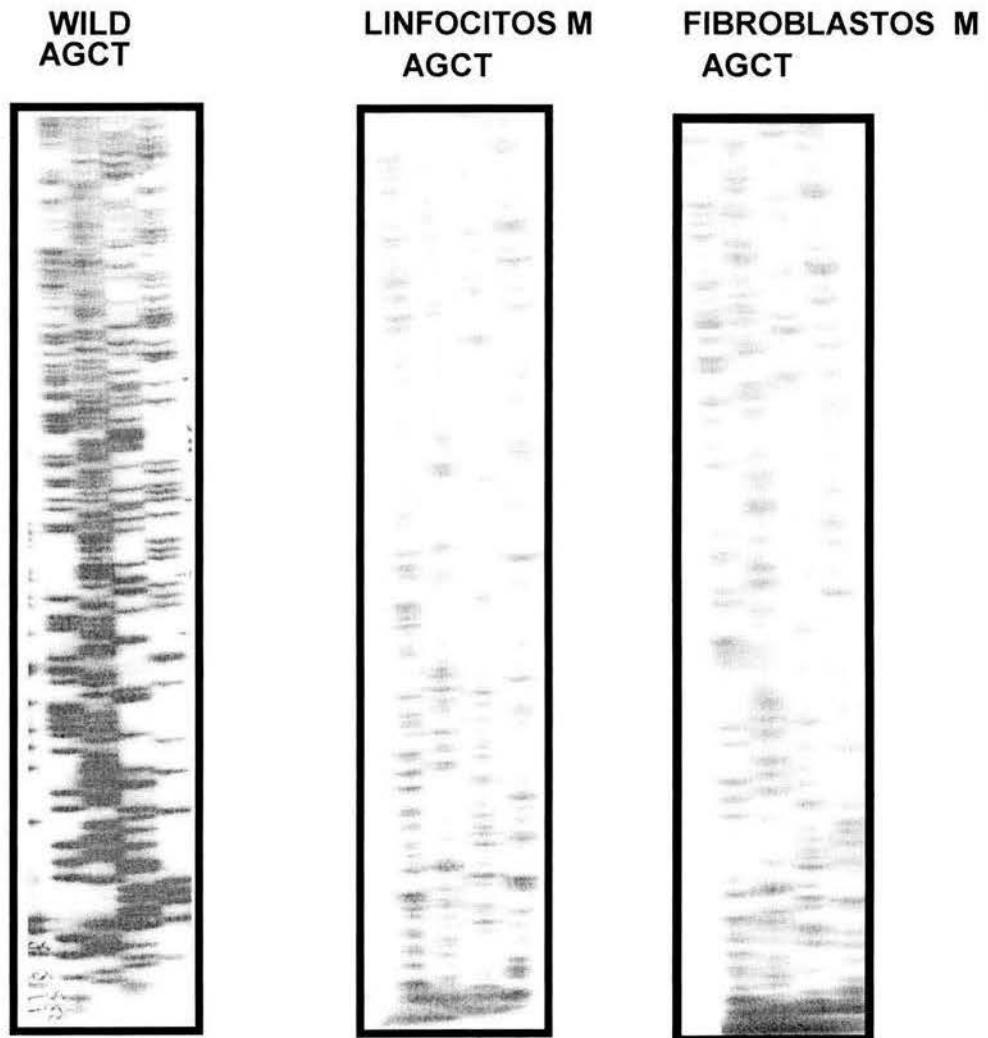
**FIGURA 13. Patrón de metilación del promotor del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa.** Se muestra la secuencia de DNA del gen tipo 2 de fibroblastos de área genital de individuos normales (W). El DNA W, fue tratado con bisulfito de sodio, las citosinas no metiladas son reconocidas por la polimerasa como timinas. Se pueden observar diferentes citosinas metiladas que no se afectan después del tratamiento (M). Cultivos en paralelo fueron tratados con (100nM) de un agente desmetilante para demostrar el efecto del fármaco sobre el patrón de metilación, lo cual se observa en el panel (U+AZA).

Al secuenciar el DNA para el gen el tipo 2 tratado en las condiciones anteriores se observó una gran cantidad de citosinas metiladas. Al tratar el DNA con azacitidina se puede observar en la secuencia el efecto de la desmetilación del DNA (Fig. 13)

#### 7. 4 Patrón de metilación tejido específico en linfocitos y fibroblastos.

Al comparar los patrones de metilación del gen tipo 2 entre linfocitos y fibroblastos se pudo observar que el patrón de metilación es diferente entre los dos tipos celulares.

Fig. 14



**FIGURA 14. PATRON DE METILACION DE LINFOCITOS Y FIBROBLASTOS DEL GEN TIPO 2 DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA.** Se muestra la secuencia del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en sujetos control (W). Después del tratamiento con bisulfito de sodio se observa un patrón de metilación específico del gen en cada tejido (linfocitos M vs fibroblastos M).

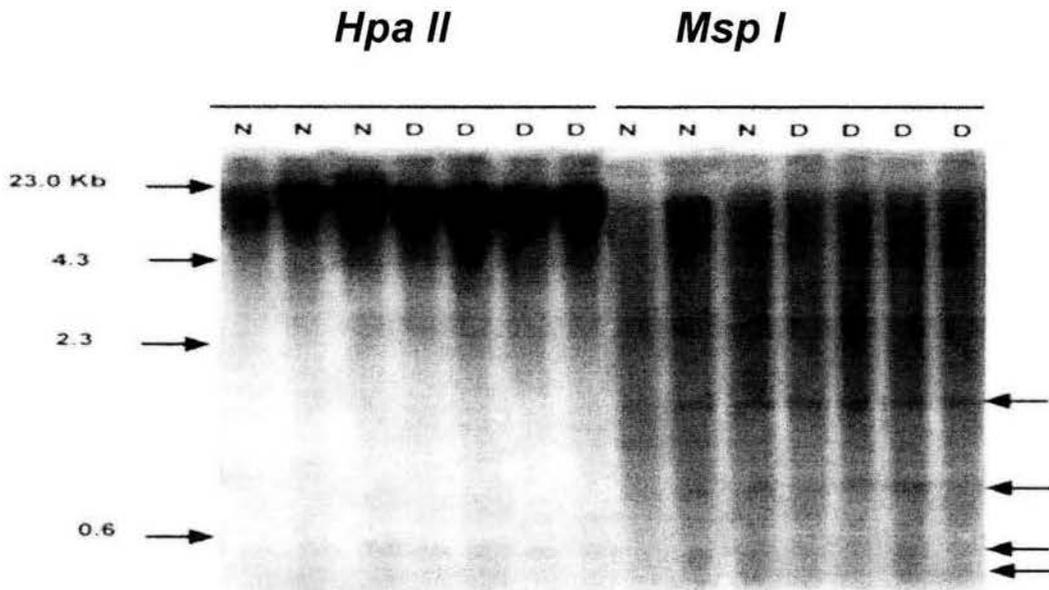
## 7. 5 Estudio de los patrones de metilación de los genes de 5 $\alpha$ reductasa en pacientes con deficiencia primaria de la enzima.

### 7. 5. 1 Southern Blot utilizando enzimas sensibles a metilación

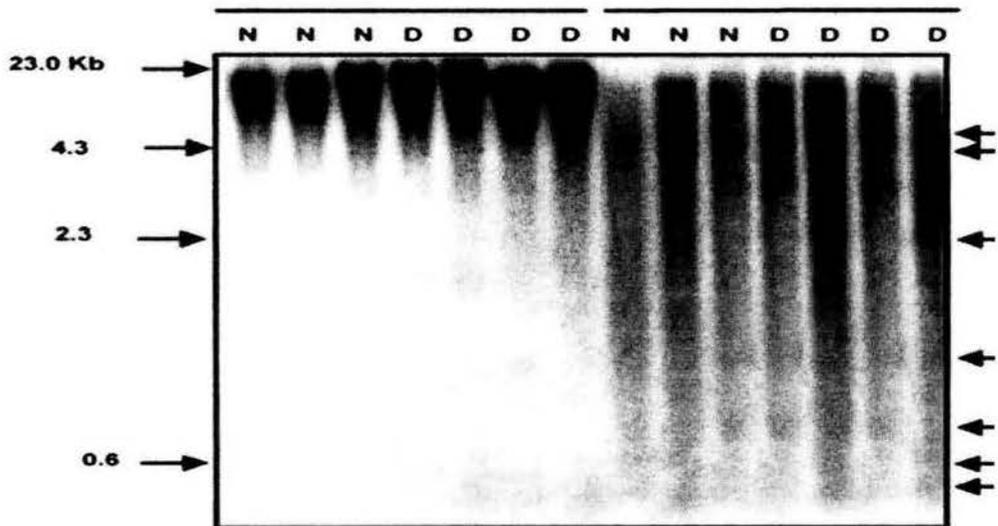
El resultado del experimento de la transferencia tipo Southern blot hibridado con el cDNA del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa mostró diferencias en el patrón de migración entre los dos iso-esquisomeros usados *Hpa II* y *Msp I*, los cuales reconocen la secuencia CCGG, sin embargo no se observaron cambios entre los sujetos normales (N) y deficientes de la enzima (D). Fig. 15

Las mismas membranas cuando fueron hibridadas con el gen tipo 2, mostraron cambios en el patrón de migración de las bandas entre *Hpa II* y *Msp I* pero no entre los sujetos normales y deficientes de la enzima. (Fig. 16). Se observa que los patrones de metilación entre el gen tipo 1 y tipo 2 son diferentes.

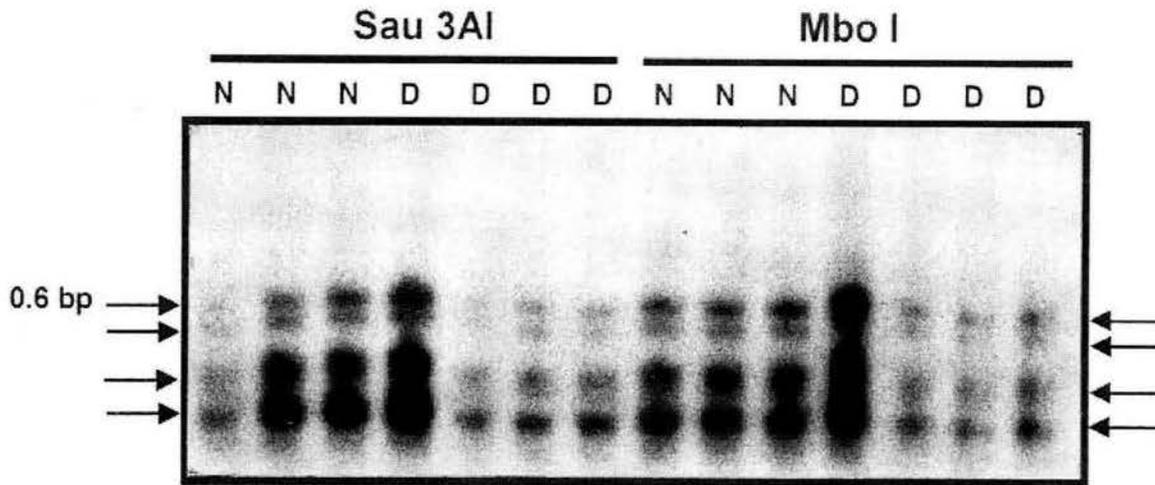
Para explorar mas sitios posibles de metilación, se utilizo otro set de enzimas de restricción, *Sau 3A1* y su isoesquizomero *Mbo I* que reconocen sitios GATC en dónde *MboI* solo corta al DNA cuando está metilado. Los RFLP usando estas enzimas no mostraron diferencias cuando se analizó el gen tipo 1 (Fig. 17), sin embargo cuando se analizó el gen tipo 2, pudimos observar una región del gen que seguramente esta metilada por lo que se aprecian cambios en el patrón de restricción en los DNAs digeridos con *MboI* vs los digeridos con *Sau3A1* (Fig. 18).



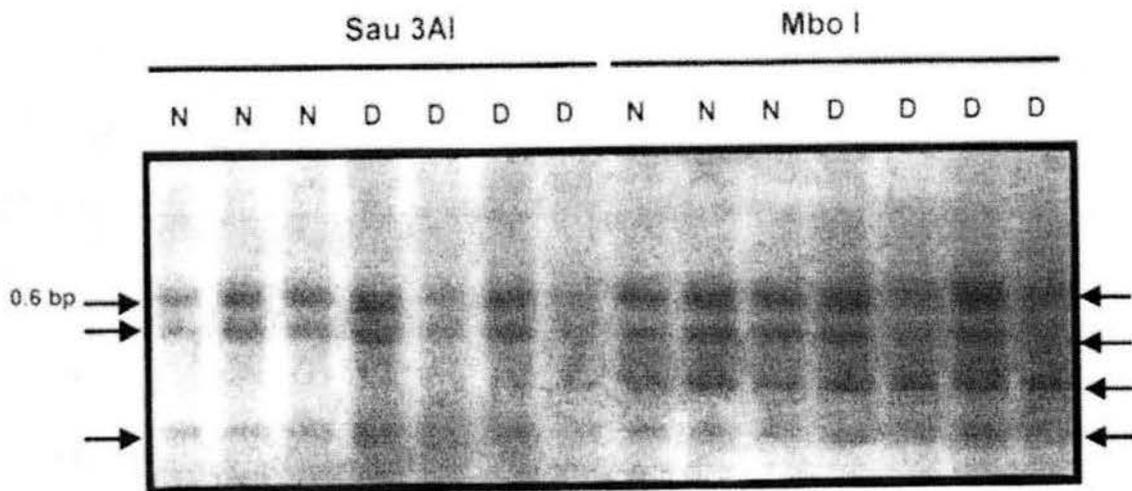
**FIGURA 15. Patrón de metilación del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa en secuencias CCGG.** El DNA genómico de 3 sujetos normales (N) y 4 con deficiencia primaria de la enzima (D), fue digerido con *HpaII* y *MspI*. La separación de los productos de digestión se realizó en un gel de agarosa al 1%. El Southern blot se realizó utilizando como sonda el cDNA del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Se observan fragmentos por debajo de 4.3 Kb en el DNA digerido con *Msp I* pero no con el iso esquisomero *HpaII*, indicando metilación del DNA (Flechas a la derecha).



**FIGURA 16.- Patrón de metilación del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en secuencias CCGG.** La membrana de la figura 7, fueron lavadas en condiciones de alta severidad y rehibridada utilizando como sonda el cDNA del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Se observan fragmentos por debajo de 4.3 Kb en el DNA digerido con *Msp I* pero no con el iso esquizomero *HpaII*, indicando metilación del DNA (Flechas a la derecha).



**FIGURA 17. Patrón de metilación del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa en secuencias GATC.** DNA genómico de sujetos normales (N) y con deficiencia primaria de 5 $\alpha$ -reductasa (D) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sau 3A* y *Mbo I* los productos se separaron en un gel de agarosa al 1%. La transferencia tipo southern blot se realizó como se describe anteriormente y la hibridación se realizó con el cDNA del gen tipo 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Se observan bandas de bajo peso molecular 0.6 y sin cambios en el patrón de migración entre la enzima sensible (*Sau3A I*) y no sensible a metilación (*Mbo*), el resultado es representativo de dos de los experimentos realizados con 14 muestras de individuos diferentes.



**FIGURA 18. Patrón de metilación del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en secuencias GATC.** Las membranas de la figura 9 fueron lavadas y rehibridadas con el cDNA del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Se observa un patrón de restricción diferente en la migración de las bandas del DNA digerido con *Sau 3AI* y el digerido con *MboI* que solo corta en el sitio GATC si la citosina está metilada.

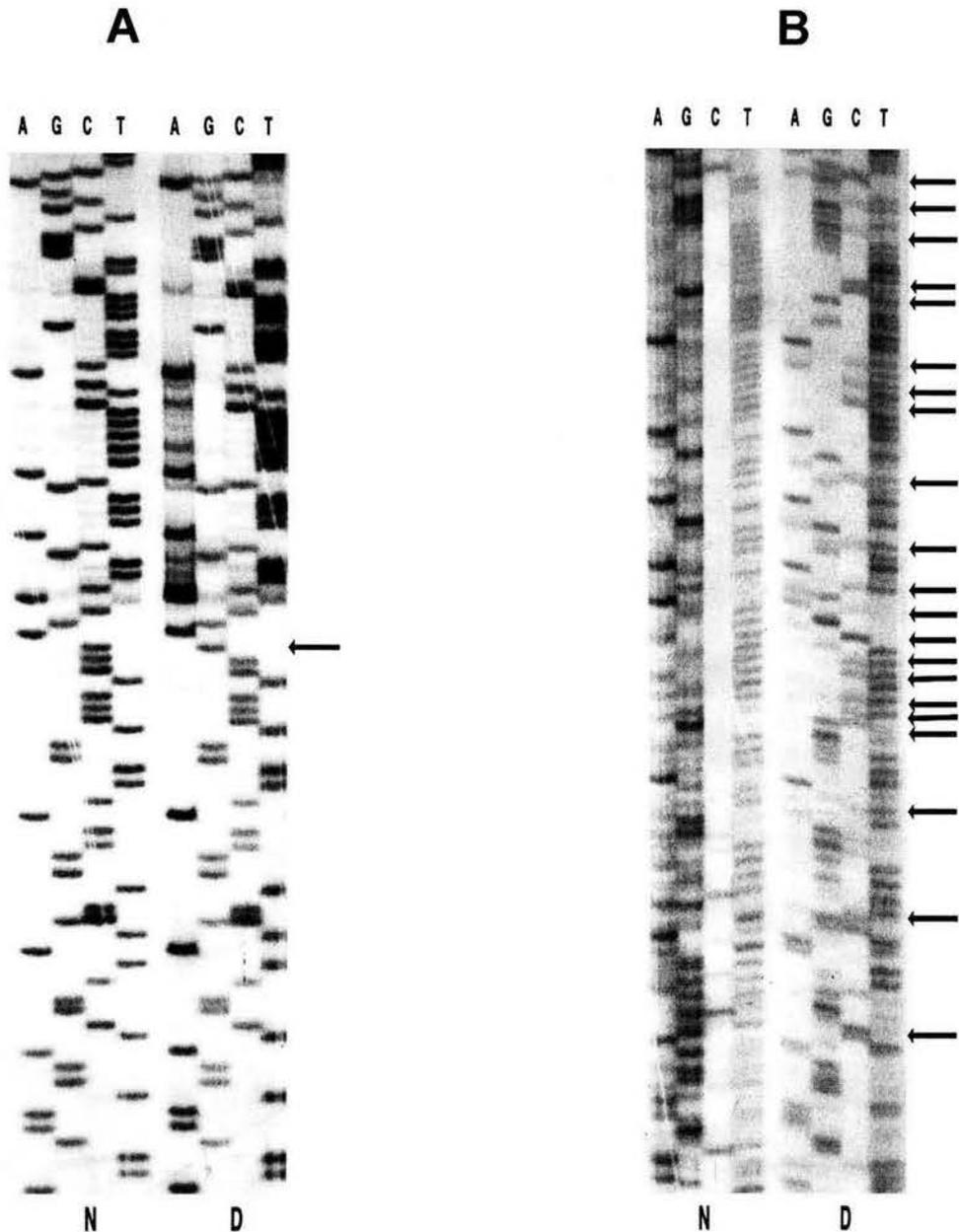
## **7. 6 Detección de mutaciones en el exón 4 de pacientes con deficiencia primaria de la enzima**

Para ampliar el estudio se hizo la detección de los sitios de mutaciones en las muestras utilizadas ya que se ha descrito que en las secuencias del exón 4 del gen tipo 2 existe un número de mutaciones relativamente alto en población mexicana. El estudio incluyó individuos normales (N) y con deficiencia primaria de la enzima (D).

El análisis de la secuencia mostró una mutación en el codon 212 que es responsable de una sustitución prolina por arginina (CGA por CCA) en el exon 4. Fig. 19 A

Conociendo que existe una asociación entre el aumento de la metilación en islas CpG y la aparición de mutaciones observado en otros modelos experimentales. Se trató de correlacionar las mutaciones obeservadas en nuestras muestras y el patrón de metilación del gen tipo dos de la 5 $\alpha$ -reductasa.

El análisis de metilación (MSP), específico para el exon 4 mostró un aumento en el número de citosinas metiladas en el DNA de los sujetos que tienen la mutación con respecto a los individuos normales (Fig. 19 B).



**Figura 19. Detección de las mutaciones y el estado de metilación del exon 4 del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa.** **A)** Se muestra una secuencia representativa del exón 4 del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa de un sujeto normal (N) y un individuo deficiente de la enzima (D) con una mutación en el codón 212 responsable de una sustitución de prolina por arginina (CCA por CGA). La mutación se indica con la flecha. **B.** Se observa el estado de metilación del exón 4 del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa después del tratamiento con bisulfito de sodio entre un individuo normal (N) y un paciente con una mutación en el codon 212 (D). Las flechas indican las diferencias en el patrón de metilación.

## **8. Discusión.**

### **8. 1. Expresión diferencial de 5- $\alpha$ reductasa en tejidos periféricos.**

En este trabajo se determinó la expresión de los genes que codifican para el gen tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en linfocitos y en fibroblastos de área génital. Diversos estudios acerca del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa han demostrado que estos genes están bajo el control de los andrógenos y que se expresan de manera diferencial dependiendo del tejido (Andersson et al 1989, Thigpen et al. 1993, Torres y Ortega 2003, Pratis et al 2003 ), sin embargo los mecanismos precisos por los cuales se regula la expresión de estos genes aun no han sido bien establecidos.

### **8. 2. Diferenciación sexual.**

La diferenciación sexual es uno de los procesos mas importantes en la vida de los mamíferos. La determinación del sexo es básica para la supervivencia de la especie y que consiste en conjunto en una serie de eventos organizados en espacio y tiempo que darán lugar a las características fenotípicas sexuales. Es en este proceso en donde intervienen una gran cantidad de eventos moleculares que dirigen la síntesis enzimática que a su vez dará lugar al producto final en este caso la hormona. En el macho las dos hormonas mas importante son la Testosterona y la dihidrotestosterona. La conversión de tesosterona a dihidrotestosterona se lleva a acabo por la acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (Andersson et al 1989, Thigpen et al. 1993, Torres y Ortega 2003, Pratis et al 2003

La expresión del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 se ha observado en tejidos no dependientes de andrógenos como el hígado (Reyes et al 1997, Andersson et al 1989, Thigphen et al 1993). Se ha descrito que existe la expresión del gen en líneas celulares de linfocitos T y B. En este modelo se ha observado que la expresión del gen tipo 1 se incrementa después del tratamiento con Dihidrotestosterona (DHT), pero no con Testosterona. Diferentes líneas de investigación apoyan la idea de que en el

sistema inmune también hay producción de esteroides, por ejemplo el epitelio del timo y el bazo ( Zhou y Speicer, 1999 )

También los macrófagos alveolares pueden convertir al precursor de los andrógenos androstendiona en una gran variedad de esteroides androgénicos, indicando actividades como la de la  $5\alpha$ -reductasa.  $17\beta$ -Hidroxi esteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) en estas células. En linfocitos se cree que la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 es regulada por hormonas esteroides y al parecer participa en actividades relacionadas con el sistema inmune, sin embargo aún no se conoce cual es su principal función en este tejido (Zhou y Speicer 1999).

La expresión del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa se ha observado en tejidos dependientes de hormonas como la próstata, epidídimo y algunos autores han reportado su expresión en fibroblastos de área genital (Thigphen et al 1993). Recientemente Russell y cols. demostraron la expresión de ambas isoenzimas en diferentes regiones del pene en etapas tempranas del desarrollo (Kim et al 2002).

En este estudio se escogieron dos tipos celulares de humano blancos sensibles a andrógenos que fueron obtenidos de sujetos control y de pacientes con deficiencia primaria de la enzima. Se utilizaron para el estudio fibroblastos obtenidos de área genital de individuos después de circuncisión y sangre total para la separación de linfocitos.

Se demostró que los 2 genes que codifican para las isoenzimas de la  $5\alpha$ -reductasa se expresan en fibroblastos de área genital y en linfocitos periféricos solo existe expresión del tipo 1 (figs 6 y 7). En linfocitos se puede observar una banda intensa que corresponde a la expresión de la isoenzima 1, pero no a la de la dos (fig 6). Situación que se observó al menos en 7 individuos (datos no mostrados). En el caso de la expresión en fibroblastos de área genital que fueron cultivados *in vitro* observamos que estos expresaban ambas isoformas (fig 7).

Hasta la fecha no se conocen los mecanismos por los cuales pudieran estarse regulando estas enzimas, ya que por un lado se ha sugerido la regulación a la alta por DHT (Nirdé et al 1998), mientras que otros autores postulan que aún en presencia de T y DHT los niveles de expresión de la enzima tipo 2 permanecen sin cambio (Hellwinkel et al 2000). Aún mas, no se ha establecido por que en algunos hombres mayores de 40 años los niveles de expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 se encuentran aumentados con una creciente actividad de la enzima en tejidos como la próstata, ocasionando hiperplasia prostática benigna (BPH) (Carson III y Rittmaster 2003). En este sentido la isoenzima tipo 2 es de vital importancia para el mantenimiento de diferentes tejidos dependientes de andrógenos.

Para determinar si las hormonas esteroides podrían tener influencia sobre la transcripción del gen tipo 2 según los datos reportados en la literatura (Nirdé et al 1999, Hellwinkel et al 2000) se trataron los fibroblastos con diferentes hormonas T, DHT y  $E_2$ . Los resultados después de los diferentes tratamientos con hormonas esteroides mostraron que únicamente después del tratamiento con DHT se induce la expresión del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa lo cual podría sugerir una regulación por DHT para este gen (fig 11).

En los últimos años se ha hablado mucho de las diferentes formas en que se puede estar regulando la expresión de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa. Existen varios mecanismos en la célula capaces de aumentar o disminuir la expresión de genes. Desde proteínas que se unen al DNA modificando su conformación y con ello dejan expuestos sitios para que ciertas proteínas puedan unirse su secuencia consenso y promuevan la transcripción, hasta mecanismos que son capaces de inducir un cambio en la estructura de la cromatina sin cambio en la secuencia de nucleótidos llamados mecanismos epigenéticos (Jones y Wolffe 1999).

Considerando que la expresión del gen tipo 2 es diferente en linfocitos con respecto a los fibroblastos y que los mecanismos acerca de su regulación no han sido bien establecidos, se decidió explorar si otro tipo de mecanismos como los

epigenéticos podrían estar involucrados en la regulación de estos genes, específicamente la metilación del DNA (Jones y Wolffe 1999).

Una de las funciones más importantes de la metilación, que afecta regiones específicas de los promotores de los genes, es la regulación de la expresión genética. (Tate y Bird 1993, Iguchi-ariga y Schaffner 1989, Wade 2001). Utilizando el programa *Methprimer* (Li y Dahiya 2002) se realizó el análisis de las regiones promotoras para ambos genes de la  $5\alpha$ -reductasa. Un análisis de la región del promotor y el exon 1 para el gen tipo 1 mostró la existencia de 2 islas CpG en esta zona. El análisis del gen tipo 2 mostró que existen tres islas CpG, dos islas pequeñas y una isla de mayor tamaño, lo cual sugiere que estos promotores podrían estar bajo el control de la metilación. Figs. 8 y 9

Se estudió el estado de metilación de los promotores de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 para tratar de correlacionar si la expresión de estos genes en diferentes tejidos está regulada por la metilación. Se demostró que en linfocitos solo se expresa el RNAm para el gen tipo 1 mientras que en cultivos de fibroblastos de área genital cuando se cultivan en presencia de esteroides en el medio se expresan las dos isoenzimas, predominando el gen tipo 1 sobre el gen tipo 2. Sin embargo al eliminar los esteroides del medio de cultivo y tras un cultivo de 96 hrs. La expresión del gen tipo 2 se pierde en los fibroblastos lo cual confirma la acción de factores hormonales.

Para observar si se reestablece la expresión del mensajero del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa. De acuerdo a lo reportado en la literatura, se eliminaron las hormonas esteroides del medio de cultivo y se trataron los fibroblastos con un agente desmetilante (5-aza-dC) que se incorpora como un análogo de la citosina y ocupa la posición 5' por lo que no puede ser metilada por la DNA metiltransferasa de mantenimiento durante la replicación del DNA, llevando a una desmetilación del DNA.

Los fibroblastos fueron tratados con 100 nm del fármaco en dos experimentos diferentes. Al tratar los fibroblastos con 5-aza-dC no se restauró la expresión del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa y no se observó un efecto sobre el gen tipo 1 (fig 11). Lo cuál indica que aun existiendo sitios CpG metilados estos no están actuando como un mecanismo de regulación transcripcional para el gen tipo 2.

### **8. 3. Patrón de metilación de la región promotora de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa**

En este trabajo se estudió el estado de metilación de los promotores de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea en linfocitos y en fibroblastos obtenidos de prepucio.

Los resultados demostraron que existe metilación de los promotores de los genes tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en fibroblastos de área genital. Después del tratamiento con el agente demetilante 5-aza-dC se observó una desmetilación parcial en ambos genes lo cuál indica un efecto directo del fármaco sobre la tasa de metilación. Por otro lado se observa un patrón de metilación diferencial tejido específico entre linfocitos y fibroblastos de área genital del gen tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa (figs 12 y 13).

Se ha descrito que los patrones de metilación se establecen en las primeras etapas del desarrollo. Los patrones de metilación en células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano (Bird 2002). Durante el desarrollo embrionario la metilación del DNA adquiere patrones específicos y se establece el patrón de metilación de las células somáticas (Paulsen y Ferguson-Smith 2001).

Diferentes líneas de investigación sugieren que los patrones de metilación son vitales para el desarrollo normal de los vertebrados (Li et al 1992, Okano et al 1999).

La observación de que exista una metilación diferencial en el promotor de dos tejidos diferentes sugiere que la metilación de este gen es tejido específica, sin embargo su papel en el metabolismo de los andrógenos en diferentes tejidos requiere una investigación más exhaustiva.

#### **8. 4 Patrón de metilación en regiones intragénicas de la 5 $\alpha$ -reductasa.**

En esta parte del proyecto se determinó el patrón de metilación de ambos genes. El patrón de metilación de los genes de 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea fue investigado inicialmente por la técnica de RFLP, usando enzimas de restricción sensibles a metilación en este estudio se utilizaron *HpaII* y *MspI*. Estas dos enzimas reconocen el mismo sitio de restricción que son secuencias CCGG y no cortan el DNA cuando éste está metilado y por lo tanto reconoce un patrón diferencial de metilación. Cuando *MspI* no corta el DNA significa que éste está metilado en residuos 5' C, es decir la citosina externa de la secuencia CCGG, pero esta enzima si corta dicha secuencia cuando el residuo de citosina está metilado en 3'C. En cambio la enzima *HpaII* no corta el DNA cuando la secuencia CCGG está metilada en el residuo 3' C interno. Con esta metodología pudimos observar que tanto el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 como el 2 tienen un patrón de metilación que se observa después del corte con *MspI* donde podemos percibir la aparición de bandas mayores de 4kb y algunas de menor peso molecular. Las cuales se observan en las digestiones con *MspI* y no con *HpaII*. Aunque no hubo diferencias en los patrones de metilación cuando se compararon individuos sanos e individuos con deficiencia primaria de la enzima. Los resultados muestran un patrón diferencial para ambos genes.

Para excluir la posibilidad de que no se observaran diferencias entre las dos isoenzimas pudiera ser debido a una digestión incompleta, y poder excluir que no hubiera diferencias entre sujetos normales y aquellos deficientes de la enzima, se diseñó un experimento predigiriendo el DNA con *EcoRI* una enzima que corta con mas frecuencia el DNA y no digiere los sitios de metilación. Con este solo se observó

un pequeño desplazamiento en la migración de las bandas pero el patrón fue el mismo.

Para confirmar el estado de metilación de los genes de la  $5\alpha$ -reductasa se utilizó otro par de enzimas para explorar más sitios posibles de metilación entre sujetos normales y en sujetos con deficiencia primaria de la enzima. La endonucleasa *Sau 3AI* y su isoesquisomero *Mbol* reconocen y cortan sitios 5' GATC 3', pero *Sau 3AI* solo no corta cuando el DNA está metilado en citosinas. El resultado de este experimento no mostró cambios en el patrón de restricción con ambas enzimas entre sujetos normales y aquellos con deficiencia de la enzima. Sin embargo se puede observar un patrón de restricción diferente entre el DNA digerido con *Sau3AI* y *Mbol* en el gen tipo 2. Esto indica que existen sitios de metilación en las citosinas de las secuencias GATC.

#### **8. 5. Patrón de metilación y mutaciones en el exón 4 del gen tipo 2 de la $5\alpha$ -reductasa.**

Después de observar cambios en el patrón de metilación en el gen de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2. Se exploró el exón 4 de sujetos normales y aquellos que presentaron mutaciones en este exón ya que en este se han observado la mayor cantidad de mutaciones en población mexicana (Canto et. al. 1997).

Un amplio espectro de mutaciones clínicas y bioquímicas han sido reportadas, e identificadas en pacientes con deficiencia de  $5\alpha$ -reductasa y solo una deleción completa en el gen ha sido descrita. En todos los otros casos mutaciones puntuales han sido identificadas a lo largo de los 5 exones que constituyen el gen y son responsables de las sustituciones de aminoácidos. (Andersson et. Al. 1991).

Diferentes observaciones han demostrado que existe una correlación entre la metilación de exones y la aparición de mutaciones. Aunque la metilación de citosinas es esencial para el desarrollo normal de los vertebrados, una gran cantidad de

mutaciones en línea germinal ocurren en dinucleótidos CpG, probablemente de manera secundaria a la desaminación de la citosina, donde está es convertida a timina ( Holliday y Grigg 1993, Momparler y Bovenzi 2000). El dinucleótido CpG contribuye a la generación de una gran cantidad de mutaciones en genes supresores de tumores (Duncan y Miller 1980, Magewu y Jones 1994,). En una gran cantidad de mutaciones que ocasionan enfermedades genéticas mas del 37 % fueron en dinucleótidos CpG (Cooper y Krawczak 1989, Gianelli et al 1990, Green et al 1990).

La mayor parte de las mutaciones relacionadas con metilación en regiones intragénicas se caracterizan por ser una transición de C por T. Son muchos los estudios que se han hecho con respecto a la transición de C por T durante los procesos cancerosos y existen evidencias de que la metilación del DNA podría estar involucrada en la aparición de mutaciones en diversos genes (Duncan y Miller 1980, Holliday y Grigg 1993, Magewu y Jones 1994, Momparler y Bovenzi 2000) Por otro lado Muchas de las mutaciones descritas pueden aparecer como transiciones C/G a T/A y transversiones C/G a T/A s. Alrededor del 20 % de las mutaciones ocurren en una A/T, (Hoque et. al. ,2005) .

Para esta parte del estudio se utilizó un método directo de análisis para conocer el estado de metilación del DNA basado en la técnica de metabisulfito de Sodio, que consiste en transformar citosinas no metiladas del DNA por metabisulfito, produciendo citosinas desaminadas en el caso de que estas no estén metiladas, las cuales serán reconocidas como timinas en las reacciones de PCR.

Los productos de PCR fueron clonados y secuenciados. En el patrón de metilación del exon 4 del gen tipo 2 se puede observar que en sujetos normales el patrón de restricción es diferente al observado en pacientes con deficiencia de la enzima. Se puede observar la transformación de citosinas a timinas en los sujetos normales, y no así en los sujetos con deficiencia primaria de la enzima.

Sin embargo nuestros resultados demuestran una mutación cambiando una transversion de una C por una G en sitios que presentan una alta frecuencia de CpG's metiladas. Las transversiones de C/G ya han sido reportadas sin embargo la asociación entre una transversión y el grado de metilación ha sido poco estudiado. Una observación interesante es que la citosina que se encuentra metilada se localiza en un sitio Hot Spot de mutación en el exon 4 lo que sugiere que una metilación reiterativa del sitio puede contribuir a la aparición de dicha mutación .

Tal vez la metilación del DNA capaz de inducir cambios en la estructura de la cromatina actuando en conjunto con la maquinaria enzimática, que a su vez pudiera estar influenciado diferentes tipos de mutaciones como el caso de una C por una G como lo observado en pacientes con deficiencia primaria de  $5\alpha$ - reductasa.

## 9. CONCLUSIONES

- 1.- Los genes tipo 1 y tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa se expresan en fibroblastos de área genital pero solo el tipo 1 en linfocitos periféricos.
- 2.- El gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa se regula por DHT en fibroblastos de área genital en cultivo.
- 3.- La expresión del gen tipo 2 no se restaura después del tratamiento con un agente desmetilante.
- 4.- Los genes de la  $5\alpha$ -reductasa se encuentran metilados en citosinas en sujetos normales.
- 5.- Existe un patrón diferencial de metilación en el gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa entre linfocitos periféricos y fibroblastos de área genital.
- 6.- En sujetos deficientes de la enzima existe una mayor metilación del gen tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa comparado con sujetos normales.

## 10. Perspectivas.

De este trabajo se derivan los estudios subsecuentes en cáncer de próstata. Dado que la próstata es el órgano blanco más importante en el metabolismo de andrógenos. El cáncer de próstata es una enfermedad que es considerada como la segunda causa de muerte en países desarrollados. Durante el curso de la enfermedad se pueden observar cambios importantes en la producción de hormonas que van de andrógeno dependiente (AD) a andrógeno independiente (AI) en etapas finales de metastasis.

Dentro de las perspectivas de este trabajo se pretende investigar utilizando un modelo *in vitro* e *in vivo*, cual es el patrón de metilación de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa en líneas celulares de cáncer de Prostata como LNCaP, PC-3 y DU-145 y en tejidos de pacientes con diferentes grados de la enfermedad, para así correlacionar su expresión con la metilación en regiones promotoras en diferentes estadios de la enfermedad de AD a AI. Esto con el fin de dilucidar si estos genes en ausencia de andrógenos podrían estarse regulando por otros mecanismos como la metilación y que podrían estar asociados a mecanismos de metastasis del cáncer de prostata.

## 11. Referencias.

- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991 Nov 14;354(6349):159-61.
- Andersson S, Bishop RW, Russell DW. Expression cloning and regulation of steroid 5 alpha-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J Biol Chem*. 1989 Sep 25;264(27):16249-55.
- Andersson S, Russell DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(10):3640-4.
- Andriole GL, Roehrborn C, Schulman C, Slawin KM, Somerville M, Rittmaster RS. Effect of dutasteride on the detection of prostate cancer in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2004 Sep;64(3):537-41; discussion 542-3.
- Asada Y, Sonoda T, Ojiro M, Kurata S, Sato T, Ezaki T, Takayasu S. 5 alpha-reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2875-80.
- Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*. 1996 Apr;61(4):240-51.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6-21.
- Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000(27):39-66.

- Canto P, Vilchis F, Chavez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Perez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP. Mutations of the 5 alpha-reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 alpha-reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Feb;46(2):155-60.
- Carson C 3rd, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003 Apr;61(4 Suppl 1):2-7.
- Clark RV, Hermann DJ, Cunningham GR, Wilson TH, Morrill BB, Hobbs S. Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5alpha-reductase inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2179-84.
- Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet*. 1989 Sep;83(2):181-8.
- Chapple CR. Pharmacological therapy of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: an overview for the practising clinician. *BJU Int*. 2004 Sep;94(5):738-44.
- Choi JH, Pfeifer GP. DNA damage and mutations produced by chloroacetaldehyde in a CpG-methylated target gene. *Mutat Res*. 2004 Dec 21;568(2):245-56.
- Duncan BK, Miller JH. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*. 1980 Oct 9;287(5782):560-1.
- Fernandez-Cancio M, Nistal M, Gracia R, Molina MA, Tovar JA, Esteban C, Carrascosa A, Audi L. Compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene exon 4 in a male pseudohermaphrodite patient of Chinese origin. *J Androl*. 2004 May-Jun;25(3):412-6.
- Fernandez-Cancio M, Rodo J, Andaluz P, Martinez de Osaba MJ, Rodriguez-Hierro F, Esteban C, Carrascosa A, Audi L. Clinical, biochemical and morphologic diagnostic

markers in an infant male pseudohermaphrodite patient with compound heterozygous mutations (G115D/R246W)

Giannelli F, Green PM, High KA, Lozier JN, Lillicrap DP, Ludwig M, Olek K, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 25;18(14):4053-9.

Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Ljung R, Nilsson IM, Giannelli F. The incidence and distribution of CpG----TpG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots. *Nucleic Acids Res.* 1990 Jun 11;18(11):3227-31.

Griffin JE, Leshin M, Wilson JD. Androgen resistance syndromes. *Am J Physiol.* 1982 Aug;243(2):E81-7.

Hackel C, Oliveira LE, Ferraz LF, Tonini MM, Silva DN, Toralles MB, Stuchi-Perez EG, Guerra-Junior G. New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5alpha-reductase deficiency type 2. *J Mol Med.* 2005 Mar 16; [Epub ahead of print]

Hellwinkel OJ, Muller A, Struve D, Hiort O. Influence of androgens and age on androgen receptor and 5 alpha-reductase II transcription. *Eur J Endocrinol.* 2000 Aug;143(2):217-25.

Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol.* 2000 Feb;142(2):101-10.

Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. *Mutat Res.* 1993 Jan;285(1):61-7.

Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, Sidransky D, Umbricht CB. Quantitative Assessment of Promoter Methylation Profiles in Thyroid Neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Apr 19; [Epub ahead of print]

- Iguchi-Ariga SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1989 May;3(5):612-9.
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science.* 1974 Dec 27;186(4170):1213-5.
- Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, MacBride S, Peschel R, Tomaszewski J, VanArsdalen K, Wein AJ, Rebbeck TR. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res.* 2000 Mar 15;60(6):1626-30.
- Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):293-300.
- Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol.* 1999 Oct;9(5):339-47.
- Kim KS, Liu W, Cunha GR, Russell DW, Huang H, Shapiro E, Baskin LS. Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res.* 2002 Feb;307(2):145-53. Epub 2001 Nov 27.
- Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N. Structure of human type II 5 alpha-reductase gene. *Endocrinology.* 1992 Sep;131(3):1571-3.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992 Jun 12;69(6):915-26.

- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002 Nov;18(11):1427-31.
- Magewu AN, Jones PA. Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun;14(6):4225-32.
- Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3463-8.
- Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol*. 2000 May;183(2):145-54.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytosine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52353-60. Epub 2004 Sep 24.
- Moul JW, Chodak G. Combination hormonal therapy: a reassessment within advanced prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2004 Sep;7 Suppl 1:S2-7.
- Nirde P, Georget V, Terouanne B, Galifer RB, Belon C, Sultan C. Quantitation of androgen receptor messenger RNA from genital skin fibroblasts by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998 Jul;66(1-2):35-43.
- Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19548-54.

- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
- Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*. 2001 Sep;195(1):97-110.
- Pitts WR Jr. The clinical rationale for immediate androgen deprivation without estrogen deprivation. *Clin Prostate Cancer*. 2003 Sep;2(2):127-8.
- Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, Stanton PG, McLachlan RI, Robertson DM. Differential regulation of rat testicular 5alpha-reductase type 1 and 2 isoforms by testosterone and FSH. *J Endocrinol*. 2003 Mar;176(3):393-403.
- Reyes EM, Camacho-Arroyo I, Nava G, Cerbon MA. Differential methylation in steroid 5 alpha-reductase isozyme genes in epididymis, testis, and liver of the adult rat. *J Androl*. 1997 Jul-Aug;18(4):372-7.
- Rhodes L, Harper J, Uno H, Gaito G, Audette-Arruda J, Kurata S, Berman C, Primka R, Pikounis B. The effects of finasteride (Proscar) on hair growth, hair cycle stage, and serum testosterone and dihydrotestosterone in adult male and female stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Oct;79(4):991-6.
- Skordis N, Patsalis PC, Bacopoulou I, Sismani C, Sultan C, Lumbroso S. 5 alpha-reductase 2 gene mutations in three unrelated patients of Greek Cypriot origin: identification of an ancestral founder effect. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005 Mar;18(3):241-6.
- Smith CM, Ballard SA, Worman N, Buettner R, Masters JR. 5 alpha-reductase expression by prostate cancer cell lines and benign prostatic hyperplasia in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Apr;81(4):1361-6. \*

- Sobel V, Zhu YS, Imperato-McGinley J. Fetal hormones and sexual differentiation. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004 Dec;31(4):837-56, x-xi.
- Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology.* 2001 Dec;58(6 Suppl 1):17-24; discussion 24.
- Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 Apr;3(2):226-31.
- Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW. Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):799-809.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest.* 1993 Aug;92(2):903-10.
- Torres JM, Ortega E. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J.* 2003 Aug;17(11):1428-33.
- Vaarala MH, Lukkarinen O, Marttila T, Kyllonen AP, Porvari KS, Vihko PT. Prostatic expression of human 5alpha-reductase type 2 during finasteride therapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *World J Urol.* 2000 Dec;18(6):406-10.
- Viger RS, Silversides DW, Tremblay JJ. New insights into the regulation of Mammalian sex determination and male sex differentiation. *Vitam Horm.* 2005;70:387-413.
- Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 2001 Dec;23(12):1131-7.

- Wigley WC, Pihoda JS, Mowszowicz I, Mendonca BB, New MI, Wilson JD, Russell DW. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isozyme. *Biochemistry*. 1994 Feb 8;33(5):1265-70.
- Zhou Z, Speiser PW. Regulation of HSD17B1 and SRD5A1 in lymphocytes. *Mol Genet Metab*. 1999 Nov;68(3):410-7.

## **12. Apéndice.**

### **12. 1. Artículo derivado del proyecto de tesis.**



## Evidence that steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme genes are differentially methylated in human lymphocytes

M. Rodríguez-Dorantes<sup>a</sup>, M. Lizano-Soberón<sup>b</sup>, I. Camacho-Arroyo<sup>a</sup>,  
R. Calzada-León<sup>c</sup>, S. Morimoto<sup>d</sup>, N. Téllez-Ascencio<sup>a</sup>, M.A. Cerbón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Cancerología, 14000 Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Servicio de Endocrinología, Instituto Nacional de Pediatría, 04530 Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000 Mexico City, Mexico

Received 16 March 2001; accepted 20 November 2001

### Abstract

The synthesis of dihydrotestosterone (DHT) is catalyzed by steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes 1 and 2, and this function determines the development of the male phenotype during embryogenesis and the growth of androgen sensitive tissues during puberty. The aim of this study was to determine the cytosine methylation status of 5 $\alpha$ -reductase isozymes types 1 and 2 genes in normal and in 5 $\alpha$ -reductase deficient men. Genomic DNA was obtained from lymphocytes of both normal subjects and patients with primary 5 $\alpha$ -reductase deficiency due to point mutations in 5 $\alpha$ -reductase 2 gene. Southern blot analysis of 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes from DNA samples digested with *HpaII* presented a different cytosine methylation pattern compared to that observed with its isoschizomer *MspI*, indicating that both genes are methylated in CCGG sequences. The analysis of 5 $\alpha$ -reductase 1 gene from DNA samples digested with *Sau3AI* and its isoschizomer *MboI* which recognize methylation in GATC sequences showed an identical methylation pattern. In contrast, 5 $\alpha$ -reductase 2 gene digested with *Sau3AI* presented a different methylation pattern to that of the samples digested with *MboI*, indicating that steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene possess methylated cytosines in GATC sequences. Analysis of exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene after metabisulfite PCR showed that normal and deficient subjects present a different methylation pattern, being more methylated in patients with 5 $\alpha$ -reductase 2 mutated gene. The overall results suggest that 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 are differentially methylated in lymphocytes from normal and 5 $\alpha$ -reductase deficient patients. Moreover, the extensive cytosine methylation pattern observed in exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in deficient patients, points out to an increased rate of mutations in this gene. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** DNA methylation; 5 $\alpha$ -reductase isozymes; Human lymphocytes; Methylation-sensitive PCR; Dihydrotestosterone; 5 $\alpha$ -reductase deficiency

### 1. Introduction

The enzyme steroid 5 $\alpha$ -reductase is a microsomal protein that catalyses the NADPH-dependent reduction of a variety of steroids containing 3-keto  $\Delta^{4,5}$  double bond [1]. This enzyme participates in the transformation of testosterone into dihydrotestosterone (DHT), which plays a central role in human sexual physiology and is responsible for the differentiation of male external genitalia and prostate [2]. Two steroid 5 $\alpha$ -reductase genes have been cloned. These genes encode two different isozymes types 1 and 2, that present different biochemical and pharmacological properties [3]. Intraspecies and interspecies comparisons between these enzymes show moderate homologies suggesting different

structure, function and regulation [3]. In most male reproductive tissues, type 2 isozyme is more abundant than type 1, whereas the latter predominates in non reproductive tissues [4].

The primary 5 $\alpha$ -reductase deficiency in humans induces a syndrome in which the affected men usually have normal internal genitalia, resulting from testosterone effects on the Wolffian ducts, but abnormal external genitalia, the development of which depends on DHT activity [5]. Similar clinical characteristics are observed in patients with secondary deficiency of the enzyme. The main difference between primary and secondary deficiency is that, in the former the 5 $\alpha$ -reductase gene 2 exhibits point mutations, whereas the latter is due to mutations in androgen receptor gene [6].

Mutational analysis of primary deficiency of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene has been well documented [6,7]. Interestingly, in Mexican patients the majority of these mutations occurs

\* Corresponding author. Tel: +52-55-5622-30-98;

fax: +52-55-5616-20-10.

E-mail address: mcerbon@correo.unam.mx (M.A. Cerbón).

in exon 4 [8]. An increase in mutations in many mammalian genes has been associated to gene methylation [9]. Furthermore, many hot spot mutations in a large number of genes are related to a specific gene methylation pattern [9,10]. The methylation status is established during development, and the pre-existing patterns are inherited in the DNA replication process [11]. Some restriction endonucleases are affected by these 5-methyl-cytosines, becoming unable to cleave DNA when cytosine residues are methylated at their recognition sites [12]. Methylation-sensitive endonucleases yield differences in the Southern hybridization pattern in some DNA regions [13].

In the present study, we determined the methylation status of 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes using DNA cleavage with restriction endonucleases sensitive to DNA methylation (RFLP). In addition, we explored specific 5 $\alpha$ -reductase gene 2 cytosine methylation pattern using methylation-specific PCR (MSP) and genomic sequencing from Mexican normal subjects and patients with 5 $\alpha$ -reductase deficiency.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Four patients with 5 $\alpha$ -reductase primary deficiency, and three adult healthy men were studied. The diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase primary deficiency in the affected subjects was established by physical examination, measurements of Testosterone/DHT plasmatic ratio, pedigree analysis and karyotype [5,8]. All subjects signed consent forms approved by the Ethical Committee of the National Institute of Pediatrics in Mexico City.

### 2.2. DNA isolation from blood

Blood samples (10 ml) from healthy donors and from those with deficiency of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene were obtained by venipuncture in heparinized Vacutainer sterile tubes. Lymphocytes were isolated from the density gradient of Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Uniparts), as previously described, with minor modifications [14]. The final pellet of cells was washed four times for 5 min at 2500 rpm with RPMI-1640 medium (washing was performed using 30 ml medium/10 ml of original blood sample). The washed cell pellet was processed for total DNA extraction as described previously [15]. In brief, each sample was resuspended in 3 ml of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 20  $\mu$ g/ml pancreatic RNAase, 0.5% SDS). After 1 h of incubation at 37 °C the lysates were digested with proteinase K (100  $\mu$ g/ml) at 37 °C overnight. Proteins were removed by three extractions with a mixture of buffered phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1) and a final extraction with chloroform/isoamyl alcohol (49:1). The aqueous phase was adjusted to 0.5 M ammonium acetate and precipitated by the addition of 2.5 volume of absolute alcohol. DNA

concentration was determined by absorbance measurement at 260 nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 0.5% agarose gels in 0.5X TBE buffer (0.045 M Tris-borate, pH 8.0, 1 mM EDTA).

### 2.3. DNA digestion with restriction endonucleases

Total DNA (15  $\mu$ g) was digested with 6 U/ $\mu$ g of the following enzymes: *Hpa*II, *Msp*I, *Mbo*I and *Sau*3AI (Gibco BRL Rockville, MD, USA) using the conditions described by the supplier. Digested DNA was separated by electrophoresis on 1% agarose gels in 0.5X TAE buffer at 30 V for 12 h, and subjected to hydrolysis with NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M for 45 min. Gels were washed with sterile water and neutralized with a solution of 1 M Tris-HCl (pH 7.4), NaCl 1.5 M. Then, DNA was transferred to Gene Screen membranes (New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA) in 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0), washed with 6X SSC buffer for 3 min and heated at 80 °C for 2 h under vacuum. Membranes were prehybridized overnight in 1X Denhart's solution (1% bovine serum albumin, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% Ficoll 400) which contained 50% formamide, 0.2% SDS, 10 mM EDTA, 120 mM phosphate buffer and 50  $\mu$ g/ml denatured DNA salmon sperm. Hybridization was performed in prehybridization solution (0.1 ml/cm<sup>2</sup>) with human 5 $\alpha$ -reductase cDNA gene 1 (this cDNA was a gentle gift from Dr. D.W. Russell from Texas University, USA) which was labeled by the random primer method (Gibco, BRL) with <sup>32</sup>P-dCTP (specific activity 1–2  $\times$  10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g of DNA). After hybridization, membranes were washed with 2X SSC at room temperature, followed by two washes under high stringency conditions (0.1 X SSC, 0.1% SDS at 60 °C). Membranes were then exposed to a  $\beta$ -Max film (Amersham) for 72 h at –70 °C. After film exposure, the membranes were stripped and rehybridized with 5 $\alpha$ -reductase human cDNA gene 2 (this cDNA was a kind gift from Dr. Fernand Labrie from Laval Hospital, Quebec) under the conditions described above [16].

### 2.4. Methylation-specific PCR and sodium bisulfite genomic sequencing

Sodium bisulfite genomic amplification and sequencing was performed essentially as described previously [17,18]. An amount of 10  $\mu$ g of purified genomic DNA from lymphocytes were digested with *Eco*RI. Then, DNA was precipitated and washed two times in 80% EtOH. DNA was denatured at room temperature with 0.4 M NaOH/0.2 M EDTA for 10 min, and treated with 2.5 M sodium bisulfite for 16 h (Introgen, Purchase, NY), as described previously [18]. Modified DNA was resuspended in 50  $\mu$ l of TE (0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA) and stored immediately at –20 °C.

The sequence of primers and PCR conditions used for exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase gene amplifications are shown

Table 1  
Summary of primer sets and PCR annealing conditions for amplifying exon 4

Primer	Sequence	Annealing conditions
SRD5A2-W sense	5'-acg cag gtg gct tgt tta cg-3'	62 °C, 30 s
SRD5A2-W anti	5'-aag cta cgt gaa tgc tgc cg-3'	
SRD5A2-U sense	5'-atg tag gtg gtt tgt tta tg-3'	45 °C, 30 s
SRD5A2-U anti	5'-aaa cta cat aaa tac tac ca-3'	
SRD5A2-M sense	5'-acg tag gtg gtt tgt tta cg-3'	50 °C, 30 s
SRD5A2-M anti	5'-aaa cta cgt aaa tac tac cg-3'	

in Table 1. These primer sequences were chosen in order to amplify the regions containing frequent cytosines (to distinguish the unmodified from the modified DNA) and CpG pairs near to 3'-end of primers [17]. These primer sets were designed to amplify the complete sequence of exon 4 [5]. In this examination we synthesized three sets of primers (U, M, and W). Primer set (U) anneals to unmethylated DNA that has undergone a chemical modification. Primer set (M) anneals to methylated DNA that has undergone a chemical modification. Unmodified DNA was amplified with the W primer set, which is used as a positive control for PCR.

PCR reactions were performed for 40 cycles after an initial denaturation step of 95 °C for 5 min. PCR cycles were: 30 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of extension at 72 °C. Annealing conditions are given in Table 1. A final cycle was performed at 72 °C for 5 min in all the W, U, and M

cases. An amount of 25 µl of the total PCR reaction products of each sample were electrophoresed on 2% agarose gel. PCR products were visualized by staining with ethidium bromide. A single band was detected in all cases, and the size of each specific amplification product, as expected, was 196 bp. PCR products were purified in a QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). Pure DNA was eluted in 20 µl H<sub>2</sub>O. The DNA sample was directly sequenced using a Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing kit, using <sup>33</sup>P-ddNTP terminators (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), under conditions specified by the manufacturer. An amount of 4 µl of total sequencing reaction of each sample were electrophoresed on denaturing polyacrylamide gels at 6%, 1300 V for 3 h. The gel was dried and exposed for autoradiography for 24 h.

In sequencing gels, transitions C for T in the exon 4 of 5α-reductase gene were observed. The number of nonconverted cytosines, after metabisulfite treatment in normal subjects, was compared to that of nonconverted cytosines in deficient patients.

### 3. Results

The methylation status of 5α-reductase types 1 and 2 genes was investigated using the isoschizomeric restriction enzymes *Hpa*II and *Msp*I, which recognize a CCGG sequence. *Msp*I does not cleave DNA when the 5'-C residue

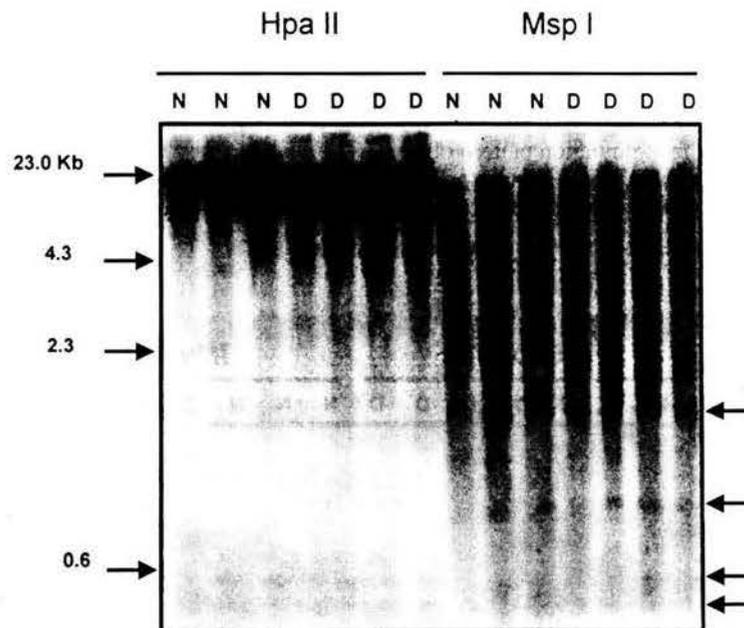


Fig. 1. Methylation status of steroid 5α-reductase type 1 gene in CCGG sequences in normal subjects and in patients with 5α-reductase deficiency. Genomic DNA from normal subjects (N) and patients with primary steroid 5α-reductase type 2 deficiency (D) was digested with *Hpa*II or *Msp*I restriction enzymes, and then electrophoretically separated on 1% agarose gels. Southern blot was performed using as probe the cDNA of the 5α-reductase type 1 gene (see Section 2). Fragments lower than 4.3 kb were observed in DNA digested with *Msp*I enzyme but not with its isoschizomer *Hpa*II, indicating DNA methylation (right arrows).

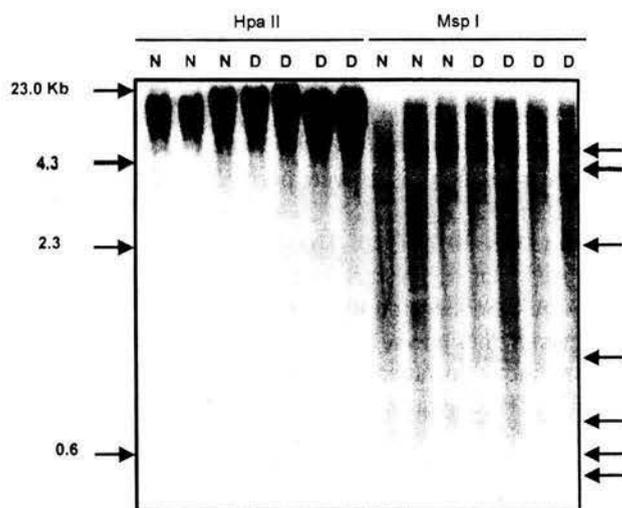


Fig. 2. Methylation status of steroid  $5\alpha$ -reductase type 2 gene in normal and affected subjects with steroid  $5\alpha$ -reductase primary deficiency. Membranes from Fig. 1 were stripped at high stringency conditions and rehybridized using as probe the cDNA of the  $5\alpha$ -reductase type 2 gene (see Section 2). Fragments lower than 4.3 kb were observed in DNA digested with *MspI* enzyme but not with its isoschizomer *HpaII*, indicating DNA methylation (right arrows).

is methylated, but cleaves DNA when the 3'-C residue is methylated, whereas *HpaII* does not cleave DNA when 3'-C residue is methylated.

In Southern blot analysis fragments larger than 4 kb were resolved with *HpaII* in  $5\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes. However, the restriction pattern produced with *MspI* was different in both genes. Some low molecular weight fragments observed in the *MspI* digest did not appear in *HpaII* digest in both normal subjects and deficient patients. (Figs. 1 and 2).

To exclude the possibility that the methylation pattern observed in both  $5\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes after *HpaII* digest was due to an incomplete restriction endonuclease activity, we predigested genomic DNA with *EcoRI*, followed

by *HpaII* digestion. Similar restriction pattern to that found with *HpaII* was observed in the samples predigested with *EcoRI* (data not shown).

We used another set of restriction enzymes to further explore cytosine methylation status of  $5\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes in other sequences. Endonuclease *Sau3AI* and its isoschizomer *MboI* recognize and cleave DNA at the same 5'-GATC-3' sequence, but only *MboI* can cleave DNA when the cytosine residue is methylated. The results of the Southern blot analysis showed four fragments of low molecular weight (below 0.6 kb) which were resolved with either *Sau3AI* or its isoschizomer *MboI* in type 1 gene (Fig. 3). In addition, the restriction pattern in DNA samples digested with either *MboI* or *Sau3AI* from normal subjects and patients with  $5\alpha$ -reductase primary deficiency was similar in type 1 gene (Fig. 3). In contrast, in type 2 gene *Sau3AI* produced a different restriction pattern compared to that produced by *MboI* in both normal and affected patients (Fig. 4).

To further investigate the methylation status of the  $5\alpha$ -reductase 2 gene in intragenic regions, and with the hypothesis that methylation of CpG sites in exon 4 should be related with the apparition of hot spot mutations, we used a direct reliable method: MSP and sodium bisulfite genomic sequencing. In this method, unmethylated cytosine residues are converted to uracils by treatment with sodium bisulfite, and they are sequenced as thymidines, while methylated cytosine residues are unchanged. In Fig. 5A, a representative sequence of exon 4 of a normal (N) and a patient (D) with a hot spot mutation in the codon 212 of  $5\alpha$ -reductase 2 gene is shown. A clear difference in the degree of cytosine methylation between normal subjects and patients with the  $5\alpha$ -reductase 2 mutated gene, was detected (Fig. 5B). The map of the methylation status of exon 4 of  $5\alpha$ -reductase 2 gene obtained from normal and deficient subjects is summarized in Fig. 6. It can be observed that methylated cytosines in the exon 4 of  $5\alpha$ -reductase 2 gene in normal subjects represent only 15% of those methylated in deficient patients.

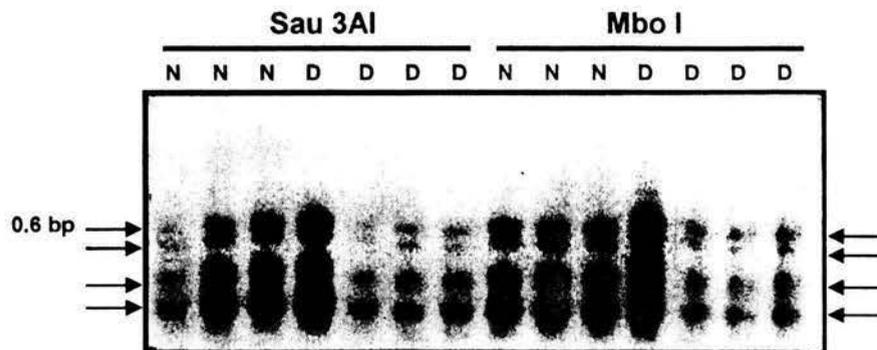


Fig. 3. Methylation status of  $5\alpha$ -reductase type 1 gene in GATC sequences. Genomic DNA from normal subjects (N) and patients with primary  $5\alpha$ -reductase type 2 deficiency (D) was submitted to digestion with *Sau3AI* or *MboI* restriction enzymes, and then electrophoretically separated on 1% agarose gels. Southern blot was performed as in Fig. 1. Fragments lower than 0.6 kb were observed in DNA digested with *Sau3AI* or with its isoschizomer *MboI* (arrows).

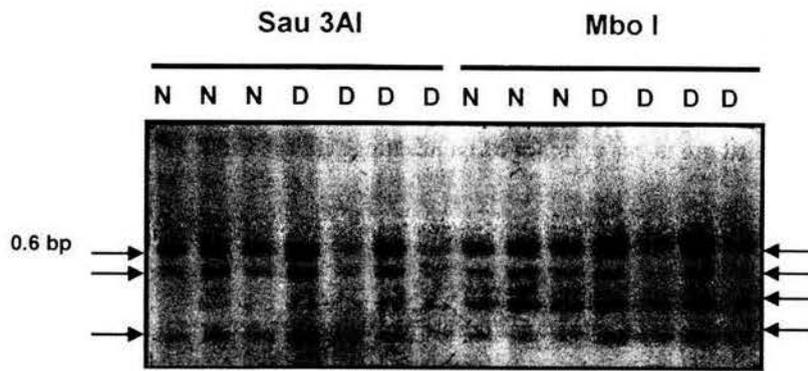


Fig. 4. Methylation status of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in GATC sequences. Membranes from Fig. 3 were stripped at high stringency conditions and rehybridized as in Fig. 2. Different restriction pattern was observed in DNA digested with *Sau*3AI compared to DNA digested with its isoschizomer *Mbo*I, indicating that some GATC sequences are methylated in cytosines in 5 $\alpha$ -reductase 2 gene (arrows).

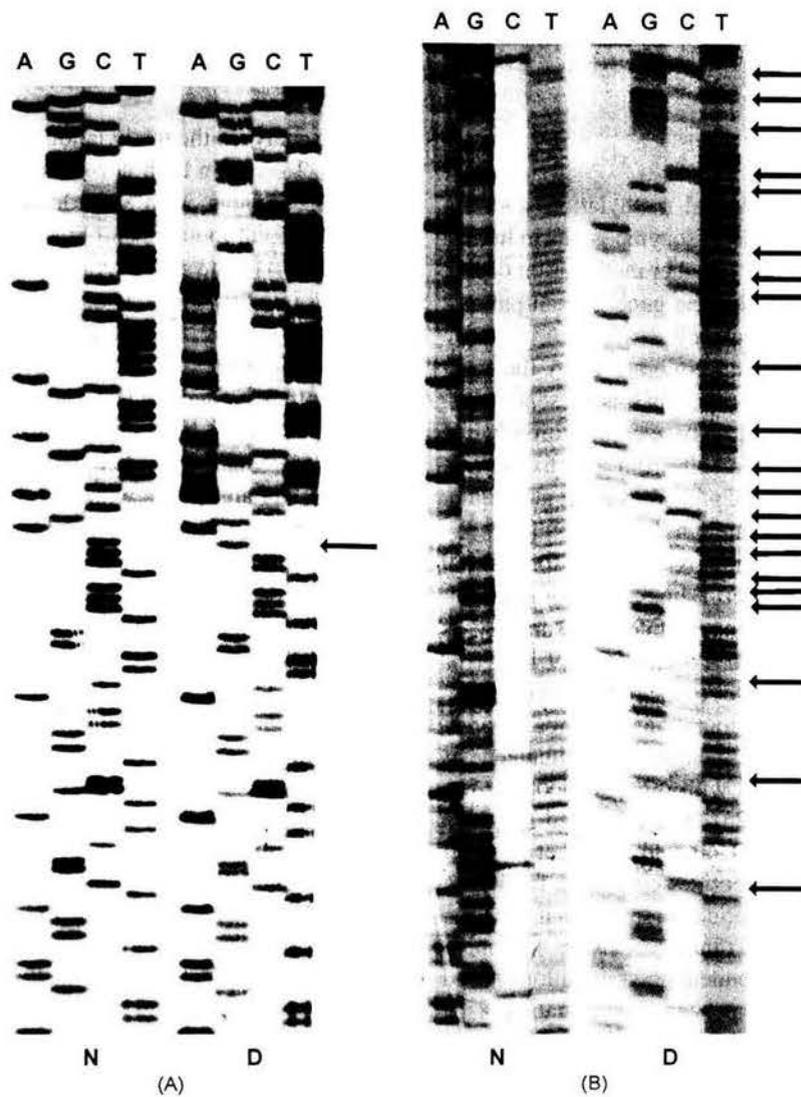


Fig. 5. Detection of DNA mutation and cytosine methylation status of exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene after DNA bisulfite treatment. A: DNA sequence of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene. Sequencing of a normal subject (*N*) and a deficient patient (*D*) with a mutation in the cytosine of codon 212 in exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene, which was responsible for a proline to arginine substitution (CGA instead of CCA). The mutation is indicated by arrow. B: Methylation status of exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene sequencing of DNA was performed after treatment with sodium bisulfite. DNA treated with sodium bisulfite from normal subject (*N*) and a patient with mutation in 212 codon (*D*). The arrows indicate the differences in the methylation pattern between a patient with 5 $\alpha$ -reductase type 2 mutation and a normal subject.

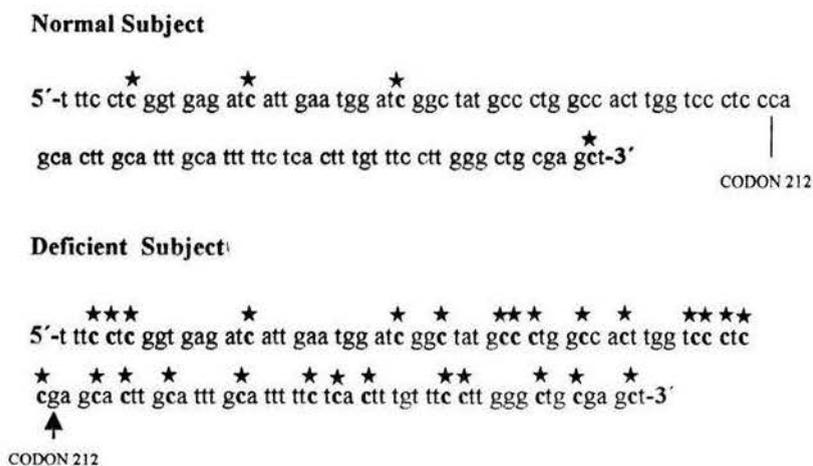


Fig. 6. Cytosine methylation status of exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene. The methylation status of exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene obtained from normal and deficient subjects is summarized in this figure. Methylated cytosines are indicated by stars. The hot spot mutation is indicated by an arrow. It can be observed that a pattern of high cytosine methylation is present in mutated subjects as compared with the normal subjects.

#### 4. Discussion

This study presents a differential methylation status of steroid 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 isozyme genes in human lymphocytes, and indicates that a higher methylation degree occurs in the exon 4 of 5 $\alpha$ -reductase gene 2 from patients with primary 5 $\alpha$ -reductase deficiency.

It is well established that, in vertebrate DNA the most commonly methylated dinucleotide, CpG, is present at levels far lower than that predicted by base composition, while the dinucleotides that would result from the fixation of deaminated m5 CpG (TpG and CpA) are present at a higher level than that predicted by a random distribution [19].

Although cytosine methylation is essential for normal development [11], 35% of germ line mutations in human diseases occur at CpG dinucleotides, presumably as a result of 5-methyl-cytosine to T transitions [9,10]. This 5-methyl-cytosine also contributes to the formation of an extraordinarily high percentage of mutations in tumor suppressor genes in somatic cells [12]. A high rate of mutagenesis of 5-methyl-cytosine compared with other nucleotides has been widely documented [20–25]. The estimated mutation rate of CpG dinucleotides is 10–40 fold than that of other dinucleotides [26]. CpG dinucleotides occur at a frequency of only about 1% of all dinucleotides in the human genome. Nevertheless, transitions at CpG dinucleotides are accounted for more than 25% of the independent point mutations found in different genes [27–32]. It has been shown that cytosine residues in some genes known to have undergone somatic mutations are methylated in normal human tissues [33].

In a survey of point mutations causing human genetic diseases, 37% were in CpG dinucleotides [21]. In hemophilia B, 45% of mutations were CpG transitions in factor IX gene [28,29]. These alterations are also observed in germ-line mutations in tumor suppressor genes, and in *APC* gene mutations in patient with familial adenomatous polyposis [33].

We analyzed the methylation status of 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes in both normal subjects and in patients with primary deficiency in 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene characterized by point mutations in this gene. We explored the presence of cytosine methylation in 5 $\alpha$ -reductase genes using RFLP with different sets of methylation-sensitive enzymes. Using *HpaII*, an enzyme sensitive to cytosine methylation in CCGG sequences and its isoschizomer *MspI*, we found that both 5 $\alpha$ -reductase genes presented differences in the restriction pattern by Southern analysis, indicating that both genes were markedly methylated, as shown in Figs. 1 and 2. These data are in line with a previous report of the methylation status of these genes in rat tissues [34].

To further investigate the methylation status of 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes, we used another set of enzymes, *Sau3AI* and *MboI* isoschizomer, that recognize 5'-GATC-3' sequences. The Southern hybridization patterns obtained from peripheral blood DNA showed differences between the digest of methylation-sensitive *Sau3AI* and that of its methylation-insensitive isoschizomer *MboI* only in type 2 gene, indicating the existence of 5-methyl-cytosines in some GATC sequences of type 2 gene. Although the main methylated cytosine residues are in the 5'-CG-3' sequence in human DNA, there are other few recognition sites (5'-GATC-3') that can be methylated [35]. In line with this observation, our results indicate that some cytosine residues at the 5'-GATC-3' sites are methylated in the type 2 gene, allowing only *MboI* to cleave DNA and provide characteristic fragments for the Southern hybridization patterns in both normal and deficient subjects (Fig. 4).

In 5 $\alpha$ -reductase deficient Mexican population, hot spot mutations of 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene have been mainly described in exon 4 followed by exon 1 [8]. In this study, we used MSP method coupled to sequencing to analyze the methylation status of exon 4. Our results demonstrated that patients with mutations in exon 4 presented marked

differences in the methylation pattern as compared to normal subjects. We observed a clear increase in the methylated cytosine pattern in patients with mutation in exon 4 of gene 2, compared to normal subjects. This increased methylation status in exon 4 of type 2 gene in patients with a hot spot mutation suggests, that cytosine methylation should be associated to the appearance of this mutation. This has been previously suggested by the identification of recurrent mutations by Thigpen, in a large study of different ethnic groups [36]. Furthermore, it has been demonstrated that mutations in Dominican Kindred occurs in cytosines of CpG dinucleotides of exon 5 of gene 2. Mutations involving CpG dinucleotides are common in the human genome [21], and are thought to be due to deamination of 5'-methylated cytosines induced by methylation. This suggest that cytosines that were mutated in the Dominican subjects were methylated [36].

The overall results demonstrate that 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 genes are differentially methylated in normal and in 5 $\alpha$ -reductase deficient patients, and suggest that this abnormal methylation pattern in patients should be involved in the apparition of 5 $\alpha$ -reductase 2 gene mutations.

## Acknowledgements

This work was supported by a CONACyT fellowship to M. Rodríguez-Dorantes and by PAIP grant, Facultad de Química, UNAM. Thanks are due to MsC. Adela Carrillo-García and BS. Erick de la Cruz from the Instituto Nacional de Cancerología for their excellent technical assistance.

## References

- [1] W.C. Wigley, J.S. Prihoda, I. Mowszowicz, B.B. Mendonca, M.I. New, J.D. Wilson, D.W. Russell, Natural mutagenesis study of the human steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 isozyme, *Biochemistry* 33 (1994) 1265–1270.
- [2] J.D. Wilson, J.E. Griffin, D.W. Russell, Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency, *Endocr. Rev.* 14 (1993) 577–592.
- [3] S. Andersson, D.W. Russell, Structural and biochemical properties of clone and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 3640–3644.
- [4] A.E. Thigpen, R.I. Silver, J.M. Guileyardo, M.L. Casey, J.D. McConnell, D.W. Russell, Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 903–910.
- [5] A.E. Thigpen, D.L. Davis, A. Milatovich, B.B. Mendonca, J. Imperato-McGinley, J.E. Griffin, U. Francke, J.D. Wilson, D.W. Russell, Molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 799–809.
- [6] J.E. Griffin, J.D. Wilson, The androgen resistance syndromes: 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency, testicular feminization, and related disorders, in: C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 1989, pp. 1919–1944.
- [7] S. Andersson, M. Berman, E.P. Jenkins, D.W. Russell, Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism, *Nature* 354 (1991) 159–161.
- [8] P. Canto, F. Vilchis, B. Chávez, O. Mutchinick, J. Imperato-McGinley, G. Pérez-Palacios, A. Ulloa-Aguirre, J.P. Méndez, Mutations of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency, *Clin. Endocrinol.* 46 (1997) 155–160.
- [9] R. Holliday, G.W. Grigg, DNA methylation and mutation, *Mutat. Res.* 285 (1993) 61–67.
- [10] R.L. Momparler, V. Bovenzi, DNA methylation and cancer, *J. Cell. Physiol.* 183 (2000) 145–154.
- [11] H. Cedar, A. Razin, DNA methylation and development, *Biochim. Biophys. Acta* 1049 (1990) 1–8.
- [12] A.N. Magewu, P.A. Jones, Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the *p53* gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4225–4232.
- [13] L.A. Chandler, H. Gazi, P.A. Jones, P. Boukamp, N.E. Fusenig, Allele specific methylation of the human *c-Ha-ras-1* gene, *Cell* 50 (1987) 711–717.
- [14] P. Hokland, I. Heron, The isopaque-Ficoll method re-evaluated: selective loss of autologous rosette-forming lymphocytes during isolation of mononuclear cells from human peripheral blood, *Scand. J. Immunol.* 11 (1980) 353–356.
- [15] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (Eds.), *Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells*, in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1986, pp. 9.14–9.23.
- [16] E.M. Southern, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503–517.
- [17] J.G. Herman, J.R. Graff, S. Myöhänen, B.D. Nelkin, S.B. Baylin, Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 9821–9826.
- [18] A.M. Raizis, F. Schmitt, J.P. Jost, A bisulfite method of 5-methyl-cytosine mapping that minimizes template degradation, *Anal. Biochem.* 226 (1995) 161–166.
- [19] J.T. Hare, H. Taylor, One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 7350–7354.
- [20] D. Barker, M. Schafer, R. White, Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA, *Cell* 36 (1984) 131–138.
- [21] D.N. Cooper, M. Krawczak, Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes, *Hum. Genet.* 83 (1989) 181–188.
- [22] C. Coulondre, J.H. Miller, P.J. Farabaugh, W. Gilbert, Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*, *Nature* 274 (1978) 775–780.
- [23] B.K. Duncan, J.H. Miller, Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA, *Nature* 287 (1980) 560–561.
- [24] C.C. Harris, M. Hollstein, Clinical implications of the *p53* tumor suppressor gene, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 1318–1327.
- [25] C. Spruck, W. Rideaut, P.A. Jones, in: J.P. Jost, H.P. Saluz (Eds.), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, Birkhauser Verlag, Basel, 1993, pp. 487–509.
- [26] J. Sved, A. Bird, The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrates genomes under a mutation model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 4692–4696.
- [27] D.N. Cooper, M. Krawczak, The mutational spectrum of single base-pair substitutions cause human genetic disease: patterns and predictions, *Hum. Genet.* 85 (1990) 55–74.
- [28] F. Gianelli, P.M. Green, K.A. High, J.N. Lozier, Hemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 4053–4059.
- [29] P.M. Green, A.J. Montandon, D.R. Bentley, R. Ljung, I.M. Nilsson, F. Giannelli, The incidence and distribution of CpG–TpG transitions in the coagulation factor IX gene. A fresh look at CpG mutational hotspots, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 3227–3231.

- [30] D.D. Koeberl, C.D. Bottema, G. Sarkar, R.P. Ketterling, P.J. Bridge, D.P. Lillicrap, S.S. Sommer, Recurrent nonsense mutations at arginine residues cause severe hemophilia B in unrelated hemophiliacs, *Am. J. Hum. Genet.* 84 (1990) 387–390.
- [31] C. Caron de Fromental, T. Soussi, *TP53* tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis, *Genes Chrom. Cancer* 4 (1992) 1–15.
- [32] W.M. Rideout 3rd, G.A. Coetzee, A.F. Olumi, P.A. Jones, 5-methyl-cytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and *p53* genes, *Science* 249 (1990) 1288–1290.
- [33] I. Nishisho, Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyam, J. Utsunomiya, S. Baba, P. Hedge, Mutations of chromosome *5q21* genes in FAP and colorectal cancer patients, *Science* 253 (1991) 665–669.
- [34] E.M. Reyes, I. Camacho-Arroyo, G. Nava, M.A. Cerbón, Differential methylation in steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme genes in epididymis, testis, and liver of the adult rat, *J. Androl.* 18 (1997) 372–377.
- [35] K. Washio, S. Ueda, S. Misawa, Effects of cytosine methylation at restriction sites on deoxyribonucleic acid (DNA) typing, *J. Forensic Sci.* 35 (1990) 1277–1283.
- [36] A.E. Thigpen, D.L. Davis, T. Gautier, J. Imperao-McGinley, D.W. Russel, Brief report: the molecular basis of steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in a large Dominican Kindred, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 1216–1219.