



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Metilación diferencial del gen *VIAAT* en
líneas celulares de cáncer de próstata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

DAVID DE JESÚS DE LA MORA GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Alicia Beatriz Cervantes Peredo
VOCAL: Profesor: Samuel Canizales Quinteros
SECRETARIO: Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes
1er. SUPLENTE: Profesora: María Benita Leonor Fernández Salgado
2° SUPLENTE: Profesora: Nancy Monroy Jaramillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUSTENTANTE:

David de Jesús De la Mora González

AGRADECIMIENTOS

Indudablemente, mis mayores agradecimientos van dirigidos hacia mi madre. Sin su apoyo en cada una de las decisiones que he tomado no me hubiera sido posible alcanzar este o cualquier otro logro. Tu dedicación, tu amor y tu hacer las cosas por nuestro bien son invaluableles y me acompañarán por siempre.

A mi abuela Cecilia y a mi hermano Miguel Ángel, quienes también contribuyen, en todo el sentido de la palabra, al hogar y a la familia, a veces únicos refugios del abrumador mundo exterior.

A mi familia materna, porque a lo largo de toda mi vida siempre me han demostrado cariño desinteresado, constancia y unión.

A los profesores que, en este viaje, me aportaron y transmitieron algo significativo para comprender una parte de la vida.

Y, finalmente, a aquéllos más que verdaderamente crean que merecen mi agradecimiento.

A mi madre
A mi abuela
A mi hermano

Tocar una nota equivocada es
INSIGNIFICANTE;
Tocar sin pasión es
IMPERDONABLE.
{LUDWIG VAN BEETHOVEN}

RESUMEN

La próstata es una glándula del aparato reproductor masculino que produce parte del fluido seminal. El desarrollo y funcionamiento normal de esta glándula está regulado por los andrógenos. El cáncer de próstata es una enfermedad que muestra una alta tasa de incidencia y de mortalidad en todo el mundo. En México se encuentra en el primer lugar de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres mayores de 20 años. El tratamiento consiste principalmente en el bloqueo farmacológico de andrógenos, que provoca una estabilidad o regresión de la enfermedad. Sin embargo, muchos pacientes se vuelven resistentes al tratamiento y progresan a una etapa letal de la enfermedad conocida como independencia de andrógenos. A la fecha, se desconocen los mecanismos involucrados en el desarrollo de esta etapa aunque han surgido varias hipótesis, entre ellas algunas que involucran el estado alterado de los mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA.

En este trabajo se evaluó la expresión del gen *VIAAT* (*Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*) y el nivel de metilación del DNA en una región de la isla CpG en la región promotora del gen en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3, que representan etapas progresivas de la enfermedad. La expresión génica se evaluó mediante qRT-PCR y la metilación del DNA se evaluó mediante secuenciación del DNA tratado con bisulfito de sodio.

La expresión génica de *VIAAT* en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 no pudo ser determinada, lo que quiere decir que posiblemente no haya transcripción de este gen. Sin embargo, la expresión génica se activó en LNCaP y PC3 tras el tratamiento con el fármaco desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina, lo que implica un nivel de regulación de la expresión por metilación del DNA.

Las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 muestran patrones de metilación del DNA diferentes entre sí en la región analizada, tendiendo a una hipermetilación de la isla CpG. NPrEC muestra un porcentaje de metilación de 1.5%, NPrEC de 26.7% y PC3 de 83.6%. Se observa que cada línea celular posee un patrón y un porcentaje de metilación del DNA característico que permite diferenciar una de la otra.

ABREVIATURAS

5azadC	5-aza-2'-deoxicitidina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5meC	5-metilcitosina
AD	Dependencia de andrógenos
AI	Independencia de andrógenos
APE	Antígeno prostático específico
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elementos de respuesta a andrógenos
CaP	Cáncer de próstata
CTCF	Factor de unión a CCCTC
DBD	Dominio de unión al DNA
DHT	Dihidrotestosterona
DNMT	DNA metiltransferasa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GSTP1	Glutación S-transferasa P
HAT	Acetiltransferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
HDM	Desmetilasa de histonas
HMT	Metiltransferasa de histonas
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HSP	Proteínas de choque térmico
LBD	Dominio de unión a ligando
LRES	Silenciamiento epigenético de largo alcance
MBD	Proteína de unión a CpG metilado
NFR	Regiones libres de nucleosomas
NTD	Dominio N-terminal
RNA pol	RNA polimerasa
SAM	S-adenosil metionina
SNC	Sistema nervioso central
TF	Factor de transcripción
VIAAT	Transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades de la Próstata	2
1.2 Andrógenos	3
1.2.1 Mecanismo de acción de los andrógenos.....	4
1.3 El Receptor de Andrógenos	4
1.4 Cáncer de Próstata	6
1.4.1 Prevalencia a nivel mundial.....	6
1.4.2 Prevalencia en México.....	9
1.4.3 Diagnóstico.....	10
1.4.4 Factores de riesgo.....	12
1.4.5 Tratamiento.....	12
1.4.6 Mecanismos de progresión hacia la independencia de andrógenos.....	13
1.5 Epigenética	15
1.6 Modificaciones Epigenéticas	17
1.6.1 Metilación del DNA.....	17
1.6.1.1 Islas CpG.....	18
1.6.1.2 Distribución genómica de la metilación del DNA.....	18
1.6.1.3 Regiones a las orillas de las islas CpG.....	19
1.6.1.4 Funciones de la metilación del DNA.....	20
1.6.1.5 Mecanismos de regulación génica por metilación del DNA.....	21
1.6.1.6 Enzimas encargadas de la metilación del DNA: DNMT.....	21
1.6.1.7 Metilación no CpG.....	23
1.6.1.8 Desmetilación del DNA y la 5-hidroximetilcitosina.....	23
1.6.1.9 Determinación de los perfiles de metilación del DNA.....	23
1.6.2 Modificación de Histonas.....	24
1.6.3 miRNA.....	25
1.6.4 Posicionamiento nucleosómico.....	26
1.7 Epigenética y Cáncer de Próstata	26
1.7.1 Alteraciones de la metilación del DNA en cáncer de próstata.....	29
1.8 El gen VIAAT y la vía GABAérgica	31
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo General.....	37
4.2 Objetivos Particulares.....	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6. RESULTADOS	41
6.1 Cultivo Celular.....	41
6.2 Expresión del gen VIAAT.....	43
6.3 Patrones de metilación en la región promotora del gen VIAAT.....	45
7. DISCUSIÓN	52
7.1 Expresión del gen VIAAT en líneas celulares tratadas con 5-aza-2'-deoxicitidina.....	52
7.2 Patrones de metilación del DNA de la región promotora del gen VIAAT.....	56
8. CONCLUSIONES	64
9. PERSPECTIVAS	65
10. BIBLIOGRAFÍA	66
11. ANEXO	71

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE LA PRÓSTATA

La próstata es una glándula del sistema reproductor masculino que se encuentra debajo de la vejiga, delante del recto y rodea parte de la uretra. Su peso es de entre 20-40 gramos y tiene como función principal la producción del fluido seminal que brinda soporte nutricional al semen y motilidad a los espermatozoides. Anatómicamente, se divide en tres zonas (**Figura 1**): la zona de transición, la zona central y la zona periférica. Por la parte frontal, la próstata se encuentra cerrada por una pared fibromuscular carente de glándulas (Padilla-Rodríguez, 2008).

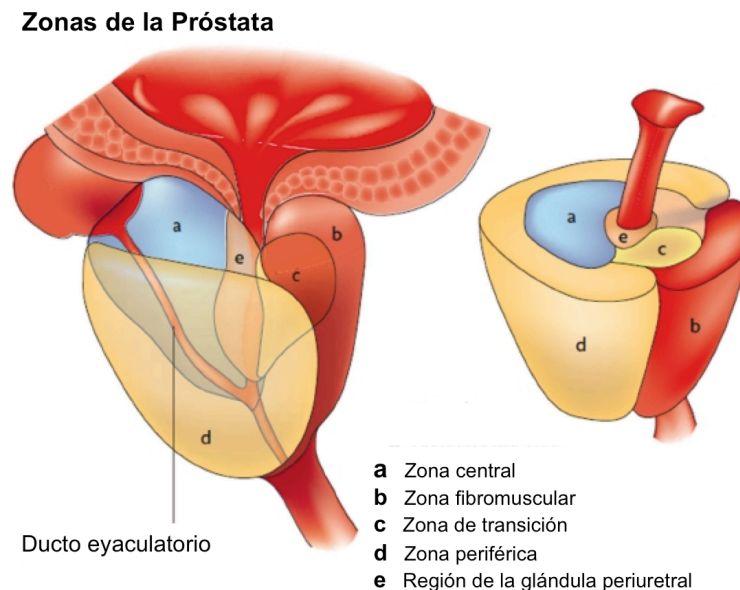


Figura 1. División anatómica de la próstata. Se esquematizan las cuatro regiones principales de la próstata: (a) la zona central, (b) la zona fibromuscular, (c) la zona de transición, y (d) la zona periférica (Modificado de De Marzo *et al.*, 2007).

Histológicamente, la próstata está compuesta por un epitelio glandular y un estroma fibromuscular. El primero da lugar al adenocarcinoma de próstata y está formado por células basales, luminales secretoras y neuroendocrinas. Las células luminales

secretan componentes del fluido prostático, expresan el receptor de andrógenos (AR) y secretan el antígeno prostático específico (APE), una serin-proteasa de 34 kDa. El estroma está compuesto por fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células dendríticas, nervios, mastocitos y linfocitos. Algunas células estromales producen factores de crecimiento que actúan de forma parácrina en las células epiteliales. Esta comunicación regula el crecimiento, desarrollo y respuesta hormonal de la próstata (Feldman y Feldman, 2001). Las células de esta glándula requieren también de la presencia y acción de andrógenos como reguladores del crecimiento celular, proliferación, desarrollo, supervivencia y funcionamiento normal; aunque también se ven involucrados en condiciones patológicas como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP) (Gingrich *et al.*, 1997; Pienta y Bradley, 2006; Dehm y Tindall, 2007; Devlin y Mudryj, 2009).

1.2 ANDRÓGENOS

Los andrógenos, hormonas esteroideas masculinas, son los responsables del desarrollo del fenotipo masculino durante el desarrollo embrionario y, en la pubertad y la edad adulta, son necesarios para la maduración sexual y para el mantenimiento de las funciones del sistema reproductivo y de los caracteres masculinos. Además, afectan una gran variedad de tejidos no reproductivos como la piel, el hueso y el tejido adiposo (Heemers y Tindall, 2007; Devlin y Mudryj, 2009; Green *et al.*, 2012).

La testosterona, el andrógeno principal en la circulación sanguínea, es sintetizada en los testículos. El resto de los andrógenos en sangre son producidos por la corteza adrenal y pueden ser convertidos a testosterona en tejidos periféricos. La síntesis de andrógenos es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH o GnRH) por el hipotálamo estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis anterior, que a la vez induce la producción de testosterona por las células de Leydig en el testículo. La mayoría de la testosterona circulante se encuentra unida a proteínas acarreadoras, como la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) o la albúmina, mientras que únicamente el 1-2% de la testosterona existe de forma libre (Feldman y Feldman, 2001; Heemers y Tindall, 2007; Attar *et al.*, 2009).

Posterior al transporte en la sangre hacia sus tejidos blanco, la testosterona libre, por sus características lipofílicas, se difunde hacia el interior de la célula donde el 90% puede ser rápida e irreversiblemente convertida a su metabolito más potente, dihidrotestosterona (DHT), por acción de la 5 α -reductasa de tipo 2 (Feldman y Feldman, 2001; Pienta y Bradley, 2006; Heemers y Tindall, 2007; Attar *et al.*, 2009).

1.2.1 Mecanismo de acción de los andrógenos

La DHT y la testosterona realizan sus acciones mediante su unión al receptor de andrógenos (AR), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares y factores de transcripción activados por ligando. En estado basal sin ligando, el AR se encuentra en el citoplasma acoplado a proteínas de choque térmico (HSP). Posterior a la unión con su ligando, sufre un cambio conformacional que lleva a la disociación de las HSP y a la fosforilación del receptor por la proteína cinasa A, permitiendo la formación de un homodímero y la traslocación nuclear. Dentro del núcleo, reconoce y se une a secuencias de DNA específicas conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE, por sus siglas en inglés) en las regiones promotoras y en potenciadores de la transcripción de genes blanco involucrados en la supervivencia, crecimiento y diferenciación celular (Pienta y Bradley, 2006; Dehm y Tindall, 2007; Devlin y Mudryj, 2009; Attar *et al.*, 2009; Knudsen y Kelly, 2011; Green *et al.*, 2012). El dímero unido a los ARE puede interactuar directamente con componentes del complejo de iniciación transcripcional o reclutar proteínas correguladoras de la transcripción (**Figura 2**) (Feldman y Feldman, 2001). El prototipo de gen regulado por andrógenos, *APE*, codifica para el antígeno prostático específico, y es un importante biomarcador en el desarrollo del CaP y su progresión (Dehm y Tindall, 2007; Knudsen y Kelly, 2011).

1.3 EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El gen *AR* se localiza en el cromosoma Xq11-12, consiste de 8 exones y se traduce en una proteína de 110 kDa (919 aminoácidos). Se caracteriza por una estructura con cuatro dominios funcionales: un dominio N-terminal (NTD, por sus siglas en inglés), un dominio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés), una región bisagra corta, y un dominio de unión a ligando (LBD, por sus siglas en inglés) (**Figura 3**).

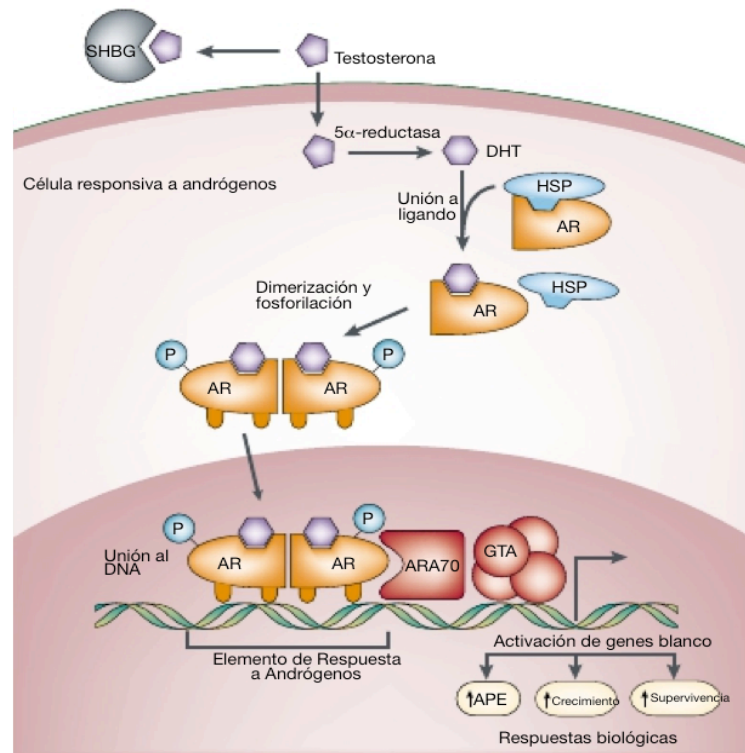


Figura 2. Mecanismo de acción de los andrógenos. La testosterona circula unida a la albúmina y a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona libre entra a la célula y es convertida a DHT por la 5 α-reductasa. La unión de la DHT al receptor de andrógenos (AR) induce una disociación de las proteínas de choque térmico (HSP) y la fosforilación del receptor. El AR se dimeriza, entra al núcleo y se une a elementos de respuesta a andrógenos en regiones promotoras de genes blanco. Coactivadores –como ARA70- y correpresores también se unen al complejo del AR, facilitando o reprimiendo, respectivamente, su interacción con el aparato general de transcripción (GTA). La activación o represión de genes blanco lleva a respuestas biológicas como crecimiento, supervivencia y producción del antígeno prostático específico (APE) (Modificado de Feldman y Feldman, 2001).

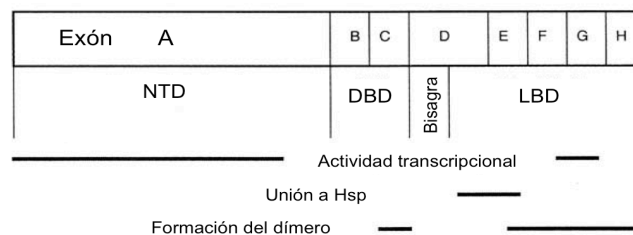


Figura 3. Esquema del receptor de andrógenos. Su estructura consiste en un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión a DNA (DBD), una región bisagra, y un dominio de unión a ligando (LBD) (Modificado de Suzuki e Ito, 1999).

El NTD muestra la mayor variabilidad en la secuencia entre los receptores nucleares y posee unidades de activación de la transcripción (Dehm y Tindall, 2007; Knudsen y Kelly, 2011). El DBD contiene dos dedos de zinc, uno de los cuales determina la especificidad del reconocimiento de ARE en el DNA, los cuales consisten en la secuencia 5'-AGAACA_nAGAACA-3', mientras que el segundo está involucrado en la dimerización y estabilización del AR (Green *et al.*, 2012). La región bisagra es un conector entre el DBD y el LBD e incluye una señal de traslocación al núcleo, así como sitios de fosforilación y acetilación (Devlin, 2009). La estructura del LBD consiste en 12 hélices alfa, que se estabilizan cuando el agonista se une al receptor, lo cual posibilita la unión de coactivadores (Feldman y Feldman, 2001; Heemers y Tindall, 2007). La señalización por el eje del AR también se cree que es un importante mediador de la carcinogénesis de la próstata, aunque los mecanismos precisos de la iniciación y progresión aún no se conocen (Green *et al.*, 2012).

1.4 CÁNCER DE PRÓSTATA

1.4.1 Prevalencia a nivel mundial

El cáncer es una de las primeras causas de muerte en todo el mundo. En 2008 representó 7.6 millones de muertes (13% de todas las muertes) y se proyecta que este número continúe aumentando hasta aproximadamente 13.1 millones en 2030. Los tipos de cáncer más frecuente varían entre hombres y mujeres (**Figura 4**) (OMS, 2013).

A nivel global, el CaP es el segundo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres (13.6% del total) y el quinto más común del total. Las tasas más altas de incidencia se encuentran en Australia/Nueva Zelanda, Europa Occidental y del Norte, y Norteamérica, principalmente por la práctica frecuente de pruebas diagnósticas en estas regiones. La tasa más baja de incidencia se estima en el Centro-Sur de Asia (**Figura 5**). Es la sexta causa de muerte por cáncer en hombres (6.1% del total). Las tasas de mortalidad son generalmente más altas en las poblaciones predominantemente de origen africano (Caribe y África Subsahariana), muy baja en Asia Oriental e intermedia en Europa y Oceanía (**Figura 6**) (IARC, 2010)

Tasa de incidencia y de mortalidad de diferentes tipos de cáncer a nivel global y en México (2008).

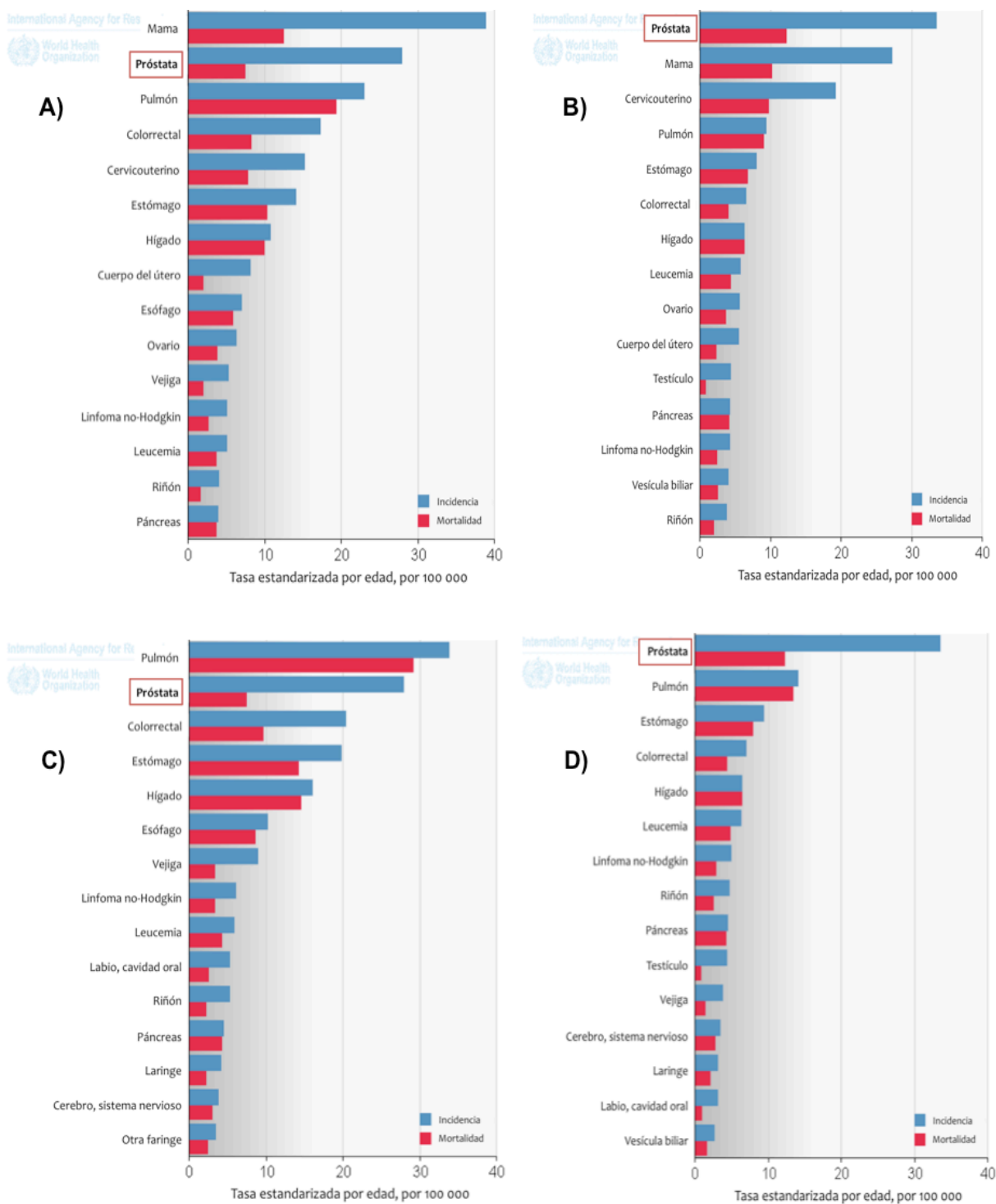


Figura 4. Estadísticas de incidencia y mortalidad. Tasa de incidencia y de mortalidad estandarizada según datos de 2008 de los diferentes tipos de cáncer. **A)** Globalmente, para ambos sexos. **B)** En México, para ambos sexos. **C)** Globalmente, para hombres. **D)** En México, para hombres. (Modificada de GLOBOCAN, 2008)

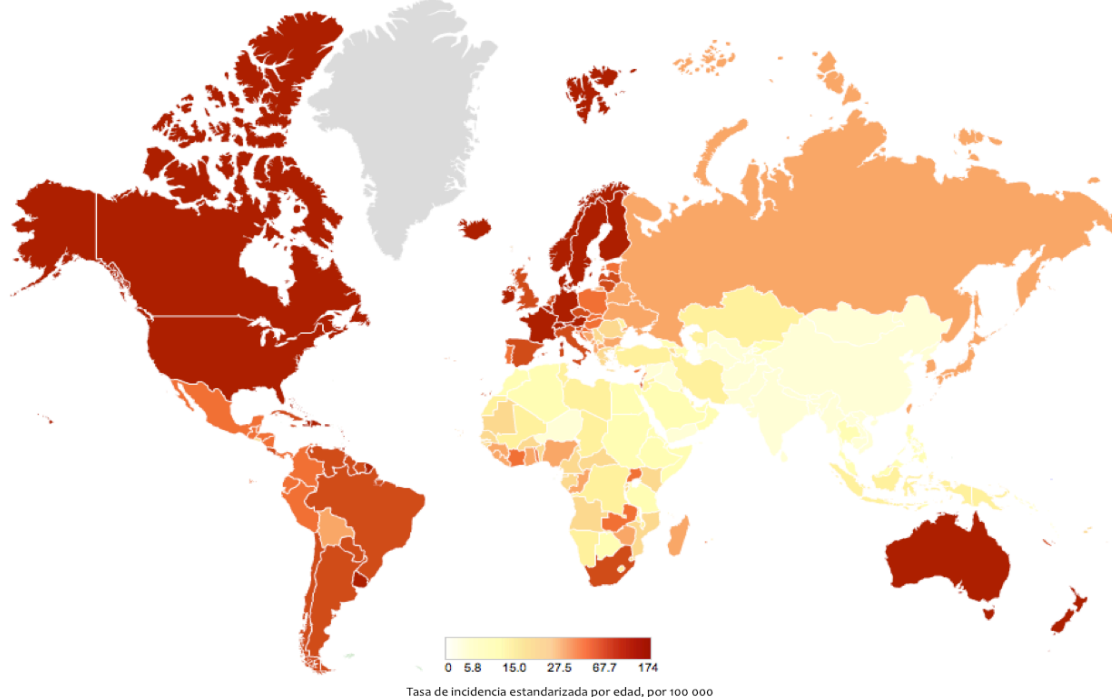
Incidencia mundial estimada de Cáncer de Próstata en 2008

Figura 5. Incidencia mundial de cáncer de próstata. Se observa una mayor prevalencia en Australia, Norteamérica y Europa Occidental y del Norte y una menor prevalencia en el Centro-Sur de Asia (IARC, 2010).

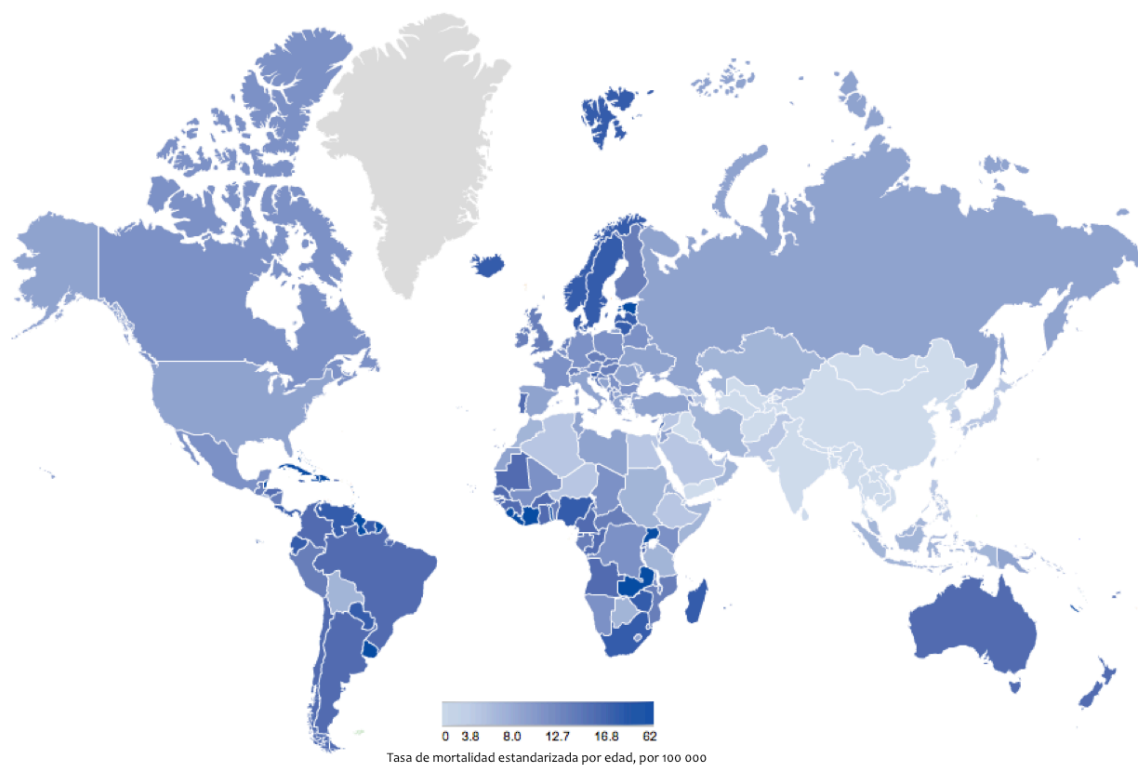
Mortalidad mundial estimada de Cáncer de Próstata en 2008

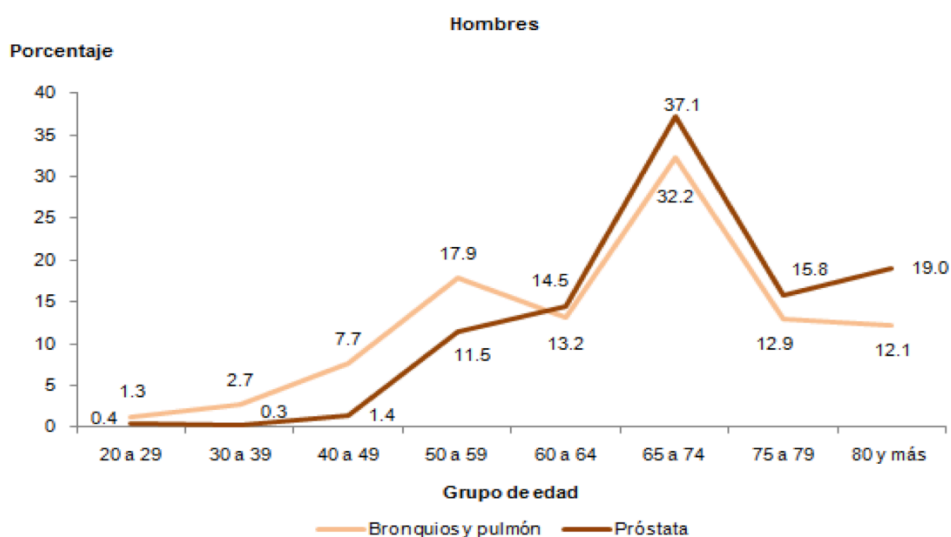
Figura 6. Mortalidad mundial de cáncer de próstata. Se observa una mayor tasa de mortalidad en África y una muy baja tasa en el Centro-Sur de Asia (IARC, 2010).

1.4.2 Prevalencia en México

Las estadísticas más recientes en México señalan que, durante 2010, los principales tumores malignos que afectan a varones adultos se concentran en cáncer de próstata (7.9%), bronquios y pulmón (4.9%) y colon (4.6%). En 2011, en hombres con cáncer mayores de 20 años, 8 de cada 100 presentan neoplasia de próstata y, de cada 100 defunciones por tumores malignos, 17 son por cáncer de próstata, 13 de bronquios y pulmón y 9 de estómago (INEGI, 2013)

Entre los hombres adultos, la tasa más alta de morbilidad hospitalaria por CaP aumenta conforme avanza la edad (**Figura 7**) y se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres mueren por cáncer de mama (13.8%), cervicouterino (10.4%) y de estómago (7%). En tanto que los hombres fallecen por cáncer de próstata (16.9%), de bronquios y pulmón (12.8%) y de estómago (8.6%) (**Figura 8**) (INEGI, 2013).

Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por tumores malignos seleccionados según grupo de edad 2010

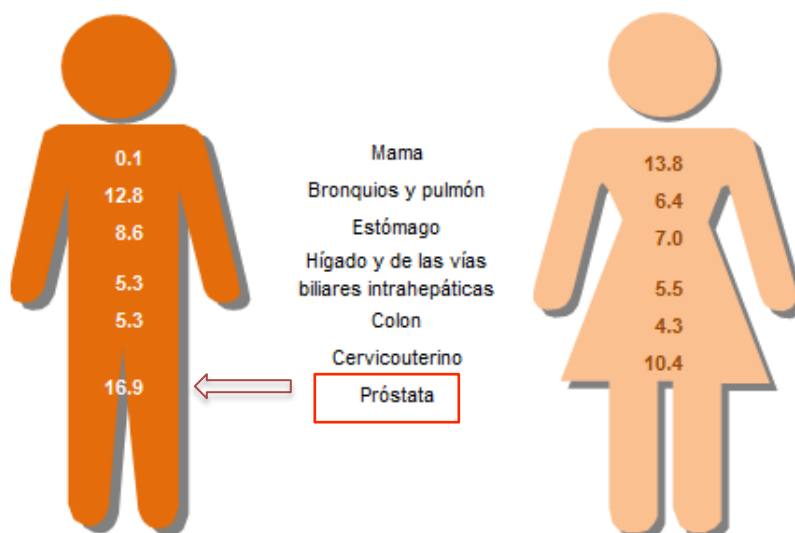


Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C34, C50, C53 y C61.

Fuente: SSA (2011). Base de egresos hospitalarios 2010. Procesó INEGI.

Figura 7. Distribución por edades de morbilidad para cáncer de bronquios y pulmón, y de próstata. Ambos tipos de cáncer afectan principalmente a la población de 65 a 74 años (Modificada de INEGI, 2012).

**Porcentaje de defunciones en población de 20 años y más,
por principales tumores malignos según sexo
2011**



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C16, C18, C22, C34, C50, C53 y C61.
Fuente: INEGI (2012). *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos*. Procesó INEGI.

Figura 8. Porcentajes de defunciones por tipo de cáncer para cada sexo. En hombres el mayor porcentaje de defunciones se debe a cáncer de próstata y, en mujeres, a cáncer de mama (Modificada de INEGI, 2012).

1.4.3 Diagnóstico

Los signos clínicos que se presentan al inicio de la enfermedad están asociados a problemas urinarios como dificultad al orinar, vaciamiento incompleto de vejiga, nocturia, entre otros, por lo que se recurre a un urólogo.

Para establecer el diagnóstico, las pruebas que se emplean son: cuantificación en suero del APE, examinación por ultrasonido y tacto rectal, y biopsias de la próstata que son evaluadas por un patólogo para determinar finalmente el diagnóstico positivo o negativo de cáncer (Padilla-Rodríguez, 2008; Passoni *et al.*, 2012). Desafortunadamente, cerca de 15% de los pacientes poseen lesiones metastásicas al momento del diagnóstico (Knudsen y Kelly, 2011). El APE sérico también se usa para monitorear el éxito y la respuesta de a terapia, así como de la recurrencia distante o local después de los tratamientos o el surgimiento de un fenotipo referido como CaP independiente de andrógenos (AI) (**Figura 9**) (Dehm y Tindall, 2007).

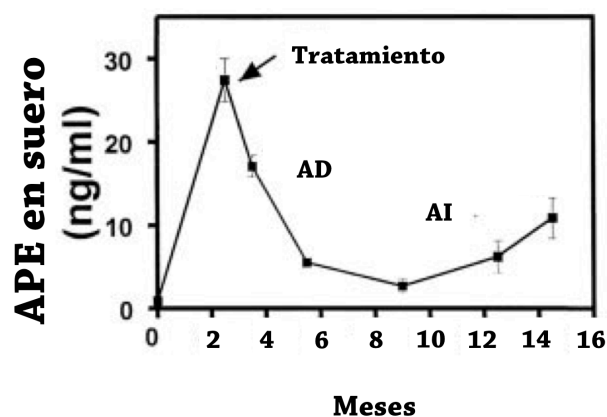


Figura 9. Progresión clínica del cáncer de próstata. Tras el tratamiento con bloqueo androgénico, los valores del APE descienden reflejando una respuesta positiva al tratamiento durante la etapa dependiente de andrógenos (AD). Sin embargo, tras 12-18 meses hay un aumento en los niveles de APE lo que se traduce como una resistencia a la terapia y el desarrollo de un fenotipo independiente de andrógenos (Modificada de Sadar *et al.*, 2002).

En México, los valores por arriba de 4.0 ng/mL de APE se consideran anormales, aunque falsos positivos pueden ser causados por HBP, prostatitis o cistitis, eyaculación, trauma perineal, etc. Por otro lado, un valor normal de APE no descarta CaP. Los valores elevados de APE conllevan a biopsias, que pueden causar sangrado, hematuria, dolor e infección que pueden resultar estresantes para el paciente. Estudios matemáticos estiman que de 23-42% de los diagnósticos de pacientes con APE elevado están sobreestimados. De igual manera, el uso de tratamientos agresivos hacia estos tumores se asocia con riesgos innecesarios de disfunción urinaria o sexual que pueden afectar la calidad de vida del paciente (Hoffman, 2011).

Actualmente, el grado Gleason es uno de los factores pronósticos más importantes de agresividad. Éste se basa en características celulares morfológicas y se establece al momento de analizar la biopsia y tiene un rango de 2 hasta 10, siendo este último un tumor de alta agresividad y peor pronóstico (Padilla-Rodríguez, 2008). Sin embargo, es necesario contar con más marcadores que puedan identificar grupos de alto riesgo, mejorar el diagnóstico y evitar tratamientos agresivos en quienes no los necesitan. Hoy en día están siendo evaluados diferentes biomarcadores que evalúan la expresión génica y/o alteraciones en algunos mecanismos epigenéticos, principalmente en la metilación del DNA (Hoffman, 2011).

1.4.4 Factores de riesgo

Los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo del CaP son: (1) edad avanzada; (2) historia familiar positiva, el riesgo es dos veces mayor en pacientes con un familiar en primer grado con diagnóstico de CaP (Hoffman, 2011); (3) la etnia y variaciones geográficas, los grupos étnicos chinos y japoneses que emigran al oeste adquieren mayor riesgo de CaP, lo que apoya el efecto ambiental en el desarrollo del CaP; y (4) la dieta, estudios epidemiológicos revelan un vínculo entre el CaP y el consumo de carnes rojas y grasas animales. Un mecanismo por el cual el consumo de carnes puede estimular el desarrollo de CaP podría estar relacionado con la formación de aminas heterocíclicas, las cuales producen carcinomas en ratas (De Marzo *et al.*, 2007).

1.4.5 Tratamiento

Los tumores detectados tempranamente usualmente se encuentran localizados y confinados en la próstata y son potencialmente curables con prostatectomía radical y/o radiación (Feldman y Feldman, 2001; Wu y Ho, 2004; Devlin y Mudryj, 2009).

El crecimiento del cáncer de próstata depende de la proporción entre células proliferando y células muriendo. Los andrógenos son los principales reguladores de esta proporción estimulando la proliferación e inhibiendo la apoptosis, por lo que el CaP depende de un nivel crucial de estimulación androgénica y de la activación del AR para su crecimiento y supervivencia. El bloqueo de andrógenos causa una regresión del cáncer porque sin andrógenos la tasa de proliferación celular es más baja y la tasa de muerte celular aumenta, llevando a la extinción de estas células (Craft *et al.*, 1999; Feldman y Feldman, 2001; Knudsen y Kelly, 2011). Esta fase inicial se denomina dependiente de andrógenos (AD).

En casos de enfermedad localmente avanzada o metastásica, la terapia de bloqueo de andrógenos resulta en una estabilización inicial o regresión de la enfermedad en aproximadamente 80% de los pacientes. El bloqueo de andrógenos puede ser por castración quirúrgica (orquidectomía) o médica (análogos de la LHRH o antagonistas del AR) (Dehm y Tindall, 2007). Sin embargo, en los siguientes 12-18 meses, casi todos los tumores se vuelven resistentes a la terapia, progresan rápidamente y producen

metástasis. En esta etapa se denominan independientes de andrógenos (AI) y producen la muerte en 16-24 meses, ya que aún no hay tratamientos efectivos (Craft *et al.*, 1999; Pienta y Bradley, 2006; Niu *et al.*, 2008; Attar *et al.*, 2009; Devlin y Mudryj, 2009). Los cambios moleculares en las células tumorales que producen esta resistencia al tratamiento son poco entendidos, por lo que el comprender los mecanismos moleculares implicados en la progresión hacia la etapa AI ha sido un objetivo importante en la investigación sobre el CaP y un primer paso hacia el desarrollo de terapias para esta forma letal del cáncer (Tilley *et al.*, 1996; Gingrich *et al.*, 1997; Feldman y Feldman, 2001; Wu y Ho, 2004).

1.4.6 Mecanismos de progresión hacia la independencia de andrógenos

Hay diversas hipótesis que intentan explicar la progresión de una etapa inicial AD hacia la etapa AI. Análisis inmunohistoquímicos demuestran que la mayoría de los tumores AI siguen expresando el AR y el APE (Tilley *et al.*, 1996; Dehm y Tindall, 2007; Devlin y Mudryj, 2009). A nivel molecular, esta progresión hacia la etapa AI se ha asociado con: (1) mutaciones en el AR, principalmente en el LBD, que pueden conducir a una alteración en la sensibilidad a andrógenos, provocando su activación por otros ligandos esteroideos o por antagonistas; (2) sobreexpresión o amplificación del AR, el cual es uno de los eventos más comunes asociados con el crecimiento AI y puede causar que incluso niveles bajos de andrógenos puedan producir efecto; (3) activación de vías de señalización intracelulares que activan el AR en ausencia de ligando, que pueden ser neuropéptidos, citocinas o factores de crecimiento; (4) aumento local de la producción de andrógenos por las células de CaP; (5) expresión alterada en los niveles de correguladores del AR; (6) procesamiento proteolítico o por variantes de corte y empalme del AR que producen una molécula trunca que mantiene el DBD pero cuyo LBD ha sido removido, generando una molécula constitutivamente activa que funciona de manera AI; (7) mecanismos independientes del AR que faciliten la proliferación e inhiban la apoptosis; (8) o por la proliferación de una subclona de células tumorales AI preexistentes en una fase temprana o por selección o adaptación causada por los bajos niveles de andrógenos (**Figura 10**) (Tilley *et al.*, 1996; Craft *et al.*, 1999; Feldman y Feldman, 2001; Pienta y Bradley, 2006; Dehm y Tindall, 2007; Niu *et al.*, 2008; Attar *et al.*, 2009; Devlin y Mudryj, 2009; Knudsen y Kelly, 2011; Gravina *et al.*, 2011; Parray *et al.*, 2012; Tamburrino *et al.*, 2012; Green *et al.*, 2012).

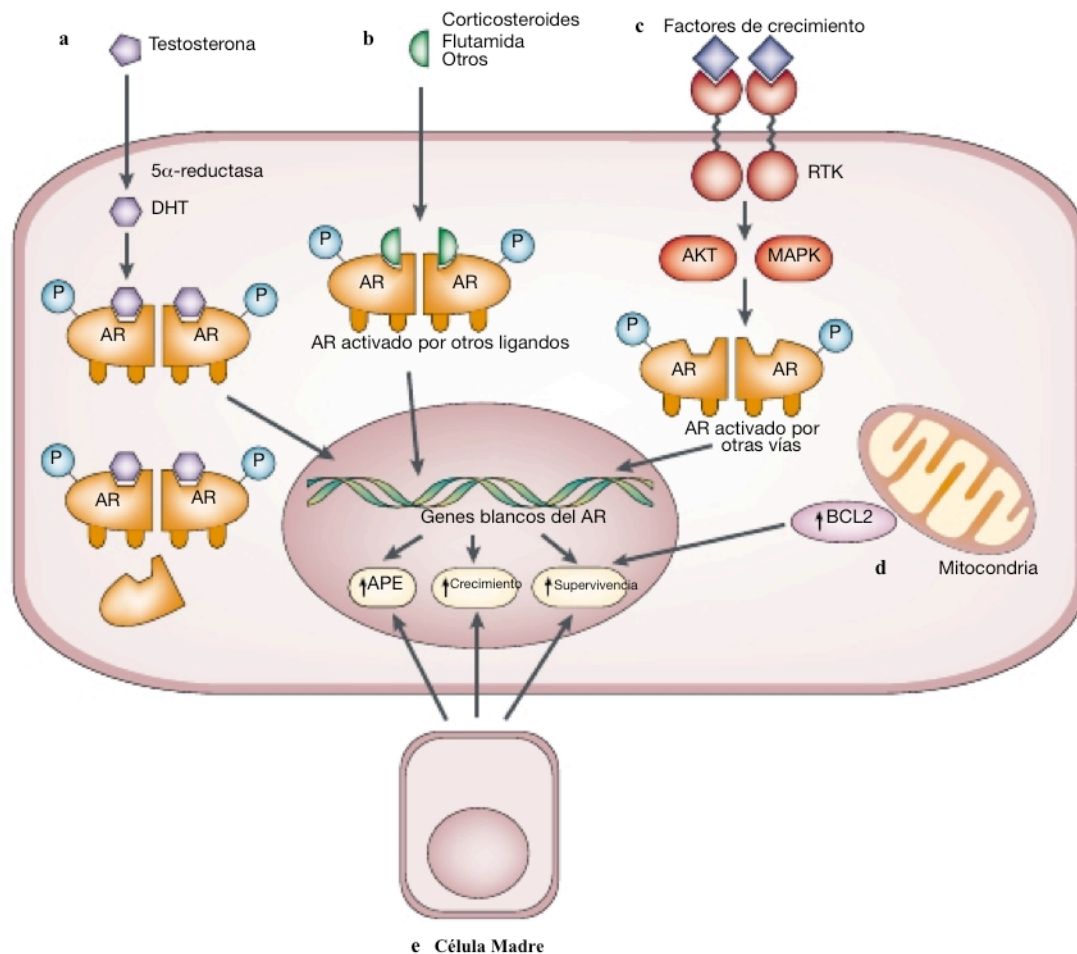


Figura 10. Algunos mecanismos involucrados en la independencia de andrógenos. (a) Se produce más AR generalmente por amplificación del gen, o hay una mayor sensibilidad para compensar los bajos niveles de andrógenos, o una mayor cantidad de testosterona es convertida a DHT. (b) La especificidad del AR se ve ampliada usualmente por mutaciones en el LBD, por lo que puede activarse por moléculas no androgénicas presentes en circulación. (c) Diferentes vías de señalización activadas por factores de crecimiento o citocinas son activadas, lo que conlleva a la fosforilación y activación del AR independiente de ligando ya sea por AKT (proteína cinasa B) o por MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos). (d) Vías paralelas de supervivencia, como las que involucran a la molécula antiapoptótica BCL2 omiten la necesidad del AR. (e) Células de cáncer AI, posiblemente células madre epiteliales, que se encuentran presentes pueden ser seleccionadas por el tratamiento (Modificado de Feldman y Feldman, 2001).

Las modificaciones genéticas son un factor crucial en la progresión del tumor, y el desarrollo del CaP AI no es la excepción. Es posible que, como muchos tipos de cáncer, sean seleccionadas células con cambios genéticos que aumenten la probabilidad de mutaciones subsecuentes. Una prueba de esto es el hecho de que la enzima detoxificante de fase II glutatión S-transferasa P (GSTP1) se expresa en el

epitelio prostático normal, donde cataliza la destoxificación intracelular de compuestos electrofílicos, incluyendo carcinógenos, pero no se expresa en más de 90% de los casos de CaP debido a la hipermetilación del DNA de su promotor, favoreciendo de esta manera el efecto de compuestos carcinogénicos. Un aumento general en la tasa de mutaciones incrementaría entonces la probabilidad de que una célula desarrolle mutaciones consecuentes que, eventualmente, permitan que la célula de CaP crezca independientemente de andrógenos (Feldman y Feldman, 2001). Se cree que ésta es una de las alteraciones genómicas más tempranas y comunes observadas en CaP.

Como en otros tipos de cáncer, el CaP se desarrolla a través de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos, además de la inestabilidad genómica que puede facilitar la progresión tumoral (De Marzo *et al.*, 2007). La iniciación y progresión del tumor se entienden como procesos que involucran la adquisición de alteraciones genéticas como rearrreglos, pérdidas o duplicaciones de regiones cromosómicas y la activación de oncogenes por mutaciones o la inactivación de genes supresores de tumor. Sin embargo, evidencia reciente indica que los eventos epigenéticos, son de igual importancia en la evolución del cáncer (Wu y Ho, 2004).

1.5 EPIGENÉTICA

En un organismo multicelular, las diferentes células que lo componen son genótipicamente idénticas y, sin embargo, muestran diferentes fenotipos debido a diferencias en los patrones de expresión génica que producen sus proteínas características (Rakyan *et al.*, 2001; Bird, 2002). Estas diferencias se deben al control de la expresión mediante mecanismos epigenéticos, que pueden ser entendidos como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando genes funcionales (Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004).

El término “Epigenética” fue propuesto en 1942 por C.H. Waddington como “las interacciones causales entre los genes y sus productos, los cuales dan lugar al fenotipo.” Esta definición ha evolucionado con el tiempo y actualmente se puede definir como “el estudio y establecimiento de los cambios heredables de manera estable en la expresión génica y en la organización de la cromatina que ocurren independientemente

de cambios en la secuencia del DNA” (Berger *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Tsai y Baylin, 2011). Esta heredabilidad de los patrones de expresión es mediada por modificaciones epigenéticas, que incluyen la metilación del DNA, modificaciones post traduccionales de las histonas, algunos RNA no codificantes y el posicionamiento de los nucleosomas a lo largo del DNA (**Figura 11**). Estas modificaciones, llamadas en conjunto epigenoma, comprenden un perfil específico en cada tejido y proveen un mecanismo para la diversidad celular regulando la información para el mantenimiento de la identidad celular durante la vida de un organismo (Herceg y Vaissière, 2011).

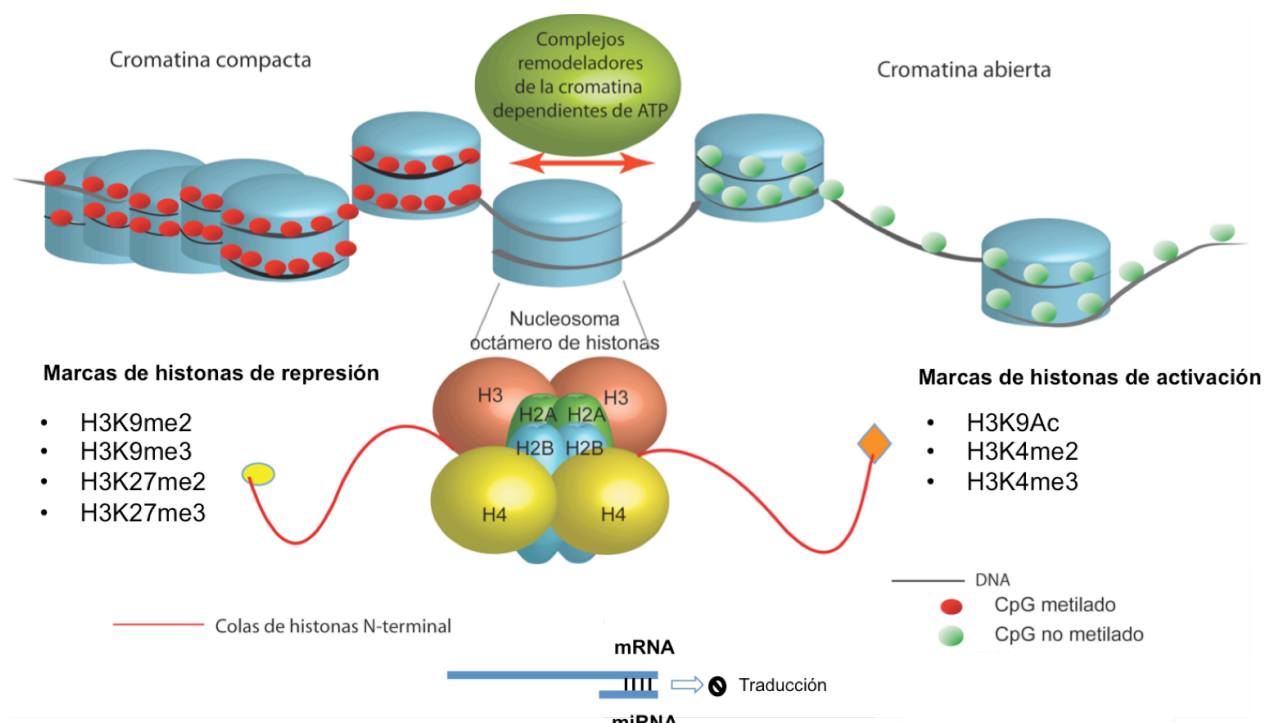


Figura 11. Mecanismos de regulación epigenética. Se ilustran diferentes mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica y la estructura de la cromatina, como: la metilación del DNA, modificaciones post traduccionales de histonas, posicionamiento de nucleosomas y RNA no codificantes.

La comprensión de los mecanismos involucrados en la iniciación, mantenimiento, interpretación y heredabilidad de los estados epigenéticos es un aspecto importante de la investigación en la biología actual (Berger *et al.*, 2009). La dieta y exposición ambiental también pueden alterar el nivel y alcance de la regulación epigenética, por lo que se buscan explicar las correlaciones que se han encontrado entre el estilo de vida y el riesgo a padecer una enfermedad (Hamilton, 2011).

Para regular la información genética, el DNA genómico en el núcleo de la célula eucariota debe estar sistemáticamente empaquetado y organizado, función que provee la cromatina. La unidad repetitiva básica de la cromatina son los nucleosomas, cada uno de los cuales consiste en DNA alrededor de un octámero de histonas (Brait y Sidransky, 2011) (**Figura 11**). Tal condensación proporciona un obstáculo a la maquinaria nuclear que lleva a cabo procesos como la replicación, transcripción o reparación del DNA. Sin embargo, la conformación de la cromatina puede cambiar dinámicamente permitiendo descondensación localizada que facilite el progreso de dicha maquinaria. La cromatina puede ser: heterocromatina, un estado condensado y transcripcionalmente inerte; o eucromatina, que contiene menos regiones condensadas de DNA y es asociada con actividad transcripcional. La mayor parte de la cromatina existe en forma de heterocromatina, aunque el contenido global de ambas puede variar entre diferentes tipos celulares y entre diferentes momentos del desarrollo y ciclo celular. La naturaleza dinámica de la estructura de la cromatina es posible por modificaciones epigenéticas (Rakyan *et al.*, 2001).

1.6 MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

1.6.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es un mecanismo de regulación epigenética que involucra la transferencia enzimática de un grupo metilo (-CH₃) al anillo de pirimidina de la citosina, principalmente en el contexto de dinucleótidos CpG, aunque también ocurre en otros contextos (Herceg y Vaissière, 2011). En el genoma de mamíferos, el dinucleótido CpG no está distribuido de manera uniforme y se encuentra altamente subrepresentado debido al elevado ritmo de desaminación espontánea de la 5-metilcitosina (5meC) convirtiéndose en timina (Rakyan *et al.*, 2001; Albany *et al.*, 2011; Tsai y Baylin, 2011). Por lo tanto, se le encuentra en tan sólo 1% del genoma humano, por debajo de la fracción estadística esperada de 6% que correspondería de acuerdo al porcentaje de GC en el genoma que es de 42% (Majumdar *et al.*, 2011; Brait y Sidransky, 2011).

1.6.1.1 Islas CpG

Una isla CpG se define como una región que abarca de 0.2 kb a 5 kb, que posee un contenido de GC de al menos 50%, y un cociente de la frecuencia de los CpG observados entre los esperados de 0.6 o mayor (Rakyan *et al.*, 2001; Portela y Esteller, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Brait y Sidransky, 2011; Chin *et al.*, 2011; Albany *et al.*, 2011). Las islas CpG se encuentran generalmente en las regiones regulatorias 5' de genes y su presencia, estado de metilación, y contenido de CpG permite predecir el potencial de transcripción del gen (**Figura 12**) (Chin *et al.*, 2011). A grandes rasgos, cuando una isla CpG se encuentra metilada significa que hay una actividad transcripcional reprimida, mientras que una isla CpG desmetilada implica una mayor actividad transcripcional. Los patrones de metilación del DNA proveen instrucciones para dirigir funciones celulares o promover la expresión específica de cada tejido y controlar el crecimiento y la proliferación (Putiri y Robertson, 2010; Pelizzola y Ecker, 2011).

1.6.1.2 Distribución genómica de la metilación del DNA.

De los CpG presentes, aproximadamente 70-80% están metilados y se encuentran en el cuerpo de los genes o en elementos repetitivos no codificantes donde la metilación es necesaria para prevenir la reactivación de secuencias endoparásitas que pueden causar inestabilidad cromosómica, traslocaciones o rupturas de genes (Portela y Esteller, 2010). La mayoría de los CpG no metilados (85-90%) se encuentran en islas CpG de cerca de 60% de genes constitutivos y específicos de cada tejido. Por lo tanto, las islas CpG en regiones promotoras se encuentran en su mayoría desmetiladas, mientras que en regiones intrónicas y los CpG en secuencias repetitivas están altamente metilados (Sharma *et al.*, 2010; Majumdar *et al.*, 2011; Hamilton, 2011; Brait y Sidransky, 2011).

La metilación del DNA que ocurre a lo largo del cuerpo del gen es común en genes que se expresan de manera ubicua y está correlacionada positivamente con la expresión (**Figura 12**). Se ha propuesto que este mecanismo puede estar relacionado con la eficiencia de la elongación durante la transcripción y con la prevención de iniciadores espurios transcripcionales (Portela y Esteller, 2010; Brait y Sidransky, 2011; Pelizzola y Ecker, 2011). Además, el estado de metilación del DNA regula el proceso de corte y

empalme (Jones, 2012; Malousi y Kouidou, 2012). Lo anterior demuestra que el significado de esta marca en el DNA es complejo y su interpretación dependiente del contexto (Pelizzola y Ecker, 2011).

En el mantenimiento y delimitación de regiones libres de metilación del DNA, como en promotores, la proteína CTCF (*CCCTC-binding factor*) juega un papel importante. CTCF es una proteína nuclear que contiene 11 dedos de zinc que se expresa ampliamente y que se une a secuencias de DNA diversas e inusualmente largas (≈ 50 pb) mediante diversas combinaciones de sus dedos de zinc. Una de las funciones de CTCF es la prevención de la propagación de la metilación del DNA hacia zonas desmetiladas. Ha sido demostrado que cuando CTCF no se une a su motivo de reconocimiento en el promotor humano del gen *RB* se produce un aumento en la metilación del DNA sobre el promotor. Esta falla en la unión de CTCF al DNA, que impide que realice su función, se puede deber a mutaciones o a la metilación del DNA en la secuencia a la que reconoce. Esto sugiere que CTCF previene la propagación de la metilación del DNA y por lo tanto protege de silenciamiento epigenético a promotores cercanos (Filippova, 2008; Dávalos-Salas *et al.*, 2011).

1.6.1.3 Regiones a las orillas de las islas CpG

La regulación génica también puede ser regulada por la metilación del DNA en regiones que se encuentran a cientos de pares de bases lejos de las islas clásicas CpG y/o de los sitios de inicio de la transcripción. El término “*shore*” de las islas CpG, o regiones a las orillas o a los extremos de las islas CpG, se refiere a regiones de una densidad menor de CpG que se encuentran aproximadamente a 2 kb de las islas CpG. La metilación de estas regiones está asociada con la inactivación transcripcional (**Figura 12**) (Irizarry *et al.*, 2009). Gran parte de la metilación del DNA específica de cada tejido parece no ocurrir en islas CpG sino en estos extremos (Portela y Esteller, 2010). Aún no se entiende el mecanismo por el cual estas regiones regulan la expresión, pero una posibilidad es que la metilación del DNA en esta región controle la actividad de potenciadores de la transcripción modulando así la expresión génica (Pelizzola y Ecker, 2011).

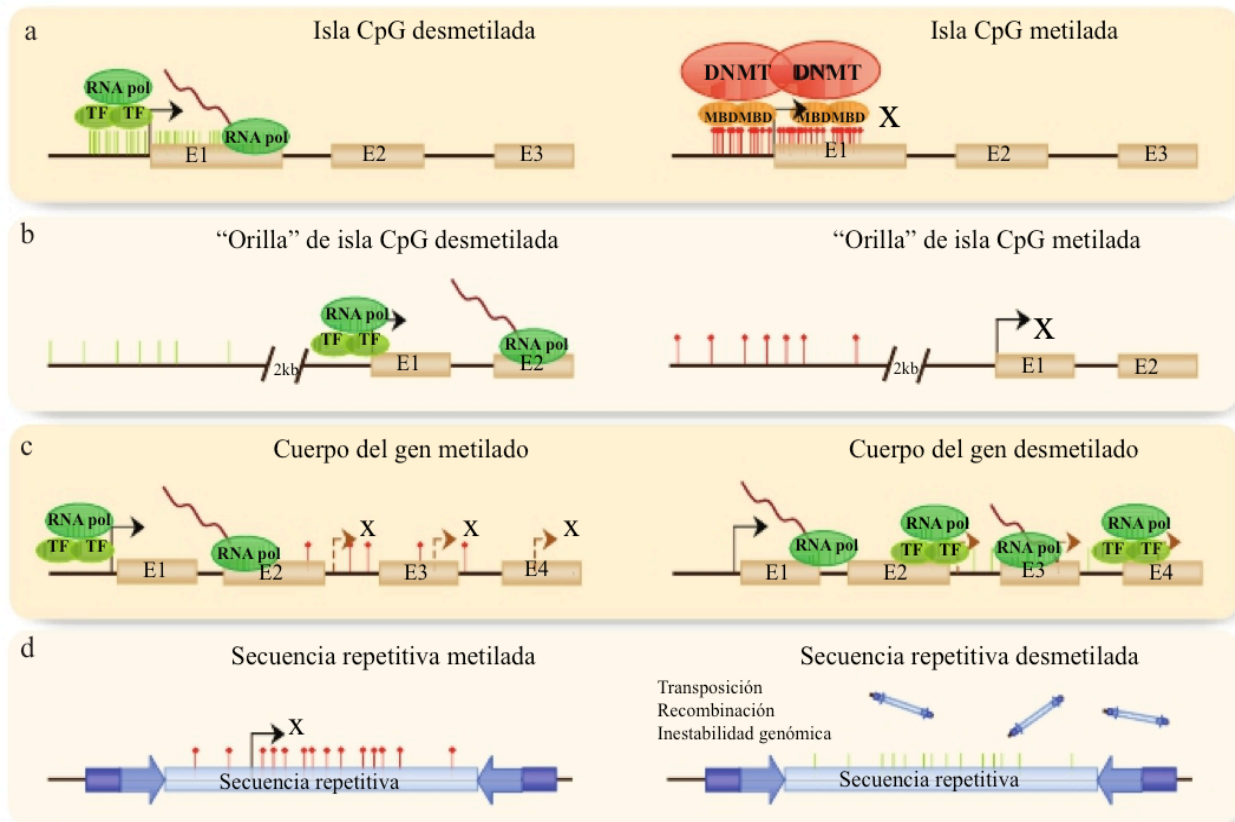


Figura 12. Patrones de metilación del DNA. La metilación del DNA puede ocurrir en diferentes regiones del genoma. La modificación de estos patrones conlleva a un estado alterado en las células. Los casos mostrados a la izquierda son casos normales y las alteraciones se muestran a la derecha. Las líneas delgadas verticales representan un dinucleótido CpG. Cuando la línea contiene un círculo el CpG se encuentra metilado y cuando no, se encuentra desmetilado. **(a)** Las islas CpG en promotores de genes se encuentran normalmente desmetiladas, permitiendo la transcripción. La hipermetilación aberrante conlleva a inactivación transcripcional. **(b)** El mismo patrón se observa en las orillas de las islas, que se localizan a 2kb río arriba de la isla CpG. **(c)** Cuando la metilación ocurre en el cuerpo del gen, se facilita la transcripción y previene iniciaciones de la transcripción espurias. En estados alterados, el cuerpo del gen se tiende a desmetilar permitiendo que la transcripción inicie en varios sitios incorrectos. **(d)** Las secuencias repetitivas tienen a estar hipermetiladas, previniendo inestabilidad cromosómica, traslocaciones y rupturas de genes por la reactivación de secuencias endoparásitas, lo cual ocurre cuando este patrón se encuentra alterado (Modificado de Portela y Esteller, 2010).

1.6.1.4 Funciones de la metilación del DNA

La metilación del DNA provee un mecanismo estable de silenciamiento genético y es considerada una marca represiva de la transcripción que regula la expresión génica y la

arquitectura de la cromatina, en asociación con modificaciones de histonas y otras proteínas asociadas a la cromatina (Sharma *et al.*, 2010). Es un proceso epigenético reversible y heredable, involucrado también en diversos procesos biológicos (Majumdar *et al.*, 2011) como en el mantenimiento de la conformación e integridad de los cromosomas y en mecanismos de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles potencialmente dañinos. La inactivación del cromosoma X y la impronta genómica son también ejemplos de silenciamiento transcripcional por metilación del DNA (Herceg y Vaissière, 2011).

1.6.1.5 Mecanismos de regulación génica por metilación del DNA

Hay dos mecanismos por los cuales la metilación del DNA puede regular la expresión génica. En primer lugar, la metilación de los CpG en sitios de unión de factores de transcripción puede inhibir esta unión y, por lo tanto, influir directamente en la actividad génica ya que algunos de éstos son sensibles a metilación (Pelizzola y Ecker, 2011). En segundo lugar, los CpG metilados actúan como sitios de unión para proteínas de unión a CpG metilados (MBD, por sus siglas en inglés), como MBD1, MBD2, MBD3 y MECP2, que están asociadas con complejos represivos de la transcripción y otros factores como las desacetilasas de histonas (HDAC), que promueven la condensación de la cromatina en conformaciones estables transcripcionalmente represivas (Rakyan *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2010; Putiri y Robertson, 2010; Chin *et al.*, 2011; Brait y Sidransky, 2011).

1.6.1.6 Enzimas encargadas de la metilación del DNA: DNMT

La metilación del DNA es catalizada por una familia de enzimas llamadas metiltransferasas de DNA (DNMT) que catalizan la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) a la citosina del dinucleótido CpG, de las cuales hay dos clases: las DNMT de mantenimiento y las *de novo*. Al primer grupo pertenece la DNMT1, involucrada en el mantenimiento de los patrones de metilación a lo largo de la mitosis. Después de la replicación semiconservativa del DNA, las moléculas hijas contienen un patrón hemimetilado de CpG, por el cual la DNMT1 tiene mayor preferencia y por lo cual es reconocido y convertido a un patrón totalmente metilado (**Figura 13**) (Rakyan *et al.*, 2001). Es la DNMT más abundante en la célula y se transcribe principalmente durante la fase S del ciclo celular. (Putiri y Robertson, 2010; Portela y Esteller, 2010; Brait y Sidransky, 2011; Herceg y Vaissière, 2011)

Las DNMT *de novo* son las DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, que establecen los nuevos patrones de metilación durante la embriogénesis y el desarrollo, metilando DNA independientemente de si el templado es hemimetilado o no (**Figura 13**) (Brait y Sidransky, 2011; Herceg y Vaissière, 2011). Se expresan en menor cantidad después de la diferenciación celular (Pelizzola y Ecker, 2011). La actividad de DNMT3A y DNMT3B es aumentada por la DNMT3L, una proteína catalíticamente inactiva con similitud en su secuencia con DNMT3A y DNMT3B, que interactúa y colocaliza con ellas en el núcleo (Putiri y Robertson, 2010; Majumdar *et al.*, 2011). Durante el desarrollo de los mamíferos, hay oleadas de desmetilación extensa del genoma en la fase de célula germinal primordial y en el embrión de preimplantación que son restablecidos por estas enzimas (Rakyan *et al.*, 2001).

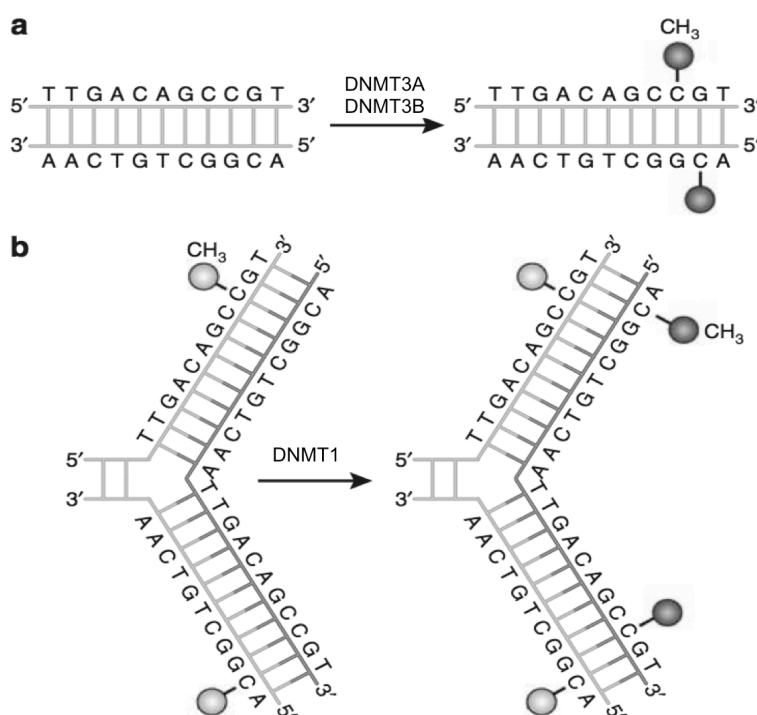


Figura 13. Mecanismos de metilación del DNA. Las DNMT catalizan la transferencia de un grupo metilo de la S-adenil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina para formar la 5-metilcitosina (5meC). (a) DNMT3A y DNMT3B son las DNMT *de novo* y transfieren grupos metilo (círculo oscuro) a DNA desmetilado. (b) DNMT1 es la DNMT de mantenimiento y conserva los patrones de metilación del DNA. Tras la replicación semiconservativa del DNA la cadena parental (cadena color claro) mantiene los patrones originales de metilación (círculo claro), DNMT1 se asocia al foco de replicación y copia precisamente el patrón original de metilación del DNA añadiendo grupos metilo (círculo oscuro) a la cadena hija (cadena oscura) (Modificada de Moore *et al.*, 2012).

1.6.1.7 Metilación no CpG

En diversos organismos eucariontes y en humanos la 5meC se puede encontrar también en otro contexto de secuencia, no sólo en CpG, sino que se le ha descubierto también en el contexto de CHH o CHG (siendo H: A, C o T), a lo que se le conoce como metilación no CpG. La metilación en estos sitios parece estar restringida a etapas de diferenciación celular y disminuye cuando la célula ya se encuentra diferenciada (Portela y Esteller, 2010). La metilación no CpG no está distribuida al azar en el genoma sino que se encuentra particularmente enriquecida en el cuerpo del gen, con niveles mayores en genes con actividad transcripcional mayor (Pelizzola y Ecker, 2011).

1.6.1.8 Desmetilación del DNA y la 5-hidroximetilcitosina

Hay dos mecanismos propuestos para la desmetilación del DNA: desmetilación pasiva y desmetilación activa. La desmetilación pasiva involucra la desmetilación a través de rondas de replicación del DNA tras la inactividad de las DNMT. La desmetilación activa puede involucrar a la maquinaria de reparación del DNA mediante la remoción de la base metilada eliminándola directamente, o a través de una serie de reacciones que finalizan con la inserción de una base desmetilada. Las enzimas de la familia TET pueden ser otro intermediario para la desmetilación del DNA ya que TET1 es capaz de oxidar 5meC para producir 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (Herceg y Vaissière, 2011). La presencia de la 5hmC se ha descrito recientemente, ya que los métodos de conversión con bisulfito no son capaces de relevarla. La 5hmC no es reconocida por la DNMT1 y puede ser convertida nuevamente a citosina (Pelizzola y Ecker, 2011). Esta base se ha observado en bajo porcentaje (menor a 1%) y se ha detectado en cerebro y en células madre embrionarias y, aunque en cantidades muy bajas, en células de cáncer (Song y He, 2011)

1.6.1.9 Determinación de los perfiles de metilación del DNA

El método utilizado para determinar los niveles de metilación del DNA requiere una conversión inicial del DNA con bisulfito de sodio, que convierte las citosinas no metiladas en uracilos, pero las citosinas metiladas no sufren ningún cambio. La secuenciación del DNA se realiza con el DNA tratado, previa amplificación por PCR donde el uracilo es reemplazado por timina, para determinar regiones específicas de hiper- o hipometilación. La clonación y la secuenciación de los fragmentos de DNA

permiten la identificación de las citosinas metiladas (Majumdar *et al.*, 2011). Sin embargo, una limitante en las tecnologías basadas en PCR es que van dirigidas específicamente hacia regiones predeterminadas de genes candidatos (Hamilton, 2011).

1.6.2 Modificación de Histonas

Hay cinco tipos de histonas: H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4. El nucleosoma está compuesto de un octámero formado por dos copias de cada una de las cuatro histonas (H3, H4, H2A y H2B). Alrededor de cada nucleosoma hay 147 pares de bases del DNA (**Figura 11**) que le da vuelta 1.65 veces y entre nucleosomas hay 10-90 pares de bases, ocupados por una sola copia de una histona de unión o H1 (Portela y Esteller, 2010; Brait y Sidransky, 2011). Las histonas contienen un dominio globular en el extremo C-terminal y una cola que sobresale de su núcleo en el extremo N-terminal. Las modificaciones de las histonas que se producen en este extremo trabajan modificando la accesibilidad de la maquinaria nuclear a la cromatina (Putiri y Robertson, 2010) y se reconocen como reguladoras dinámicas de la actividad génica que pueden sufrir diversas modificaciones químicas post traduccionales como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, o ribosilación de distintos aminoácidos, resultando en la activación o la supresión de la expresión génica (Majumdar *et al.*, 2011; Hamilton, 2011; Albany *et al.*, 2011). Aún no se comprenden los mecanismos involucrados en la heredabilidad del código de las histonas (Brait y Sidransky, 2011).

La acetilación de los residuos de lisina en las histonas H3 y H4 (H3Ac y H4Ac) está en general asociada con actividad transcripcional, mientras que la metilación de histonas está asociada con la activación o represión transcripcional dependiendo del sitio de modificación y del número de grupos metilo agregados. Por ejemplo, la di- y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) está asociada con activación transcripcional, mientras que la dimetilación y trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) y de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27) está generalmente asociada con la represión transcripcional (**Figura 11**) (Rakyan *et al.*, 2001; Putiri y Robertson, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Portela y Esteller, 2010; Chin *et al.*, 2011; Albany *et al.*, 2011; Tsai y Baylin, 2011; Brait y Sidransky, 2011).

La combinación de estas modificaciones es altamente dinámica y capaz de cambiar rápidamente dependiendo de la respuesta celular a señales célula-célula o a señales ambientales (Putiri y Robertson, 2010)

Las enzimas que controlan el balance de las modificaciones covalentes a las histonas son las acetiltransferasas de histonas (HAT) y las HDAC, así como las metiltransferasas de histonas (HMT) y desmetiladas de histonas (HDM) (Jeltsch, 2002; Sharma *et al.*, 2010; Majumdar *et al.*, 2011; Brait y Sidransky, 2011). La acetilación de los residuos de lisina en las colas de las histonas desempaqueta la estructura de la cromatina, ya que esta modificación reduce la fuerza de unión entre las histonas y el DNA, abriendo el complejo y haciendo que el DNA sea accesible a los factores de transcripción, facilitando así la expresión génica (Majumdar *et al.*, 2011; Hamilton, 2011). Las HDAC interactúan con DNMT y también pueden ser reguladas por algunos miRNA, por lo que toda la maquinaria epigenética actúa en conjunto para asegurar la conformación de la cromatina y el nivel de accesibilidad a ésta (Brait y Sidransky, 2011).

Las modificaciones de las histonas son importantes para establecer las marcas de metilación del DNA. Las marcas de histonas de represión pueden ser establecidas independientemente de la metilación del DNA y son capaces, en algunos casos, de inducir la metilación *de novo* del DNA. Por otro lado, la metilación del DNA también puede dirigir el establecimiento de las marcas de las histonas de represión (Putiri y Robertson, 2010). Varias HMT pueden dirigir la metilación del DNA hacia ciertos blancos genómicos reclutando directamente a DNMT para silenciar genes establemente. Además de reclutar DNMT, las HMT y HDM también influyen en los niveles de metilación del DNA regulando la estabilidad de las DNMT que a la vez pueden reclutar HDAC y proteínas MBD para lograr el silenciamiento de genes y la condensación de la cromatina. Lo anterior demuestra que las interacciones entre la maquinaria de metilación del DNA y las enzimas modificadoras de histonas aumentan la complejidad de la regulación epigenética de la expresión génica, que determina y mantiene la identidad y la función celular (Sharma *et al.*, 2010).

1.6.3 miRNA

Los miRNA son RNA cortos endógenos y específicos de cada tejido, de cadena sencilla

y no codificantes, miden de 18 a 24 bases de longitud y son importantes reguladores de la expresión y controlan diversos procesos celulares como la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación. El miRNA se une a secuencias complementarias en los extremos 3' del mRNA. Realizan sus funciones afectando la estabilidad o la eficiencia de la traducción del mRNA blanco y pueden ser regulados por mecanismos epigenéticos y ellos mismos modular mecanismos de regulación genética. Cuando se une con complementariedad parcial funcionan como represores traduccionales, mientras que una complementariedad perfecta induce la degradación del mRNA blanco (Sharma *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2011)

1.6.4 Posicionamiento nucleosómico

Los nucleosomas regulan la expresión génica alterando el acceso de factores de transcripción a secuencias reguladoras en el DNA. Las regiones libres de nucleosomas (NFR, por sus siglas en inglés) se presentan en los extremos 5' y 3' de los genes y proveen los sitios para el ensamble y desensamble de la maquinaria de transcripción. La modulación de las NFR está orquestada por complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP que modifican el acceso a los sitios reguladores en el DNA ya sea deslizando el nucleosoma o expulsándolo. La interacción entre la maquinaria de remodelamiento de nucleosomas con la metilación del DNA y las modificaciones de histonas juega un papel importante en el establecimiento de los patrones globales de expresión y de arquitectura de la cromatina (Sharma *et al.*, 2010; Portela y Esteller 2010).

1.7 EPIGENÉTICA Y CÁNCER DE PRÓSTATA

El epigenoma del cáncer se caracteriza por cambios globales en los patrones de metilación del DNA y de las modificaciones de histonas, así como en perfiles alterados de expresión de enzimas que modifican la cromatina. Estos cambios resultan en una desregulación global de los perfiles de expresión génica llevando al desarrollo y progresión de los estados de enfermedad. Las alteraciones epigenéticas son de los primeros cambios identificados en los diferentes tipos de cáncer, son heredables y son seleccionadas en una población creciente al conferir ventajas de crecimiento a las células tumorales (Sharma *et al.*, 2010). Las alteraciones en la metilación

probablemente sean un proceso progresivo, en contraste con la repentina aparición de una mutación (Esteller, 2002).

El contenido de metilación del DNA y sus patrones alterados han demostrado ser un cambio epigenético temprano e importante asociado con la tumorigénesis. El epigenoma del cáncer, comparado con sus contrapartes normales, se caracteriza por hipermetilación específica en ciertos sitios de islas CpG en promotores y por hipometilación a lo largo del genoma (Wu y Ho, 2004; Li *et al.*, 2004; Gopalakrishnan *et al.*, 2008; Ehrlich, 2009; Sharma *et al.*, 2010)

La hipermetilación del DNA contribuye a la tumorigénesis por medio del silenciamiento de genes supresores de tumor. Esta alteración se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias, aunque los genes que son inactivados difieren cuando se comparan entre diferentes tipos de cáncer (Li *et al.*, 2004). Estos genes pueden estar involucrados en procesos celulares importantes para la iniciación, desarrollo, progresión y metástasis del cáncer y en ciertas vías como la reparación del DNA, el control del ciclo celular, adhesión celular, metabolismo de carcinógenos, resistencia a fármacos, regulación de vías de señalización, apoptosis y angiogénesis (Rakyan *et al.*, 2001; Esteller, 2002; Cheung, 2009; Portela y Esteller, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Tsai y Baylin, 2011). Las islas CpG en promotores generalmente se encuentran desmetiladas en células normales, pero se vuelven anormalmente hipermetiladas en células de cáncer, lo cual se asocia con silenciamiento transcripcional (Wu y Ho, 2004). Esta hipermetilación no sólo afecta la expresión de genes que codifican para proteínas, sino también la de varios RNA no codificantes, algunos de los cuales tienen un papel en la transformación maligna (Jones y Baylin, 2002; Barros y Offenbacher, 2009). Estudios del metiloma del DNA de genoma completo muestran también alteraciones en la metilación del DNA en el cuerpo de genes y en la orilla de las islas CpG (Portela y Esteller, 2010; Dawson y Kouzarides, 2012). Parece ser que la metilación en promotores no conlleva a una transcripción reprimida hasta que las proteínas de la cromatina son reclutadas hacia estas regiones. Algunas explicaciones de la propagación de la metilación *de novo* de islas CpG en cáncer pueden ser que: (1) la compartimentalización del genoma en eucromatina y heterocromatina, y en componentes metilados y desmetilados, se rompa durante la carcinogénesis para

permitir que ocurra la propagación de la heterocromatina (Jones y Baylin, 2002); (2) la metilación del DNA en cáncer se propaga a partir de centros de metilación normal que rodean la isla CpG desmetilada, como secuencias *Alu*; (3) ocurra una falla en la función de la proteína CTCF, que normalmente mantiene regiones libres de metilación del DNA. Aunado a esto, se sabe también que hay un aumento en la actividad de las DNMT. El hecho de que ciertas islas CpG se hipermetilen y otras no puede depender de si esto confiere una ventaja selectiva para la supervivencia de esa célula en particular (Esteller, 2002; Portela y Esteller, 2010) o de que la hipermetilación resulte de la selección de blancos aberrantes por parte de las DNMT y/o a que ciertas regiones posean ciertas características que los hacen mejores sustratos para una metilación del DNA *de novo* (McCabe *et al.*, 2009).

La hipometilación global del DNA es uno de los cambios más tempranos que se observa comúnmente en células malignas, comparada con células normales, y juega un papel importante en la tumorigénesis. Ocurre en secuencias repetitivas, retrotransposones, promotores de genes normalmente silenciados, DNA centromérico, intrones y cuerpos génicos, donde se encuentra la mayor parte de la 5meC; lo anterior conlleva a una inestabilidad genómica promoviendo rearrreglos cromosómicos y una descondensación de la cromatina en conformaciones que permiten la recombinación (Yegnasubramanian *et al.*, 2008). La hipometilación del DNA de retrotransposones puede resultar en su activación y traslocación a otras regiones genómicas aumentando la inestabilidad genómica. Otros mecanismos asociados son la pérdida de la impronta y la activación de oncogenes (Rakyan *et al.*, 2001; Gopalakrishnan *et al.*, 2008; McCabe *et al.*, 2009; Ehrlich, 2009; Cheung, 2009; Portela y Esteller, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Hamilton, 2011; Tsai y Baylin, 2011).

La naturaleza reversible de los cambios epigenéticos –a diferencia de los cambios genéticos que son irreversibles-, y en particular de los que ocurren en cáncer, ha llevado a la idea de desarrollar una *terapia epigenética*. La 5-aza-2'-deoxicitidina, un fármaco que lleva a la inhibición de la metilación del DNA, fue de los primeros fármacos en desarrollarse como agente quimioterapéutico, y se usa sobre todo en neoplasias hematológicas. Sin embargo, aún se encuentran en fases clínicas ya que por su falta de

especificidad pueden provocar efectos adversos (Ehrlich, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Esteller, 2011).

El hecho de que la metilación *de novo* de islas CpG ocurra en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis, de que puede ser detectada incluso en células aparentemente normales, y de que el perfil de hipermetilación de islas CpG varía de acuerdo a cada tipo de tumor, puede convertir a estas alteraciones en buenos marcadores para la evaluación del riesgo a padecer cáncer, detección temprana, pronóstico, estratificación y predicción de respuesta al tratamiento. Una ventaja sobre los marcadores genéticos es que las mutaciones pueden ocurrir en múltiples sitios y pueden ser de tipos diferentes, mientras que la hipermetilación de promotores ocurre dentro de las mismas regiones de un gen en cada forma de cáncer. Además, estas marcas son más estables que el RNA o proteínas. El uso de pequeños paneles de marcadores de hipermetilación puede llevar al desarrollo de poderosas estrategias moleculares para la detección de cáncer (Jones y Baylin, 2002; Esteller, 2002; Portela y Esteller, 2010), utilizando técnicas rápidas, fáciles y sensibles. También se pueden detectar promotores hipermetilados en DNA en suero y en diferentes fluidos con procedimientos poco o mínimamente invasivos (Esteller, 2002; Bastian *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Tsai y Baylin, 2011; Knudsen y Kelly, 2011; Esteller, 2011)

1.7.1 Alteraciones de la metilación del DNA en cáncer de próstata

Los cambios epigenéticos también juegan un papel crítico en la génesis y progresión del CaP. Varias secuencias reguladoras en islas CpG en promotores han sido identificadas como hipermetiladas en tumores de próstata, resultando en el silenciamiento de genes que codifican para proteínas que participan en procesos celulares críticos y/o que tienen actividad de supresores de tumores. Algunas vías que pueden ser silenciadas en este tipo de cáncer son: la reparación del DNA, respuestas hormonales, metástasis y control del ciclo celular. Lo anterior contribuye así a la invasividad y al surgimiento del fenotipo CaP AI. Algunos cambios en la metilación del DNA ocurren en etapas tempranas durante la progresión del tumor junto con múltiples procesos de la carcinogénesis de la próstata y pueden correlacionarse con el grado patológico o etapa clínica del CaP (Li *et al.*, 2004).

El primer estudio de hipermetilación de islas CpG en CaP encontró una hipermetilación significativa en el promotor del gen *GSTP1* en 90% de los tumores examinados (Nelson *et al.*, 2009) y que es casi exclusivamente observable en CaP (Esteller, 2011), sin que se observen estos cambios de metilación en epitelio normal prostático. Al evaluar también la metilación de otro gen que también se sabe que se hipermetila en CaP, el *APC*, la sensibilidad para detectar CaP es muy cercana al 100% (Cooper, 2009). Algunos genes también tienen un patrón de metilación del DNA alterado en HPB, otra patología de la próstata con características clínicas muy similares. En CaP, estos cambios también pueden correlacionarse con la progresión del tumor (Bastian *et al.*, 2004; Cooper, 2009).

La hipometilación del DNA generalizada también ocurre en CaP. Se observa debido a la metilación disminuida de las abundantes secuencias repetitivas que normalmente están metiladas, lo que se asocia con altas tasas de inestabilidad genómica (Albany *et al.*, 2011). Sin embargo, en CaP la reducción de la 5meC total es rara en cáncer primario pero frecuente en los metastásicos. Esto sugiere que en CaP la hipometilación ocurre tardíamente y es probable que no esté involucrada en la iniciación del CaP, sino en la formación y propagación de metástasis. De igual manera, se ha observado que la hipometilación no ocurre de manera homogénea a lo largo del genoma (Yegnasubramanian *et al.*, 2008)

Hay estudios con ensayos de alta resolución que analizan cambios estructurales y epigenéticos, sobre todo de metilación del DNA, en CaP AI. Estructuralmente, se observan amplificaciones del *AR* y deleciones de *PTEN*. En el contexto epigenético se observa que el CaP AI está ligeramente hipermetilado comparado con el tejido benigno. Esta hipermetilación ocurre en ciertos *loci* de CpG, dentro y fuera del contexto de islas CpG. Si el CaP AI está globalmente hipo- o hipermetilado comparado con tumores más tempranos no se estableció en este estudio (Friedlander *et al.*, 2012).

Wu y Ho en 2004, mediante la técnica de MSRF, que permite identificar zonas con metilación del DNA variable, identificaron que el promotor de PMP24 –una proteína de membrana peroxisomal- está diferencialmente metilado entre la línea celular LNCaP – dependiente de andrógenos- y LNCaP con un fenotipo AI, siendo la metilación del DNA

mayor en la línea AI y que se correlaciona con una expresión disminuida del gen. La transfección de PMP24 a LNCaP AI o a PC3 (que es independiente de andrógenos) causa una reducción en el crecimiento celular, apoyando el papel de la metilación del DNA del gen *PMP24* en la AI como un medio para obtener una ventaja de crecimiento.

Con el objetivo de encontrar nuevos genes cuyo estado de metilación del DNA fuera diferente entre las etapas AD y AI, Rodríguez-Dorantes *et al.* (artículo en preparación), utilizaron de igual manera la técnica de MSRF a partir de un modelo *in vivo* descrito por Sadar y colaboradores en 2002 para obtener muestras de células LNCaP y LNCaP AI. Dicho modelo consiste en el uso de fibrillas huecas que permite obtener células de CaP durante varias etapas de la progresión hacia la independencia de andrógenos insertadas en ratones macho que fueron castrados, con la ventaja de que no hay contaminación con las células del hospedero. Al analizar el DNA obtenido a partir de estas líneas celulares que crecieron dentro del ratón, se encontró que una de las regiones con hipermetilación del ADN en la etapa AI corresponde a parte del exón 2 del gen *VIAAT*, por lo que actualmente el interés reside en determinar si estos cambios en la metilación del DNA ocurren también en la región promotora de dicho gen y si hay una correlación con la expresión génica.

1.8 EL GEN *VIAAT* Y LA VÍA GABAÉRGICA

El gen *VIAAT* (*Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*) o *SLC32A1*, es el encargado de transportar neurotransmisores inhibitorios, ácido γ -aminobutírico (GABA) o glicina, a vesículas sinápticas en el sistema nervioso central (SNC) (**Figura 14**). Está presente intracelularmente en las vesículas de neuronas glicinérgicas o GABAérgicas. Comparte cerca de 99% de identidad con la secuencia de la proteína de rata. Las regiones que flanquean el extremo 5' en los genes *VIAAT* de humano y de ratón muestran una gran similitud, sugiriendo la presencia de elementos reguladores similares para la expresión de este gen. Las secuencias de los elementos reguladores para la unión de factores de transcripción como SP1 y EGR-1 en los promotores de *VIAAT* de humano y ratón son casi idénticos. Los motivos de SP1 son necesarios para la actividad del promotor de *VIAAT*, el cual pertenece a la clase de promotores ricos en CpG sin caja TATA, por lo que SP1 es importante para aumentar la expresión de este tipo de

genes. La región promotora parece interactuar con secuencias regulatorias distribuidas a lo largo de la región genómica que rodea el gen (Chessler *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005; Juge *et al.*, 2009).

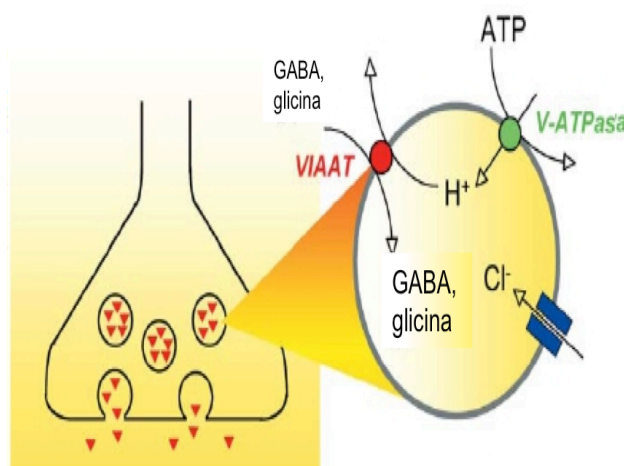


Figura 14. Función de VIAAT. Las vesículas secretoras sinápticas están cargadas positivamente y acidificadas por una H⁺-ATPasa electrogénica y por un canal de cloruro que provee la derivación eléctrica para un eficiente bombeo de protones. VIAAT intercambia protones vesiculares por GABA o glicina del citosol para su almacenamiento y posterior secreción en las terminales nerviosas (Modificado de Gasnier, 2004).

La liberación de neurotransmisores por terminales nerviosas requiere su previa acumulación en vesículas sinápticas, por lo que VIAAT es una proteína clave para la función del sistema nervioso en mamíferos. El gen *VIAAT* es muy compacto, abarca cerca de 5kb en humano y en ratón y se encuentra en el *locus* 20q11.23. Está organizado en 2 exones que codifican para una proteína de 525 aminoácidos, las cuales forman un dominio N-terminal largo e hidrofílico y un centro con 10-11 α -hélices transmembranales. Por RT-PCR, no se han identificado variantes creadas por corte y empalme. La traslocación de los neurotransmisores desde el citosol hacia vesículas sinápticas la realiza a cambio de H⁺ ya que las vesículas secretoras están acidificadas por una H⁺-ATPasa de tipo vacuolar que provee la fuerza necesaria para la captura del neurotransmisor, permitiendo el transporte activo por la actividad antiporte de VIAAT en contra del gradiente de concentración de los neurotransmisores y su posterior liberación por exocitosis de las terminales nerviosas (**Figura 14**) (Bedet *et al.*, 2000; Chessler *et al.*, 2002; Gasnier, 2004; Schiöth *et al.*, 2013).

Además del transporte vesicular de aminoácidos inhibitorios no hay otras funciones asignadas a VIAAT, y hay muy poca expresión fuera del SNC en humanos (Schiöth *et al.*, 2013). En rata y ratón se encuentra expresado en todas las partes del cerebro y en la médula espinal, pero también en ojo y en bajos niveles en el músculo esquelético, hígado, bazo, timo y en sangre (Sundberg *et al.*, 2008), así como en la glándula pineal y pituitaria, islotes pancreáticos y testículos, aunque en niveles más bajos (**Figura 15**) (Bedet *et al.*, 2000; Ebihara *et al.*, 2003; Suckow *et al.*, 2006).

SLC32A1

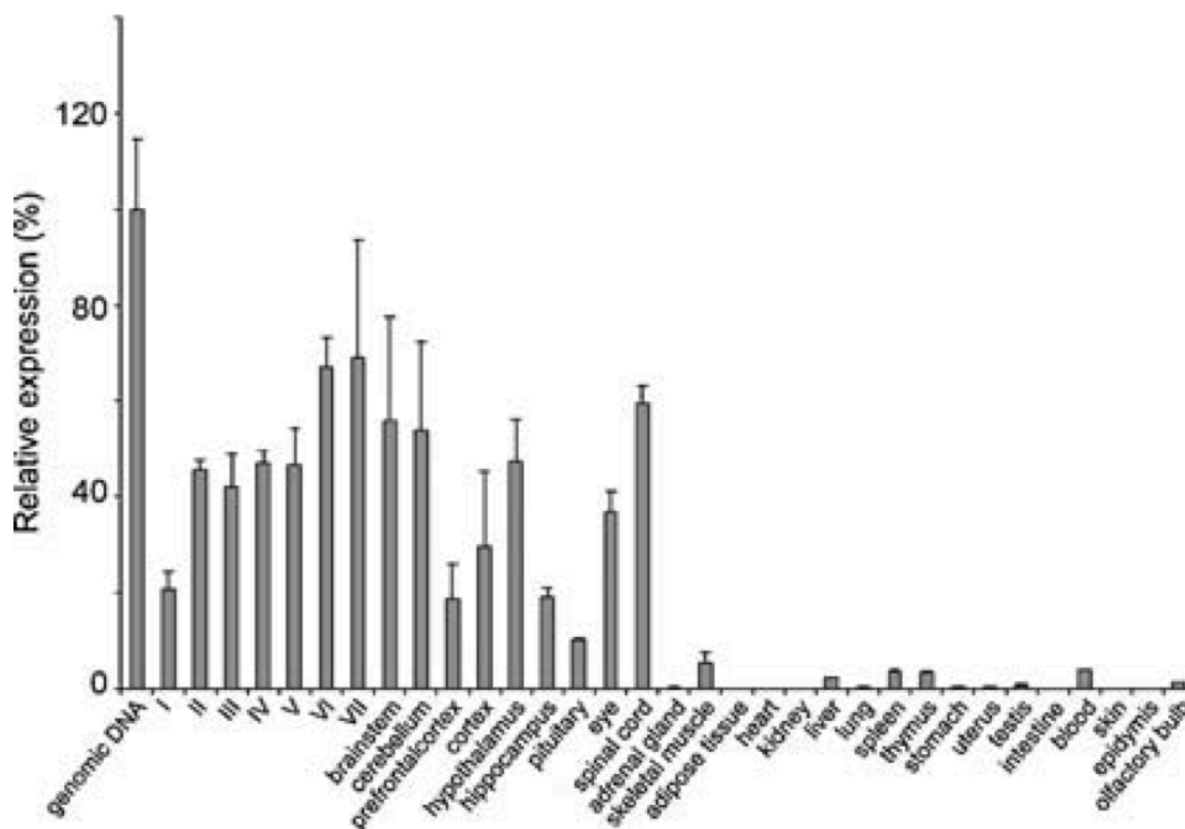


Figura 15. Expresión de VIAAT en diferentes órganos de rata. Expresión relativa del mRNA de VIAAT o SLC32A1 en diversos órganos de rata. La primera columna consiste en un control contra el que se normalizó correspondiente a DNA genómico. Las abreviaturas I-VII indican los cortes coronales realizados y evaluados del cerebro de la rata. Las siguientes columnas pertenecen a: tallo cerebral, cerebelo, corteza prefrontal, corteza, hipotálamo, hipocampo, pituitaria, ojo, médula espinal, glándula adrenal, músculo esquelético, tejido adiposo, corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo, timo, estómago, útero, testículos, intestino, sangre, piel, epidídimo y bulbo olfatorio. Se observa que este gen se expresa principalmente en SNC, en médula espinal y en el ojo; y en menores proporciones se expresa en sangre, timo, bazo, hígado y músculo (Sundberg *et al.*, 2008).

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Es sintetizado a partir del glutamato por la enzima ácido glutámico descarboxilasa, GAD, y es degradado por una transaminasa. Este neurotransmisor ejerce su función a través de la activación de receptores específicos que se expresan a lo largo del SNC. GABA_A es un receptor ionotrópico dependiente de ligando que activa canales de cloruro, produciendo una despolarización en neuronas, disminuyendo su actividad; y GABA_B es un receptor metabotrópico, que ejerce su función a través de proteínas G (**Figura 16**) (Gladkevich *et al.*, 2006).

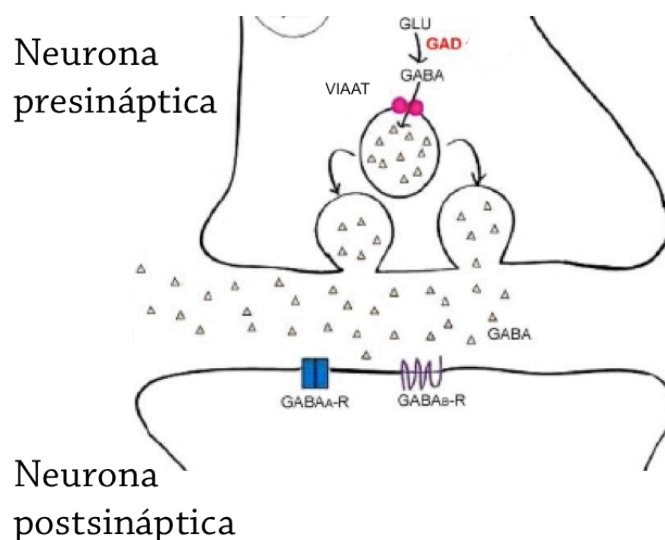


Figura 16. Componentes del sistema GABAérgico. GABA: ácido γ -aminobutírico; GABA_A-R: receptor GABA_A; GABA_B-R: receptor GABA_B; GLU: glutamato; GAD: ácido glutámico descarboxilasa; VIAAT: transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (Modificado de Cherlyn *et al.*, 2010).

GABA también posee efectos en otro tipo de tejidos no neuronales, principalmente en la regulación de funciones endocrinas. GABA se ha identificado en muchos órganos endócrinos, como la hipófisis, páncreas, testículos, tracto gastrointestinal, ovarios, placenta, útero y médula adrenal. El GABA periférico puede actuar como un neurotransmisor o un neuromodulador del sistema nervioso autónomo o como una hormona en tejido no neuronal (Gladkevich *et al.*, 2006). GABA controla la secreción en diferentes órganos periféricos, actúa como una señal de desarrollo en tejidos regenerativos del embrión y del adulto, regula la división celular y afecta la diferenciación y maduración de células humanas (Azuma *et al.*, 2003). En la corteza

adrenal de la rata, GABA influye en la esteroidogénesis y en testículo estimula la producción de testosterona por las células de Leydig y puede estar involucrado en la espermatogénesis (Gladkevich *et al.*, 2006). También en cáncer ha surgido como una molécula de señalización que controla la proliferación del tumor. GABA, GAD, GABA_A, GABA_B, transaminasa y transportadores vesiculares no sólo se expresan en SNC sino también en órganos periféricos, y se ha observado que la expresión de GABA y de GAD aumenta significativamente en tejidos neoplásicos, incluyendo CaP (Azuma *et al.*, 2003; Young y Bordey, 2009; Schuller y Al-Wadei, 2010). La activación del receptor GABA_B puede tener comunicación cruzada entre las proteínas G y receptores con cinasas de tirosina, las cuales promueven el desarrollo y proliferación de muchos tipos de cáncer, mientras que la activación de GABA_A aumenta el Ca²⁺ intracelular, lo que puede activar varias vías de señalización (Watanabe *et al.*, 2006).

En CaP se ha visto que pacientes con metástasis tienen niveles más altos de GABA y GAD comparados con los que no tienen metástasis y con aquéllos con HBP. Ha sido demostrado que GABA, mediante GABA_A, regula la proliferación del CaP y que es un factor que promueve la metástasis, por lo que estas moléculas podrían funcionar como marcadores para el pronóstico de la enfermedad y como posibles blancos terapéuticos (Azuma *et al.*, 2003; Young y Bordey, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata es una enfermedad que muestra una alta tasa de incidencia y de mortalidad en todo el mundo. En México se encuentra en el primer lugar de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres mayores de 20 años. A la fecha, se desconocen los mecanismos moleculares precisos que dirigen la iniciación y la progresión de este tipo de cáncer. De particular importancia es el entendimiento de los mecanismos que dirigen la transición de la etapa inicial dependiente de andrógenos, potencialmente tratable, hacia una etapa independiente de andrógenos, para la cual no hay un tratamiento efectivo y hacia la que progresan la gran mayoría de los pacientes. Para resolver este problema se han realizado estudios que intentan explicar esta transición por mecanismos genéticos y, más recientemente, por mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA. En cáncer de próstata, como en otros tipos de cáncer, se han descrito genes que sufren hipermetilación de la isla CpG en su región promotora, la cual puede deberse a que el silenciamiento provee algún tipo de ventaja selectiva al tumor o como consecuencia de la desregulación de los mecanismos epigenéticos en general. La evaluación de los patrones de metilación del DNA puede servir para diferenciar la etapa en la que se encuentra el tumor y para brindar un diagnóstico más preciso, menos invasivo y un pronóstico. De igual manera, el estudio de estos cambios puede proporcionar información valiosa que contribuya a comprender la relación entre las alteraciones en la metilación del DNA y el cáncer de próstata.

3. HIPÓTESIS

Dado que hay evidencia de que los mecanismos epigenéticos se encuentran desregulados en la iniciación del cáncer de próstata y en la progresión hacia la independencia de andrógenos, especialmente por la hipermetilación de las islas CpG en los promotores de algunos genes, es posible que los patrones de metilación de la isla CpG en la región promotora del gen *VIAAT* muestren una metilación del DNA diferencial entre las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3, que representan diferentes etapas clínicas de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar los patrones de metilación del DNA en una zona determinada de la región promotora del gen *VIAAT* en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 y su relación con la expresión génica.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión del gen *VIAAT* en condiciones normales en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3.
- Realizar un tratamiento con el fármaco desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadC) en las líneas celulares LNCaP y PC3 y determinar la expresión del gen *VIAAT* y la de algunos miembros de la familia *SFRP* (*SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5*), como control de tratamiento.
- Analizar los porcentajes y patrones de metilación del DNA obtenidos a partir de la secuenciación de la región de interés y relacionarla con la expresión del gen *VIAAT*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

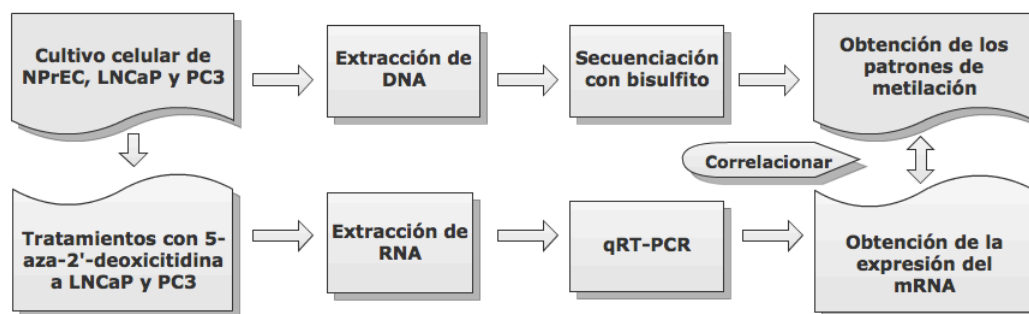


Figura 17. Diagrama de flujo del protocolo experimental. Esquema que muestra resumido el procedimiento experimental a desarrollar.

Cultivo Celular. Se utilizaron las líneas celulares NPrEC (Lonza), LNCaP y PC3 (ATCC) (**Tabla 1**). Se sembraron en una caja de Petri de plástico de 100x15mm y, al llegar a una confluencia del 100%, fueron tripsinizadas y el botón celular se colectó para la extracción de DNA. Aparte, de LNCaP y de PC3 se sembraron 1×10^5 y 4×10^4 células, respectivamente ($\approx 20\%$ de confluencia), en 4 cajas de Petri de plástico de 60x15mm para los tratamientos con 5azadC y la posterior extracción de RNA.

Tabla 1. Características de las líneas celulares utilizadas.

Línea Celular	Características	Medio de Cultivo
NPrEC	Células epiteliales normales de próstata humana.	PrEGM™
LNCaP	Célula de cáncer de próstata aislada de metástasis a nódulo linfático supraventricular. Posee AR y es dependiente de andrógenos.	RPMI + 10% de suero fetal bovino.
PC3	Célula de cáncer de próstata obtenida a partir de metástasis a hueso. No expresa AR y es independiente de andrógenos.	DMEM + 10% de suero fetal bovino.

La información se obtuvo de los proveedores, Lonza para NPrEC y ATCC para LNCaP y PC3.

Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina. Se realizó una curva de concentraciones de 5azadC en las líneas celulares LNCaP y PC3 de acuerdo a protocolos previamente publicados (Wu y Ho, 2004), utilizando las concentraciones de 0.5 μM , 1.0 μM y 5.0 μM y el vehículo (H_2O). El día en el que las células fueron sembradas se consideró como el día 0, y los tratamientos, que incluían reposición de medio, se llevaron a cabo los días 1, 3 y 5. La recolección de RNA, previo conteo celular, se llevó a cabo el día 6 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Esquema de tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina.

Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Siembra de las células en las cajas de Petri.	Reposición de medio y primera administración.	-	Reposición de medio y segunda administración.	-	Reposición de medio y tercera administración.	Conteo celular y extracción de RNA.

El tratamiento se realizó en las líneas celulares LNCaP y PC3.

Conteo de células. El conteo se llevó a cabo mediante el uso de una cámara de Neubauer y azul tripano como colorante vital. Se obtenía el promedio del conteo de las células vivas en los cuatro cuadrantes, el resultado se multiplicaba por 2 500 y por el inverso del factor de dilución utilizado.

Extracción de RNA. Se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante.

PCR en tiempo real. A partir de 4 µg de RNA extraído se utilizó la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT) de Invitrogen de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, se evaluó la expresión relativa del gen *VIAAT* y de *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* en relación al gen *GAPDH* mediante el uso de sondas TaqMan® y el uso del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en un equipo de tiempo real ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

Extracción de DNA. A partir de un botón celular de las líneas NPrEC, LNCaP y PC3 sin tratar se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) para la extracción de DNA.

Tratamiento con bisulfito de sodio: Se utilizaron 2 µg del DNA extraído y se utilizó el kit EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research).

Diseño de primers para el análisis de metilación. Para obtener la secuencia de los primers, se utilizó el programa en línea MethPrimer con la secuencia del gen *VIAAT* obtenida del Genome Browser abarcando desde el sitio de inicio de la transcripción hasta 1 200 pares de bases (pb) previas hacia el extremo 5' (ver Anexo).

Tabla 3. Condiciones para la amplificación del amplicón deseado.

<i>Primers para el análisis metilación en la isla CpG de la región promotora del gen VIAAT</i>					
<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Tamaño del amplicón (pb)</i>	<i>T_a (°C)</i>	<i>Ciclos de PCR</i>	<i>Número de CpG</i>
<i>Forward</i>	AGTTTAAAGTTTTTATAGTTTGGAGG	360	50	45	33
<i>Reverse</i>	AAACTCAACCTCAAACCTCAATCAC				

T_a es la temperatura de alineamiento que se utilizó para la PCR.

PCR para obtener el fragmento a analizar. Previa estandarización de las condiciones ideales para esta reacción (**Tabla 3**), se amplificó la región de interés del DNA tratado con bisulfito de sodio utilizando la enzima HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante. Para la visualización del fragmento de interés, se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™.

Extracción de DNA del gel de agarosa. El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV y se cortó con un bisturí la banda que aparecía con la longitud deseada y se purificó utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante.

Clonación del fragmento de DNA. Las dos fases que corresponden a este paso se llevaron a cabo utilizando el kit pGEM®-T Easy Vector System II (Promega). Para la ligación se utilizaron 20 ng de DNA, cantidad obtenida a partir de la fórmula proporcionada por el fabricante, y se dejó la reacción en refrigeración toda la noche. Para la transformación se utilizaron las células competentes que acompañan el kit y se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. El vector de clonación posee un marcador de selección, produciendo colonias blancas que indican la incorporación del inserto en el vector, y colonias azules que indican que el vector no contiene el inserto. Las placas con agar donde se siembran las bacterias contienen X-Gal, un sustrato de la β -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto que en contacto con el aire presenta un intenso color azul, pero en un vector con el inserto se interrumpe la secuencia codificante de la β -galactosidasa (Promega, 2010). Las colonias blancas en las que fuera verificado por PCR que contenían el inserto de interés fueron incubadas en tubos Falcon de 15mL con 5mL de medio LB Broth Base (Invitrogen) a 37 °C durante 24 horas con agitación.

PCR de validación del inserto. Se tomó una pequeña muestras de las colonias positivas tras la transformación y se colocaron en un tubo de 0.2 ml con 50 μ l de una dilución 1:100 de Nonidet™ P-40, se calentaron a 95 °C por 5 minutos y luego 5 minutos en hielo. Se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 5 minutos y el sobrenadante fue utilizado como templado para la reacción de PCR, utilizando los *primers* del plásmido SP6 y T7 y la enzima Taq DNA Polymerase con ThermoPol®

Buffer (New England Biolabs), previa estandarización de las condiciones. Se realizó un corrimiento electroforético a 60 V en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se compararon las bandas obtenidas con el marcador de longitud en pares de bases para asegurar que la colonia elegida contenía en el plásmido el fragmento de interés.

Purificación de plásmido. Siguiendo el protocolo del fabricante, se utilizó el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) para la purificación de plásmido de todas las clonas verificadas con el inserto en el vector de clonación incubadas.

Secuenciación. Las muestras obtenidas de la purificación del plásmido fueron enviadas a Macrogen, Inc. en Corea para su secuenciación con los *primers* SP6 y T7.

Análisis de las secuencias. Se compararon los resultados de las secuencias con la secuencia de referencia original del NCBI (ver Anexo) utilizando la plataforma de análisis de metilación de DNA en línea BDPC y el software BISMA.

Análisis estadístico. Se utilizó el programa estadístico Prism 5.0 para analizar si había diferencia significativa entre el número de células en los diferentes tratamientos con 5azadC, para lo cual se realizó un ANOVA de medidas repetidas seguida de una prueba de Tukey (valor α de 0.05).

6. RESULTADOS

6.1 CULTIVO CELULAR

Al día 6 del tratamiento se fotografiaron las células LNCaP. Posteriormente se realizó el conteo y extracción de RNA para experimentos posteriores. En la fotografía (**Figura 18**) se pueden ver las células tras las diferentes concentraciones del fármaco desmetilante 5azadC y su efecto macroscópico sobre esta línea celular. Se aprecia un menor número de células a mayor concentración del fármaco.

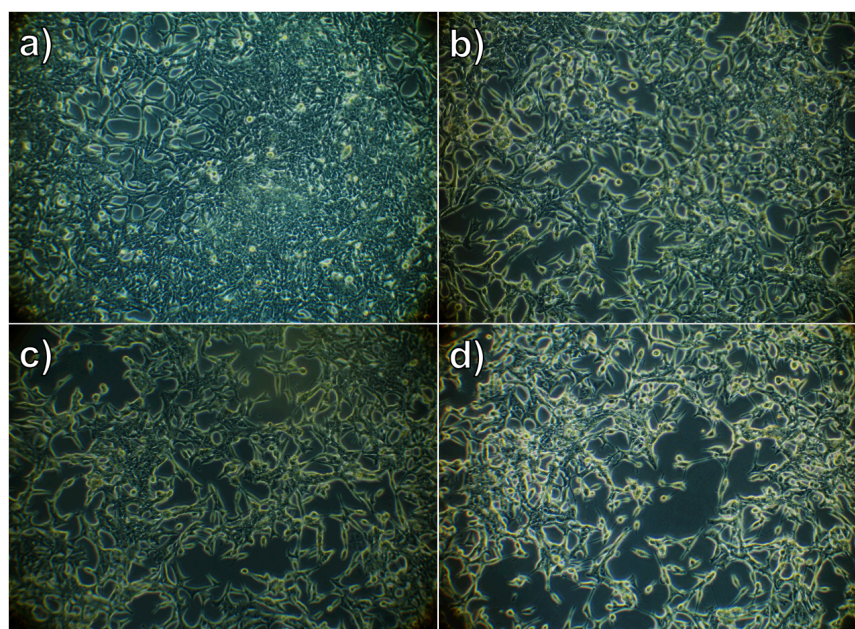


Figura 18. Características de las células LNCaP tratadas con 5-aza-2'-deoxicitidina. La fotografía se tomó previamente al conteo y a la extracción de RNA. Los recuadros corresponden a diferentes concentraciones del fármaco desmetilante: **a)** Vehículo (H₂O), **b)** 0.5 μM, **c)** 1.0 μM, **d)** 5.0 μM. En el vehículo hay un mayor número de células que en los tratamientos, lo que pone de manifiesto un carácter citotóxico del fármaco.

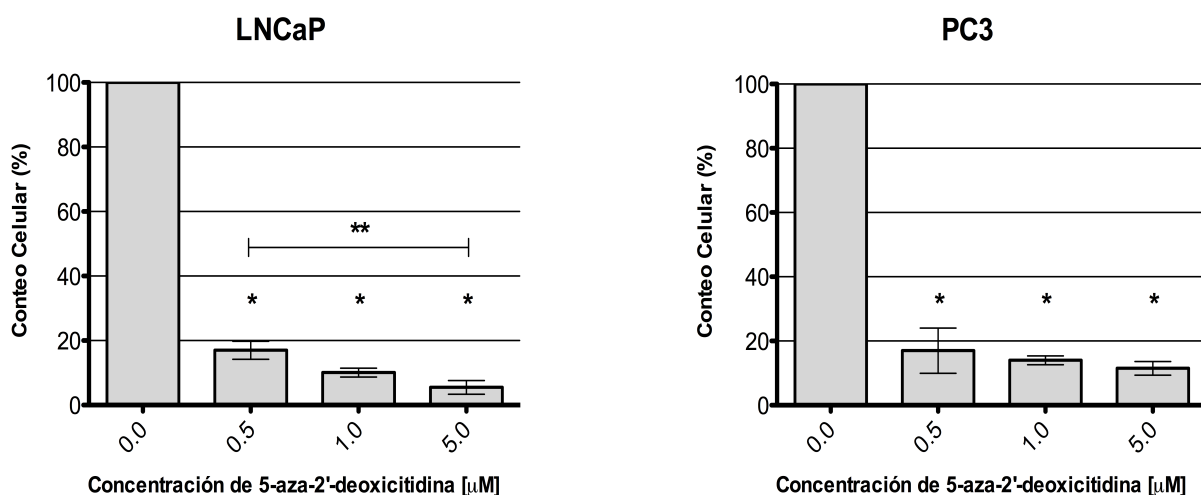


Figura 19. Efecto del tratamiento de 5-aza-2'-deoxicitidina sobre el número de células en LNCaP y PC3. En las gráficas de barras se muestra el porcentaje del conteo celular, tomando el conteo del control como 100%. Se grafican los promedios de dos conteos independientes \pm DE. Se observa una disminución en el número de células desde la más baja concentración de fármaco evaluada en ambas líneas celulares, siendo las diferencias significativas y representadas con un (*) entre tratamientos y control, y con un (**) entre los grupos (ANOVA de medidas repetidas, seguida de una prueba de Tukey, valor de α de 0.05).

Al microscopio se aprecian a simple vista cambios en el número de células comparando cada concentración del fármaco contra el vehículo sin que se observen cambios en la morfología de las células. De igual manera, se realizó el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer para evaluar cuantitativamente el efecto del tratamiento sobre LNCaP y sobre PC3 (**Figura 19**). El fármaco, independientemente de la línea celular en la que se evaluó, ejerció un efecto citotóxico desde la concentración más baja, al compararse con el grupo control.

6.2 EXPRESIÓN DEL GEN *VIAAT*

Se evaluó por qRT-PCR la expresión del gen *VIAAT* y de *GAPDH* en células NPrEC, LNCaP y PC3 que no recibieron tratamiento. Sin embargo, no se observó amplificación de la sonda de *VIAAT*, mientras que la sonda del gen constitutivo *GAPDH* sí mostró amplificación. Lo anterior puede indicar que la cantidad de mRNA del gen *VIAAT* era muy baja en esas líneas celulares.

También se evaluó por qRT-PCR la expresión de los genes *VIAAT*, *SFRP2*, *SFRP3*, *SFRP5* y *GAPDH* en las muestras obtenidas tras los tratamientos con 5azadC en las líneas celulares LNCaP y PC3 (**Figura 20**).

La expresión relativa muestra que al aumentar la concentración del fármaco también aumenta la expresión del gen *VIAAT* en ambas líneas celulares de forma dependiente de la concentración y de manera más marcada en LNCaP (con un aumento de 182, 1 017 y 7 068 veces para las concentraciones de 0.5 μ M, 1.0 μ M y 5.0 μ M; respectivamente) (**Figura 20a**). La expresión en las células que recibieron únicamente el vehículo no pudo ser determinada en ninguna de las líneas celulares, por lo que se consideró el máximo número de ciclos en la qPCR (45) como el C_T . En PC3 hay un ligero aumento en la expresión en la concentración de 1.0 μ M (de 6 veces), y en la concentración de 5.0 μ M el aumento es de 386 veces (**Figura 20b**). Sin embargo, la expresión en este último punto no iguala a la que se observa en LNCaP, ya que es mucho menor.

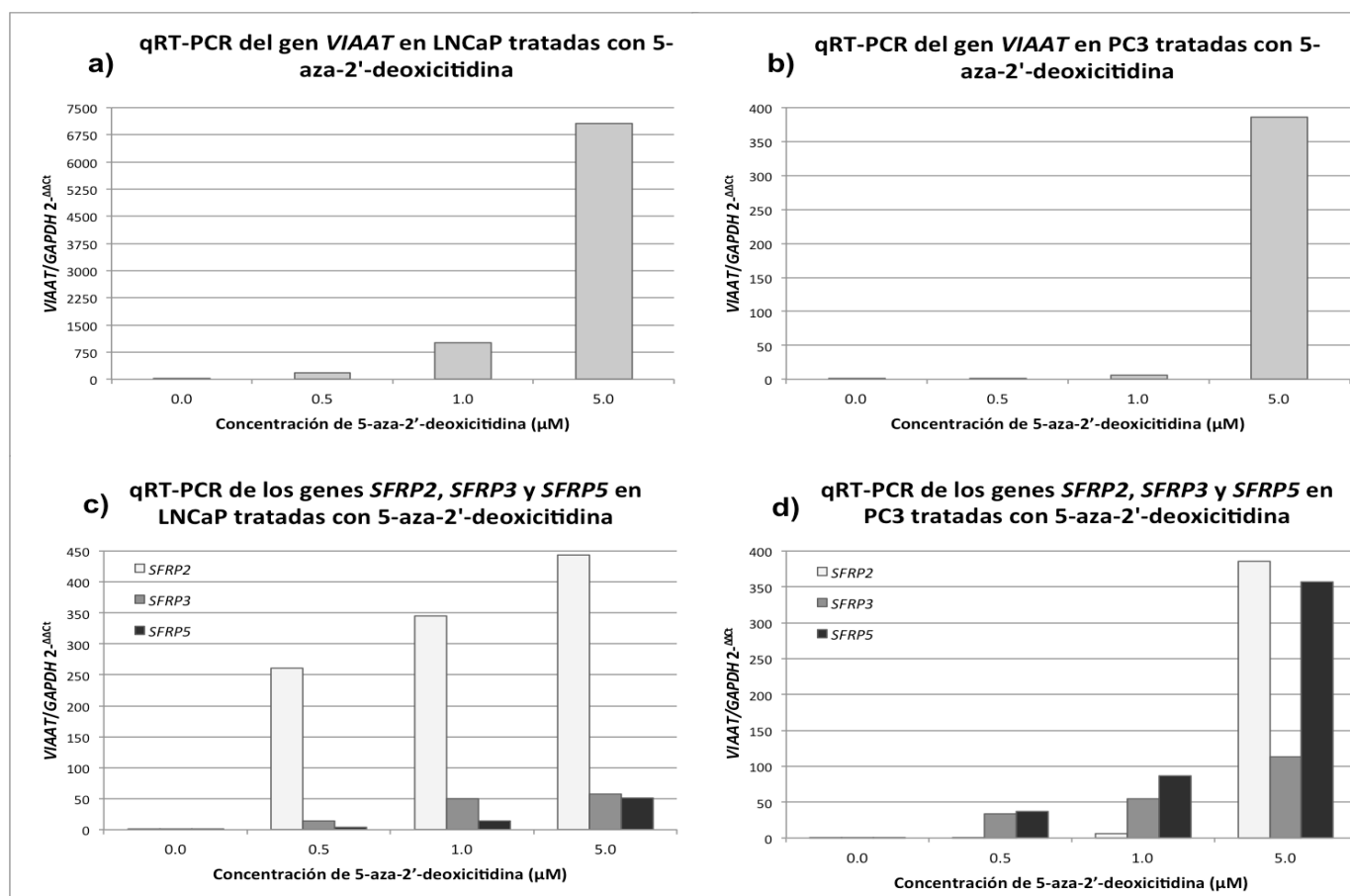


Figura 20. qRT-PCR de los genes *VIAAT*, *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* en LNCaP y PC3 tras los tratamientos con 5-aza-2'-deoxicidina. **a)** *VIAAT* en LNCaP. *VIAAT* aumenta su expresión a medida que aumenta la concentración del fármaco; **b)** *VIAAT* en PC3. Hay un ligero aumento en la expresión de *VIAAT* en 1.0 μM y un gran aumento en 5.0 μM; **c)** *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* en LNCaP. Hay aumento en la expresión al aumentar la concentración de fármaco; **d)** *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* en PC3. Hay un aumento en la expresión dependiente de la concentración del fármaco. Los genes *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* fueron utilizados como control del tratamiento ya que un estudio previo (Perry *et al.*, 2012) estableció que la expresión de estos genes se restablece con el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicidina en líneas celulares de CaP. En todos los casos, se normalizó con respecto al valor obtenido para el vehículo y se grafican los promedios de las réplicas técnicas.

Para los genes *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* se observa un aumento en la expresión conforme aumenta la concentración del fármaco para todos esos genes en ambas líneas celulares (**Figura 20c y 20d**). En PC3, el comportamiento de la expresión de *SFRP2* es muy parecido al de *VIAAT*, ya que a 0.5 μM y a 1.0 μM la expresión no aumenta demasiado, pero a 5.0 μM aumenta de manera drástica (**Figura 20b y 20d**). *SFRP3* y *SFRP5* también aumentan su expresión a mayor concentración del fármaco en la misma línea celular, aunque los valores son mayores en PC3 que en LNCaP, en particular para *SFRP5* (**Figura 20c y 20d**).

Los genes de la familia *SFRP* se utilizaron únicamente como control del tratamiento con 5azadC, ya que recientemente se reportó que estos tres genes se encuentran hipermetilados en cáncer de próstata y que la regulación de su expresión ocurre por metilación del DNA, demostrándolo de igual manera con tratamientos con este fármaco y con el análisis de sus patrones de metilación (Perry *et al.*, 2012). En general, se observa que a mayor concentración del fármaco hay una mayor expresión de cada gen en LNCaP y en PC3, lo que concuerda con lo reportado en la literatura y lo que valida la eficacia del tratamiento no sólo con un gen, sino con tres.

6.3 PATRONES DE METILACIÓN EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *VIAAT*

Tras la reacción de PCR, en las condiciones previamente descritas, con el DNA de las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3, se obtuvo como producto las bandas que corresponden al amplicón esperado de 360 pb (**Figura 21**), que corresponde a la longitud del fragmento a analizar del promotor del gen *VIAAT*. Las bandas fueron cortadas del gel de agarosa y purificadas para utilizar ese DNA en las reacciones posteriores. Se observa que aunque para todos los casos se utilizó la misma cantidad de templado en la PCR y se cargó la misma cantidad de muestra en el gel, se aprecian diferentes intensidades que dependen de la línea celular, siendo menor para NPrEC y mayor para PC3. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones particulares de cada línea celular.

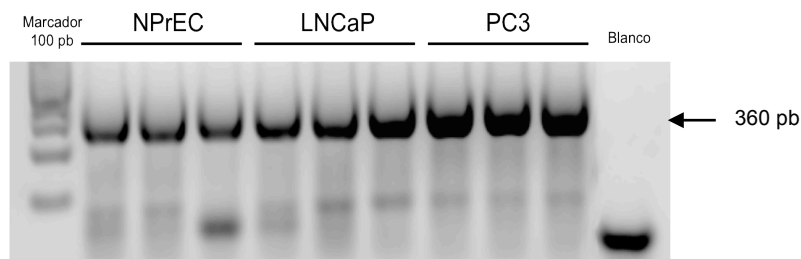


Figura 21. Electroforesis de los productos de PCR para obtener el fragmento para el análisis de metilación del DNA. La reacción de PCR se realizó por triplicado para obtener cantidad suficiente de DNA para el análisis. El corrimiento electroforético se hizo en un gel de agarosa al 2% a 60 V y se tiñó con GelRed™. El amplicón tiene un tamaño de 360 pb, por lo que la banda más intensa obtenida en cada carril corresponde al producto, aunque las bandas aparecen algo deformadas por la tinción con el GelRed™.

Tras la reacción de ligación del inserto al vector de clonación y la de transformación bacteriana, las colonias que se obtienen tras la incubación pueden ser blancas (positivas para la incorporación del inserto) o azules (negativas) (**Figura 22a**). El marcador de resistencia a ampicilina garantiza únicamente que las colonias que se desarrollan poseen el vector de clonación, con o sin inserto. La imagen muestra el crecimiento de bacterias de la reacción de control, donde se ve un gran número de colonias blancas y un pequeño número de colonias azules, que es lo esperado. La **Figura 22b** muestra un esquema del vector de clonación y se puede observar que entre las secuencias de T7 y el de SP6 es donde se introduce el inserto. Entre estos sitios hay ≈ 140 pb y en una PCR que utilice *primers* que corresponden a estas secuencias es posible determinar la ausencia o presencia del inserto de 360 pb, por lo que el producto de PCR esperado debería ser de ≈ 500 pb. De las reacciones de transformación bacteriana para las diferentes líneas celulares, se escogía el mayor número posible de colonias blancas tras la incubación para evaluar por PCR la presencia o ausencia del inserto (**Figura 23**). Las colonias que fueran confirmadas como positivas para el inserto fueron las que se secuenciaron, previa propagación en medio líquido y purificación del plásmido. Al final, se obtuvieron entre 15-16 colonias blancas y positivas para el inserto de cada línea celular, ya que la mayoría de los artículos científicos reportan los patrones de metilación del DNA de 10 clonas para asegurar una mayor representatividad.

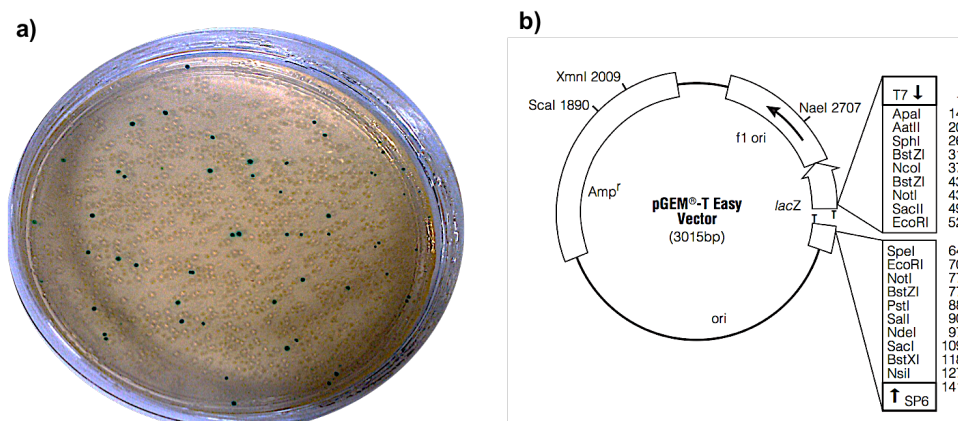


Figura 22. Resultado de la siembra de colonias tras la transformación y esquema del vector de clonación. a) Siembra del control para la reacción de ligación y transformación, donde se espera ver un gran número de colonias blancas y un pequeño número de colonias oscuras. b) Esquema del vector de clonación que muestra los sitios principales y su tamaño. La región Amp^r es el marcador de selección por resistencia a ampicilina. El inserto se introduce entre los sitios T7 y SP6 en la región *lacZ*, por los extremos de timina que sobresalen, interrumpiendo la secuencia codificante de la β-galactosidasa y produciendo colonias blancas.

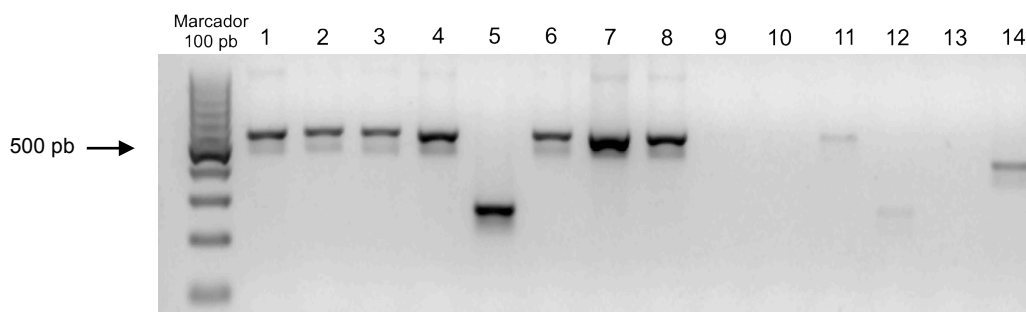


Figura 23. Electroforesis de los productos de PCR para confirmar la presencia del inserto. Imagen representativa de las reacciones de PCR. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los diferentes carriles (1-14) corresponden a una colonia blanca obtenida tras la transformación bacteriana. El amplicón esperado es de ≈500 pb o mayor, el cual se observa en los carriles 1-4, 6-8 y 11. Los carriles 5 y 14 muestran amplificación de un fragmento de menor tamaño al esperado, lo que puede indicar la recircularización del vector sin la introducción del inserto de interés, por lo que no fueron seleccionadas. Los carriles 9, 10 y 13 no muestran amplificación de ningún fragmento, por lo que fue necesario repetir la PCR porque lo esperado es ver mínimo una banda pequeña.

Finalmente, las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software BISMA para obtener los patrones de metilación del DNA. Los resultados de los análisis se muestran en la **Figura 24** y en la **Figura 25**, donde se aprecia que conforme progresa la enfermedad, representado por las características clínicas en las líneas celulares, hay una ganancia en la metilación del DNA a nivel general que va desde 1.5% en NPreC, a 26.7% en LNCaP y llega hasta el 83.6% en PC3.

Sin embargo, la distribución en el aumento de la metilación del DNA no se da de manera homogénea o al azar, sino que de los 33 CpG analizados algunos en particular parecen tener cierta preferencia a permanecer desmetilados, mientras que algunos se encuentran metilados únicamente en cáncer y otros únicamente se encuentran metilados en la línea independiente de andrógenos. Además, la metilación del DNA parece ocurrir desde los extremos de la región hacia el centro.

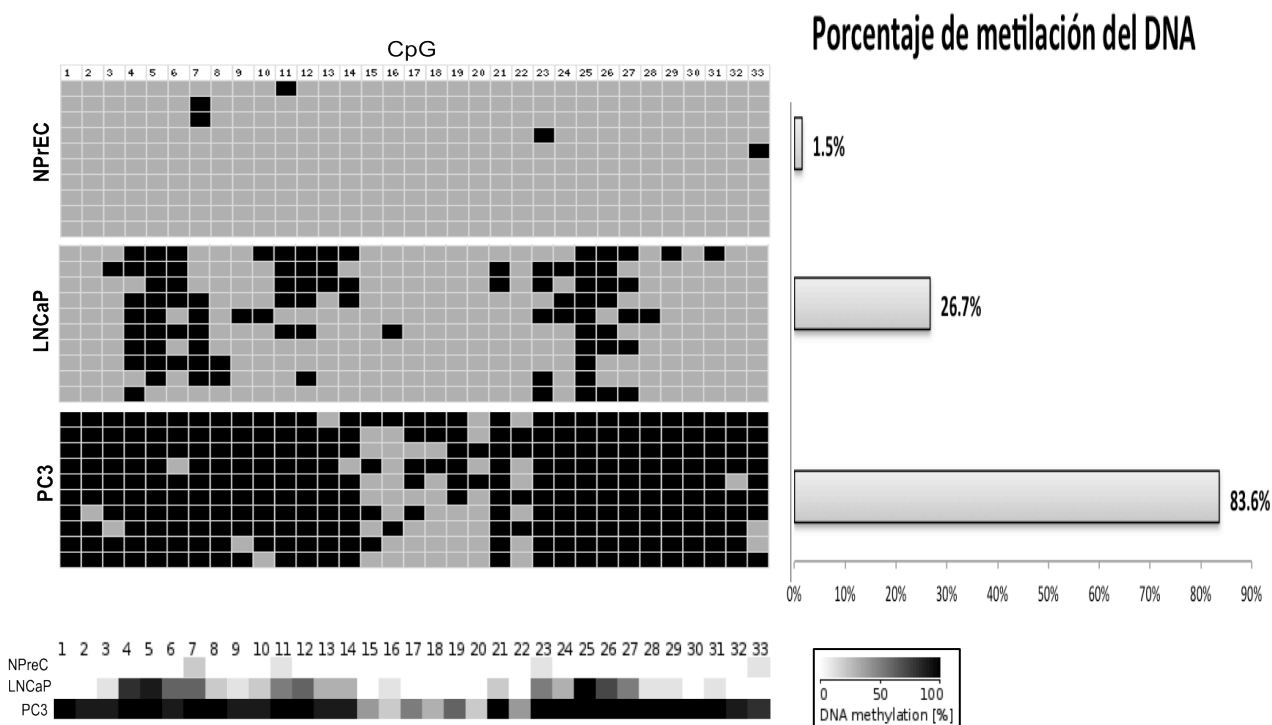


Figura 24. Patrones de metilación de la isla CpG en la región promotora del gen *VIAAT* en NPreC, LNCaP y PC3. Esquemas obtenidos con el software en línea BDPC con los datos de 10 clonas. En el esquema superior el color gris representa un dinucleótido CpG desmetilado y el negro un CpG metilado. Se muestra la metilación de cada CpG analizado y a la derecha el porcentaje de metilación del DNA en cada línea celular. El esquema inferior representa el promedio del porcentaje de metilación de cada CpG de acuerdo a la línea celular. Se observa una tendencia a la hipermetilación del DNA en la región analizada mientras se avanza hacia la independencia de andrógenos.

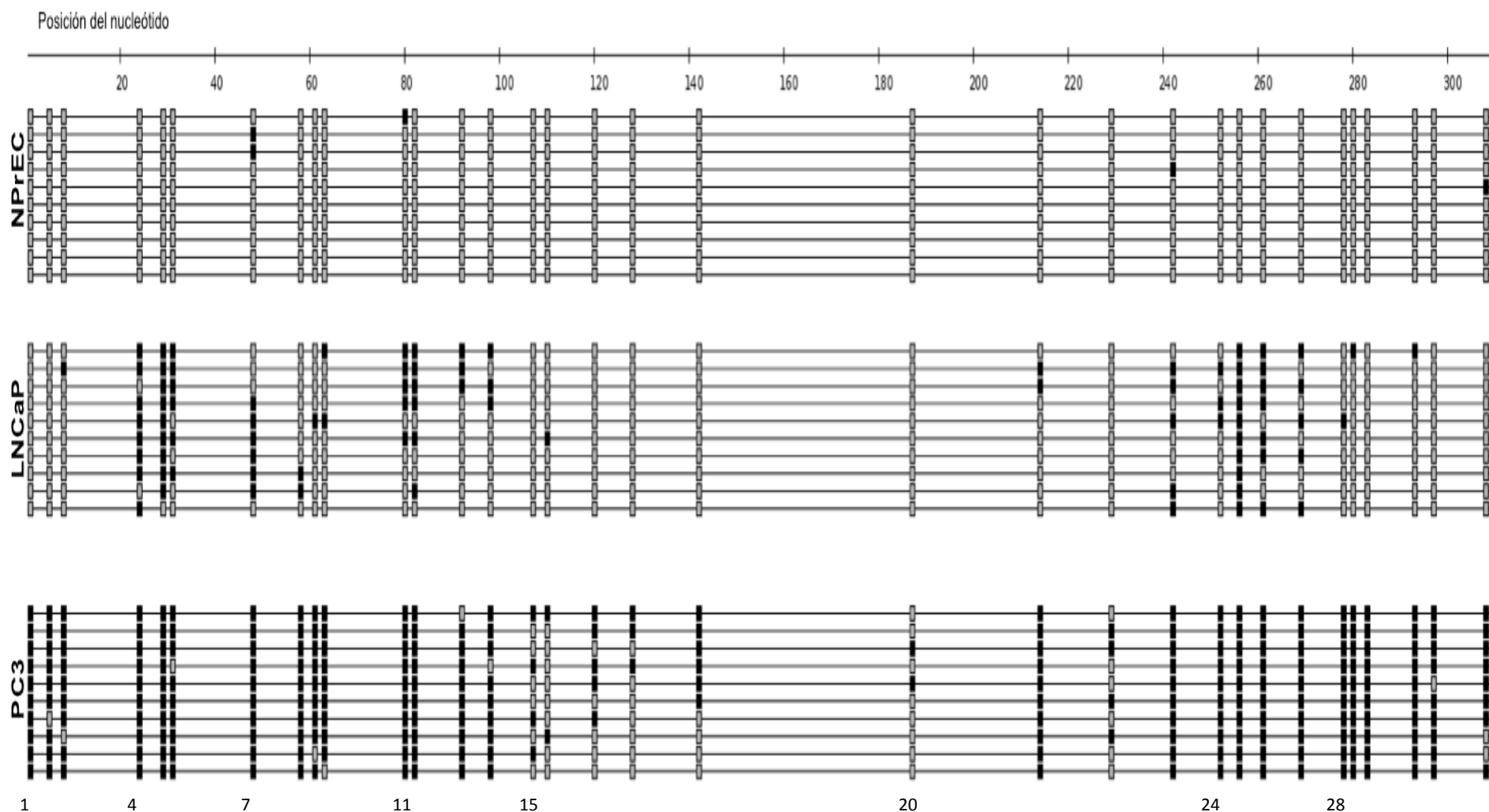


Figura 25. Representación gráfica de los patrones de metilación de la isla CpG en la región promotora del gen *VIAAT* en líneas celulares de cáncer de próstata. En la figura el rectángulo gris representa un dinucleótido CpG desmetilado y el negro representa un CpG metilado. Esta representación muestra una aproximación de la localización espacial de los 33 dinucleótidos CpG analizados. Se puede apreciar que los CpG que tienden a metilarse se encuentran cerca unos de otros y que algunos parecen menos propensos a ser metilados.

Analizando las imágenes anteriores, se observan dinucleótidos CpG que pasan de estar totalmente desmetilados a presentar 100% de metilación entre algunas de las tres condiciones clínicas representadas por las líneas celulares. Algunos ejemplos de este caso son: el CpG 25 entre NPrEC y LNCaP; los CpG 1, 4, 5, 6, 12, 21, 24-31 entre NPrEC y PC3; y los CpG 1 y 30 entre LNCaP y PC3. Lo anterior muestra que el CpG 25 se encuentra totalmente metilado en ambas líneas de CaP, tanto en la AD como en la AI. De igual manera, los CpG 1 y 30 son los que cambian del 0% al 100% su metilación entre la línea celular AD y la AI.

Los CpG 4, 5 y 6 presentan un mayor porcentaje de metilación en ambas líneas de CaP, pero desmetilación en NPrEC. Los CpG 9, 10, 21, 29 y 31 aumentan su porcentaje de metilación entre LNCaP y PC3. Los dinucleótidos 17-19 y 22 muestran muy baja o nula metilación en NPrEC y LNCaP, pero una mayor metilación en PC3 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Comparaciones entre líneas celulares y los CpG diferencialmente metilados entre ellas.

Comparación	CpG con aumento en la metilación del DNA (en orden descendente)
NPrEC con LNCaP	25, 5, 4
NPrEC con PC3	(1, 4, 5, 6, 12, 21, 24-31), 22, 19, 17, 22, 18
LNCaP con PC3	(1, 30), (9, 21, 29, 31), 10

Existen algunos dinucleótidos CpG en la región analizada que permiten diferenciar a una línea celular o a la característica patológica que representan. En esta tabla se encuentran enlistados descendientemente de acuerdo al aumento total en la metilación de su DNA. Los paréntesis crean un grupo que contiene el mismo aumento en el nivel de metilación.

Con respecto a la ubicación espacial, se observa que la tendencia de los CpG a ser metilados en las diferentes líneas celulares tiende a ocurrir en los extremos 5' y 3', con una tendencia a conservar la desmetilación normalmente presente en la zona central, en la que los dinucleótidos CpG se encuentran más separados unos de otros, mientras que los que se encuentran más cercanos entre sí tienen tendencia a metilarse (**Figura 25**).

En resumen, hay ciertos CpG que permiten diferenciar una condición patológica de CaP de otra (**Figura 26**). Diecinueve de estos 33 CpG analizados permiten diferenciar a NPrEC de PC3, aunque tres de éstos también los comparte con LNCaP, pero implica una metilación diferencial entre una condición normal y cáncer. Hay siete CpG que permiten diferenciar a LNCaP, una línea celular dependiente de andrógenos, de PC3, que muestra características de independencia de andrógenos. La importancia de esto radica en el hecho de que mediante la identificación de CpG diferencialmente metilados entre etapas clínicas de la enfermedad es posible usar estos datos en la creación de un marcador que contibuya a un mejor diagnóstico, además de que brinda información sobre los mecanismos moleculares que se encuentran alterados en el desarrollo de la enfermedad.

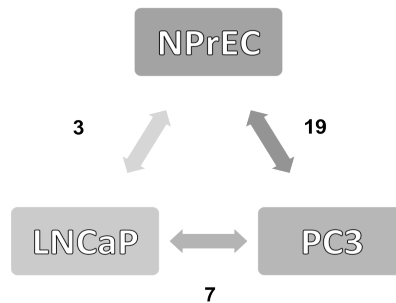


Figura 26. Número de CpG diferencialmente metilados entre NPrEC, LNCaP y PC3. Diecinueve CpG muestran metilación diferencial entre PC3 y NPrEC, de los cuales comparte tres también con LNCaP, lo que indica que estos diecinueve CpG se encuentran diferencialmente metilados entre cáncer y una condición normal. Siete CpG muestran metilación diferencial entre LNCaP y PC3, o entre una etapa de dependencia de andrógenos y una etapa independiente de andrógenos.

7. DISCUSIÓN

7.1 EXPRESIÓN DEL GEN *VIAAT* EN LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA

Para determinar si la regulación de la expresión del gen *VIAAT* se debe al estado de metilación del DNA en la isla CpG de su región promotora, se realizaron tratamientos en líneas celulares de CaP con diferentes concentraciones del fármaco desmetilante 5azadC. En un artículo publicado en el 2004, Wu y Ho establecieron un esquema de tratamiento en líneas celulares de CaP que se usó como referencia para el desarrollo de este trabajo. En dicho artículo la concentración máxima evaluada del fármaco fue de 0.75 μM , la cual restableció la expresión del gen que analizaban en su estudio. Sin embargo, ya que *VIAAT* es un gen que se sabe que se expresa muy poco fuera del SNC y del cual no hay muchos estudios en humanos sobre su expresión en diferentes tejidos, se decidió realizar el tratamiento en líneas celulares de CaP iniciando con una curva de concentraciones del fármaco que abarcó desde 0.5 μM hasta 5.0 μM para determinar la condición óptima en la que se pudiera observar un cambio significativo.

La 5azadC es un fármaco que promueve la desmetilación global del DNA a nivel genómico mediante la inhibición de las DNMT. Esta hipometilación generalizada del DNA está relacionada con la citotoxicidad de la 5azadC (Christman, 2002). Por lo tanto, también se evaluó cuantitativamente el efecto de las diferentes concentraciones de esta molécula utilizadas sobre el número de células viables al final del tratamiento, ya que la concentración a evaluar de 5.0 μM es mucho más alta que la utilizada por Wu y Ho. La cuantificación de las células, entonces, se realizó para observar si alguna concentración de 5azadC poseía un efecto citotóxico considerable que no permitiera obtener, al final del tratamiento, un número de células adecuado para obtener la cantidad de RNA necesario para las reacciones de qRT-PCR posteriores y que ésta fuera consistente entre los tratamientos. Al efectuar el conteo celular, se demostró que la 5azadC sí posee un efecto citotóxico en las líneas celulares evaluadas, ya que al comparar al

grupo control contra los grupos que recibieron alguna concentración del fármaco se aprecia una disminución en el número de células viables totales. Sin embargo, entre las diferentes concentraciones evaluadas y entre líneas celulares, la viabilidad permanecía relativamente constante. En el caso de LNCaP con 5.0 μM de 5azadC fue donde se observó un mayor efecto citotóxico (**Figura 19**). Al cuantificar los RNA obtenidos de las células correspondientes a cada una de las concentraciones del fármaco se observó que la cantidad obtenida sí era la suficiente en todos los tratamientos para la reacción de síntesis del cDNA a utilizar. De esta manera, aunque la 5azadC es citotóxica en las líneas celulares evaluadas, este efecto no impide obtener al final del tratamiento la cantidad de RNA necesaria para las reacciones posteriores, incluso a la concentración de fármaco más alta evaluada que fue la de 5.0 μM .

Habiendo establecido lo anterior, se realizó una qRT-PCR para evaluar la expresión relativa del gen *VIAAT* en las líneas celulares no tratadas y en las que recibieron el tratamiento con 5azadC, así como la expresión relativa de *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP4* (**Figura 20**), utilizando como gen constitutivo a *GAPDH*.

En los resultados de expresión del gen *VIAAT* en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 sin tratamiento no se observó amplificación de la sonda. Se realizó incluso una curva con cantidades variables de RNA en caso de que la razón por la que no hubiera amplificación fuera por poca cantidad de muestra. Aunque la mayoría de los experimentos reportan expresión de diversos genes con una cantidad de RNA de 500 ng, se llegaron a utilizar incluso hasta 4 μg de RNA para la reacción de síntesis de cDNA sin que posteriormente hubiera amplificación por la sonda de *VIAAT*. Sin embargo, sí había amplificación de la sonda del gen constitutivo *GAPDH* en las mismas muestras, lo que descartaba que existiera algún problema con ellas o que no hubiera cDNA. Por lo tanto, con los datos que se obtuvieron se puede establecer que la expresión del gen *VIAAT* es muy baja en estas tres líneas celulares, o se encuentra por debajo del límite de detección de la metodología empleada.

De acuerdo al nivel de metilación del DNA en la isla CpG del promotor de este gen en las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 no tratadas con 5azadC, obtenido en este trabajo, se podía sugerir que los resultados esperados de expresión fueran, a grandes

rasgos, una mayor expresión en NPrEC, intermedia en LNCaP y baja en PC3, por correlación inversa entre el nivel de metilación del DNA y el grado de expresión de un gen cuya regulación se deba a este mecanismo epigenético. Es decir, en PC3 el porcentaje de metilación del DNA en esta región es muy alto por lo que la baja expresión que se observó sí coincide con lo esperado; mientras que en NPrEC, donde la región analizada se encuentra prácticamente desmetilada, se esperaba ver una mayor expresión y, sin embargo, tampoco se observó amplificación de la sonda. En este caso, la expresión baja puede ser posiblemente debida a que la regulación de este gen en esta línea celular posee otros mecanismos de silenciamiento epigenético o a que su regulación se deba a una región en las orillas de la isla CpG, aunque es normal que en condiciones normales una isla CpG se encuentre desmetilada. De cualquier manera, parece evidente que, al menos este tipo de célula –células epiteliales normales de próstata-, no requiere de la expresión ni de las funciones de la proteína VIAAT, encargada de transportar neurotransmisores hacia vesículas sinápticas.

Los resultados de la expresión del gen *VIAAT* en los tratamientos con el fármaco desmetilante en la línea celular dependiente de andrógenos, LNCaP, muestran un aumento de la expresión a medida que aumenta la concentración del fármaco. Esto indica que hay, en cierta medida, una regulación de la expresión del gen mediada por la metilación del DNA. Sin embargo, este aumento también puede ser causado por una desregulación a nivel genético y epigenético causada por la 5azadC que involucre la participación de muchos otros factores que pueden contribuir al aumento de la expresión de este gen, lo que podría explicar lo que ocurre principalmente en la concentración más alta evaluada. Es decir, la alteración generalizada de la metilación del DNA de todo el genoma, además de los efectos epigenéticos ya mencionados, puede activar o favorecer la expresión de factores de transcripción de este gen, como SP1, EGR-1 y JUND (Genome Browser, consultado en 2013), que a su vez aumenten la expresión de *VIAAT*. El aumento gradual de la expresión del gen en las concentraciones del fármaco evaluadas posiblemente se logra debido al porcentaje bajo de metilación que se observa en la región analizada. Al existir en la región un número bajo de CpG metilados, la 5azadC puede favorecer de manera más sencilla su desmetilación y, por consiguiente, aumentar la expresión del gen, suponiendo además

que el patrón de metilación del DNA observado en la región analizada sea homogéneo a lo largo de toda la isla CpG en la región promotora.

La expresión del gen *VIAAT* en la línea celular PC3, independiente de andrógenos, muestra ciertas diferencias con respecto a la expresión observada en LNCaP. Para las concentraciones de 0.5 μM y 1.0 μM del fármaco desmetilante se observa un efecto menor sobre el incremento en la expresión del gen, aunque éste aumenta de forma significativa a la concentración de 5.0 μM , posiblemente debido a las mismas razones por las que aumenta en la línea LNCaP. Sin embargo, el cambio de expresión entre las concentraciones máximas evaluadas y los controles no fue tan grande en PC3 como lo fue en LNCaP. Esta diferencia se podría explicar debido al elevado porcentaje de metilación que existe en esta región para la línea PC3 –asumiendo que el comportamiento a lo largo de la isla CpG en el promotor es parecido al de la región analizada- que la 5azadC no es capaz de revertir totalmente, y a otros mecanismos epigenéticos de silenciamiento que no se ven afectados por un tratamiento desmetilante.

Con los resultados obtenidos es posible suponer que, hasta cierto nivel, la regulación de la expresión génica de *VIAAT* está relacionada con la metilación del DNA en su región promotora, aunque es evidente que también la regulación de la expresión se explica por otros mecanismos epigenéticos. De igual manera, no podemos asegurar que el tratamiento con 5azadC tenga repercusión directa desmetilando precisamente los dinucleótidos evaluados, aunque es muy probable que sí la tenga ya que la hipometilación del DNA producida por el fármaco se da a nivel global y diferentes estudios han demostrado por secuenciación que el porcentaje de metilación del DNA a lo largo de una región disminuye tras el tratamiento con 5azadC (Wu y Ho, 2004; Perry *et al.*, 2012; Truong *et al.*, 2012). Lo que sí se puede observar es que conforme aumenta el porcentaje de metilación del DNA en una línea celular en la región evaluada se vuelve más complicado restablecer la expresión tras el tratamiento con un agente desmetilante. Además, los cambios que se observan en el aumento de la expresión génica son menores cuando el porcentaje de metilación del DNA es mayor.

Los genes de la familia *SFRP* únicamente se utilizaron como control del tratamiento con el agente desmetilante, ya que se ha reportado que estos genes están regulados por metilación del DNA y su expresión disminuye en CaP a través de la hipermetilación del DNA en su región promotora, posiblemente debido a su actividad de supresores de tumor (Perry *et al.*, 2012). Por lo tanto, al observar un restablecimiento en la expresión de estos genes de forma dependiente de la concentración de la 5azadC, se puede afirmar que el tratamiento se realizó de manera adecuada y los resultados obtenidos tanto para estos genes como para *VIAAT* son válidos y no poseen algún tipo de error debido al tratamiento, con la ventaja de que al evaluar 3 genes de la familia *SFRP* se contaba con 3 controles independientes que brindaban mayor confiabilidad al resultado obtenido.

7.2 PATRONES DE METILACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *VIAAT*

Normalmente, la isla CpG en la región promotora de un gen se encuentra desmetilada y los niveles de expresión génica son controlados por los factores de transcripción o reprimidos por otros mecanismos epigenéticos (Jones, 2012). La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos que puede determinar la regulación de la expresión de un gen, pero los diferentes mecanismos epigenéticos actúan en conjunto, a la par de los propios mecanismos genéticos, para reprimir o activar la transcripción.

La expresión del gen *VIAAT* no pudo ser determinada en ninguna de las líneas celulares evaluadas no tratadas con 5azadC por lo que no fue posible correlacionar los datos de expresión con los patrones de metilación de DNA obtenidos en condiciones basales.

En la línea celular NPrEC, la región analizada de la isla CpG se encuentra prácticamente libre de metilación del DNA y, sin embargo, no hay expresión génica. Una suposición que se está tomando en cuenta es que el comportamiento respecto a la metilación del DNA en la región analizada de la isla CpG es representativa del comportamiento que ocurre a lo largo de la isla CpG en el promotor, que es una secuencia más extensa y que cuenta con más dinucleótidos CpG.

Surgen entonces diversas incógnitas sobre los mecanismos precisos de la regulación génica en esta línea celular. La transcripción podría estar suprimida no sólo por metilación del DNA en esta región o en la región a la orilla de la isla CpG, sino por marcas represivas en las histonas, en particular las marcas de metilación en H3K9 y H3K27, o por la regulación de la expresión debida a algún miRNA que interfiera con la transcripción del gen.

De cualquier manera, a simple vista no parece obvio que esta línea celular requiera de las funciones de esta proteína, y en condiciones normales la mayoría de las islas CpG se encuentren desmetiladas. La condición patológica se observa cuando estas islas comienzan a hipermetilarse, lo que ocurre en etapas tempranas de cáncer y principalmente para silenciar genes con actividad de supresores de tumor.

En las líneas celulares LNCaP y PC3 sin tratamiento, donde tampoco hubo expresión del gen *VIAAT*, este efecto podría deberse a que la metilación del DNA en su región promotora sea un mecanismo que podría estar contribuyendo al silenciamiento del gen a través de las MBD o impidiendo la unión de factores de transcripción, por lo que otro aspecto interesante a analizar sería estudiar la situación de los dinucleótidos CpG en sitios de unión a factores de transcripción como SP1, EGR-1 y JUND (**Figura 27**) como una posible alternativa al silenciamiento en la expresión génica.

Sin embargo, ya que incluso en condiciones normales no se expresa este gen, surgen dos interrogantes: el por qué la isla CpG en la región promotora de este gen tiende a hipermetilarse -el cual es un mecanismo de represión de la expresión génica-, y la posible función de la proteína en células de cáncer de próstata y su implicación en el desarrollo de la enfermedad.

Además, con la información obtenida sobre los patrones de metilación del DNA en las líneas celulares evaluadas, que representan etapas progresivas diferentes de la enfermedad, surgen más posibilidades de estudio para determinar en un futuro el por qué y el cómo este gen se ve afectado epigenéticamente, y proveer las bases para el desarrollo como un posible marcador que permita el diagnóstico, determinar la etapa en que se encuentra el tumor y brindar un pronóstico de la enfermedad.

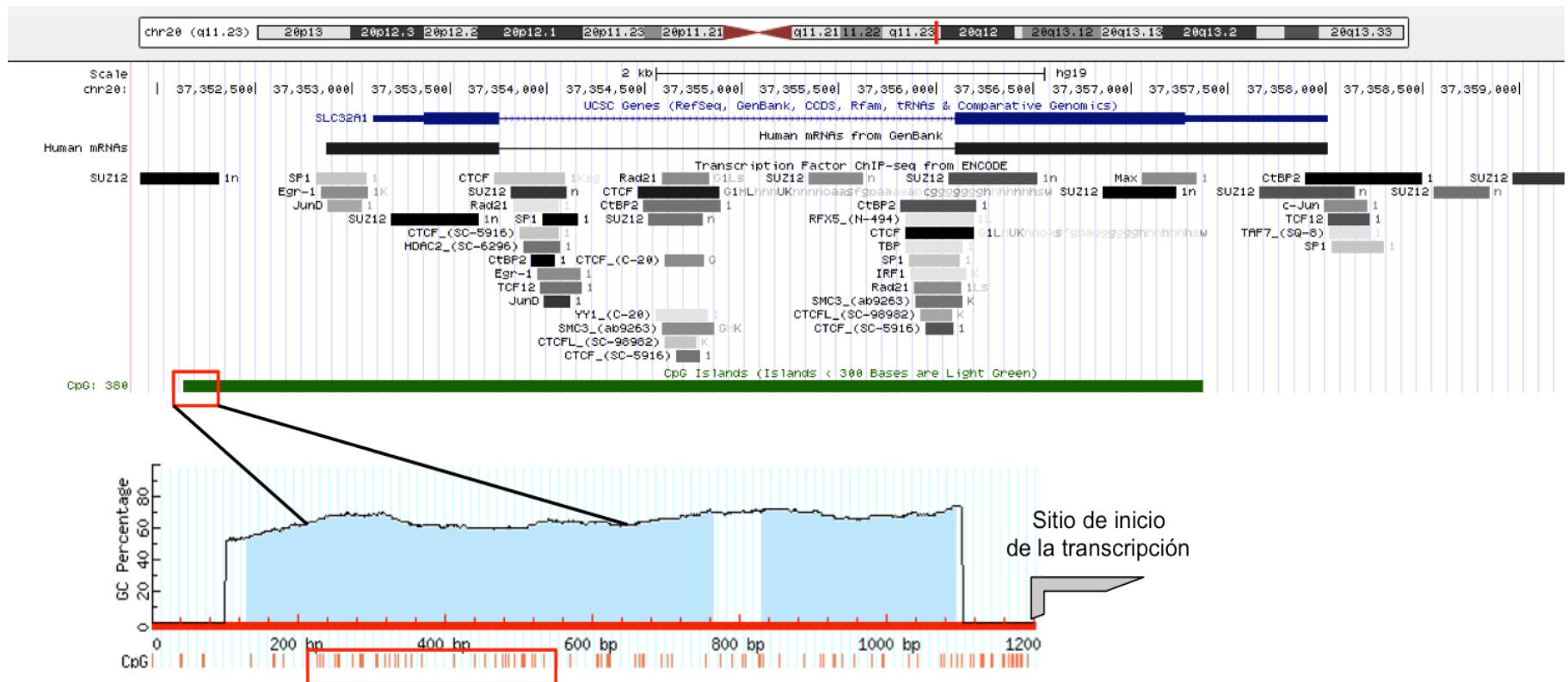


Figura 27. Datos obtenidos del Genome Browser sobre el gen *VIAAT*. En esta imagen podemos observar la localización genómica del gen y su estructura, que consiste en dos exones. Los rectángulos grises que se encuentran en el apartado de Factores de Transcripción representan sitios de unión de factores de transcripción, entre los que destacan SP1, EGR-1 y JUND cerca del sitio de inicio de la transcripción, aunque se describen varios de estos factores a lo largo de todo el gen, enriquecidos al inicio del intrón y del exón 2. En el apartado de Islas CpG se muestra como un rectángulo largo la localización y las regiones que abarca la isla CpG predicha para esta región, ocupando varios de cientos de pares de bases hacia el extremo 5' por arriba del sitio de inicio de transcripción, ambos exones y el intrón. A lo largo de estas 5 242 pb hay 380 CpG. La isla tiene un porcentaje de CG de 62.7% y una proporción de CpG observado entre lo esperado de 0.76. El recuadro en esta barra indica la región analizada en este protocolo experimental, y por debajo un acercamiento con detalles acerca de esa zona, donde dentro del recuadro se encuentran los CpG cuyo estado de metilación fue determinado.

Una de las razones hipotéticas por las que este gen tiene tendencia a ir ganando progresivamente metilación del DNA, puede ser que, por algún mecanismo no identificado aún, el silenciamiento del gen *VIAAT* le proporcione a estas células una ventaja de crecimiento, y que para el desarrollo hacia etapas más avanzadas de la enfermedad sea necesario silenciar completamente el gen mediante la hipermetilación de su isla CpG. Wu y Ho, en 2004, estudiaron un gen que encontraron silenciado en líneas de CaP por metilación del DNA (*PMP24*) y realizaron una transfección de este gen en líneas celulares de CaP donde no se expresaba para evaluar el efecto de la proteína sobre la proliferación, con resultados que indicaban que al expresarse el gen *PMP24* la proliferación de células cancerosas disminuía. Este experimento se podría realizar de igual manera para analizar si el gen *VIAAT* posee también algún efecto antiproliferativo que pudiera estar relacionado con la necesidad de la célula tumoral de silenciarlo.

La hipermetilación de esta región en la isla CpG también puede ser causada por una pérdida de la función de la proteína CTCF. Esta proteína es la encargada de mantener zonas libres de metilación del DNA y su ausencia se relaciona con una dispersión de la metilación que puede afectar promotores de genes (Dávalos-Salas *et al.*, 2011). CTCF puede perder su función al no reconocer sitios de unión a secuencias específicas, lo cual puede ocurrir por mutaciones, o porque la misma metilación del DNA impide la unión de CTCF (Filippova, 2008). Cuando esto ocurre, la metilación del DNA se puede propagar a partir de secuencias metiladas cercanas, como pueden ser secuencias repetitivas o exones. En la **Figura 27** se puede observar que a lo largo de la extensión del gen *VIAAT* parece haber varios sitios de unión de CTCF en los cuales podría ocurrir lo mencionado anteriormente y cuyo estudio valdría la pena realizar en las líneas celulares utilizadas para conocer si una alteración en la secuencia o en la metilación del DNA de esa región podría explicar la propagación de la metilación.

Otro mecanismo que puede explicar la hipermetilación que se observa en etapas progresivas en estas líneas celulares podría ser por un mecanismo conocido como silenciamiento epigenético de largo alcance (LRES, por sus siglas en inglés), que involucra una disminución en la expresión de genes que se encuentren ubicados en un determinado segmento largo del cromosoma (Devaney, 2011).

Este mecanismo involucra marcas en las histonas de represión y metilación del DNA para silenciar genes en segmentos cromosómicos de hasta 4 Mb de longitud. Devaney y colaboradores en su artículo publicado en el 2011, aprovecharon este fenómeno de silenciamiento epigenético para proponer algunos marcadores de metilación del DNA de genes que se encuentran dentro de estas regiones silenciadas, para así, junto con el ya conocido marcador de metilación del DNA de *GSTP*, poder brindar mayor información sobre el estado de la enfermedad para poner brindar un diagnóstico más completo, ya que el análisis y el uso combinado de diferentes marcadores puede aumentar la sensibilidad y especificidad de un resultado.

Una característica de este silenciamiento radica en que, en las regiones genómicas que muestran LRES, la hipermetilación del DNA de algunos genes se debe a que éstos presentan actividades antitumorales, mientras que la que se presenta en otros únicamente se debe a su presencia dentro de la región y a su cercanía con ellos. Esto podría hacer surgir la hipótesis de que la isla CpG del gen *VIAAT* tiene tendencia a hipermetilarse conforme avanza la enfermedad debido a este mecanismo. Se sabe que un gen cercano –aproximadamente a 15 kb hacia el extremo 3’-, llamado *ACTR5*, tiene funciones de reparación del DNA, por lo que podría formar parte de un conjunto de genes silenciados por LRES, brindando ventaja a la célula tumoral. El LRES es un fenómeno que abarca regiones genómicas extensas y podría también estar causando una ganancia en la metilación del DNA del gen *VIAAT*, simplemente por su cercanía y ubicación dentro de esta región. Sería necesario poseer información sobre el estado de metilación del DNA del gen *ACTR5* para conocer si también sufre hipermetilación durante el proceso de desarrollo de la enfermedad y en qué etapa ocurre este cambio, o sobre la existencia de otros genes en *loci* cercanos que también posean actividad antitumoral que contribuyan al LRES.

Otro dato que sustentaría la hipótesis de la hipermetilación de la isla CpG del gen *VIAAT* es que la isla CpG del gen *PMP24* se sabe ya que se encuentra hipermetilada en fases Al comparado con fases AD (Wu y Ho, 2004), comportamiento similar al que presenta el gen *VIAAT*. Ambos genes se encuentran en *locus* relativamente cercanos, dentro de una distancia a la que el LRES podría seguir teniendo efecto. Además, Wu y Ho discuten el hecho de que llama la atención que *PMP24* se encuentra cerca de una

región reportada en 2001 por Zheng y colaboradores como de susceptibilidad a CaP, la región 20q13, sin que el mecanismo preciso esté bien determinado. *VIAAT* también es un gen que se encuentra cerca de esta zona y posiblemente haya una correlación entre estos datos que valdría la pena estudiar.

En cuanto a la función de *VIAAT*, antes de los resultados obtenidos en este trabajo, existía la hipótesis de que hubiera una relación entre su expresión y la vía GABAérgica. *VIAAT* es la proteína encargada de transportar GABA hacia vesículas, y hay evidencia de que la vía GABAérgica está involucrada en procesos carcinogénicos y en el progreso de tumores, incluido el de próstata (Azuma, 2003; Young y Bordey, 2009). Esto indicaba que posiblemente *VIAAT* de alguna manera podría estar cooperando con el efecto de GABA y de la vía GABAérgica en las células de cáncer de próstata. Sin embargo, al observar poca o nula expresión de este gen tanto en NPrEC como en LNCaP y PC3, y el hecho de que la metilación del DNA aumente hacia la etapa de independencia de andrógenos podría indicar que la vía GABAérgica funciona independientemente de la función de *VIAAT*.

Los patrones de metilación del DNA obtenidos en la región estudiada de la isla CpG en el promotor del gen *VIAAT* en NPrEC, LNCaP y PC3 permiten observar que hay dinucleótidos CpG particulares cuyo estado de metilación del DNA depende de la línea celular, lo cual permite diferenciar una condición de otra. Esta información podría ser el origen de estudios enfocados a utilizar estos datos en el diseño de un marcador que permita –incluso desde el momento en que se toma la biopsia para que el patólogo la analice y dé su diagnóstico–, brindar un pronóstico sobre el estado y la probabilidad de desarrollar CaP AI, para así poder ofrecer un tratamiento adecuado desde el inicio. Los datos que brindaría este marcador estarían basados tanto en el porcentaje de metilación del DNA de alguna región como en el estado de metilación de ciertos CpG.

Para poder desarrollar un marcador, lo cual es un proceso muy complicado, es necesario el análisis de otras líneas celulares y evaluar si comparten las características descritas en este trabajo. En caso afirmativo, se procedería a trasladar esta información al análisis y estudio de un gran grupo de muestras de tejidos de pacientes con características clínicas bien definidas para poder establecer una correlación entre éstas

y el estado de metilación del DNA de este gen. Al obtener clasificaciones y parámetros bien definidos se pueden agrupar los datos y caracterizar cierta etapa de la enfermedad. De este modo sería posible asignar un resultado, obtenido en algún tipo de estudio o análisis, a uno de estos grupos y posiblemente predecir un resultado. Sería adecuado también estudiar la metilación del DNA en la región analizada en diferentes patologías de la próstata para observar su comportamiento y evaluar la utilidad de un marcador enfocado en la región aquí analizada, para analizar si también es capaz de diferenciar entre patologías que muestran signos clínicos parecidos.

Obtener estos datos para su evaluación podría llevarse a cabo por diferentes metodologías. Por ejemplo, la MSP (PCR sensible a la metilación, por sus siglas en inglés), que permite diferenciar, con los *primers* adecuados, si un fragmento de DNA se encuentra metilado o no. También resulta útil una qPCR, diseñada con *primers* y sondas enfocadas en dinucleótidos CpG con metilación diferencial y que, también por el porcentaje de metilación, permitan su clasificación dentro de un grupo que represente una etapa determinada de la enfermedad. El estudio realizado por Truong y colaboradores en 2012 serviría como base, ya que ellos de igual manera evaluaron por esta metodología el porcentaje de metilación del DNA en líneas celulares de CaP para ciertos genes que se encontraban diferencialmente metilados. La secuenciación directa también podría ser una técnica empleada; sin embargo, es un poco más laboriosa y las dos metodologías mencionadas anteriormente resultan más prácticas.

Se debe considerar también que únicamente se evaluaron los patrones de metilación del DNA en una pequeña región de la isla CpG de este gen, la cual consta de 380 dinucleótidos CpG y abarca prácticamente la totalidad del gen, tanto su intrón como sus dos exones (**Figura 27**). La región analizada brinda información sobre el estado de metilación de tan sólo 33 dinucleótidos CpG. Sin embargo, hay evidencia experimental de que los CpG que se encuentran en el exón 2 del gen muestran el mismo comportamiento y tendencia en cuanto al porcentaje de metilación observado en la región promotora y fue evaluada en las mismas líneas celulares (Rodríguez Dorantes, en preparación). Esta información da indicios, aunque no asegura, que los patrones de metilación del DNA obtenidos para la región promotora del gen *VIAAT* pueden representar lo que ocurre a lo largo de toda la isla CpG.

Finalmente, los datos en este trabajo brindan información que, en caso de que pueda contribuir al desarrollo de un marcador más para CaP, éste pueda también ser incorporado a un panel de otros marcadores de metilación del DNA, entre otras características, que permitan un mejor y más temprano y confiable diagnóstico y pronóstico. Además, este panel en conjunto podría servir para diferenciar HBP de CaP o de alguna otra enfermedad de la próstata, ya que hoy en día mediante el sólo uso del APE no es posible y aún hay muchos problemas para poder brindar un diagnóstico rápido y confiable, lo cual implica un retraso en la aplicación del tratamiento correcto que mejore la salud del paciente desde las primeras etapas de la enfermedad y que resulte en una mejora en su calidad de vida.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los porcentajes de metilación de una región que contiene 33 CpG de una isla de 380 CpG ubicada en la zona promotora del gen *VIAAT* para las líneas celulares NPrEC, LNCaP –dependiente de andrógenos- y PC3 –independiente de andrógenos-, que representan diferentes etapas progresivas de cáncer de próstata, observándose una ganancia general en la metilación del DNA relacionada con el progreso de la enfermedad, pero no se observa relación entre el estado de metilación y su expresión.
- En condiciones de cultivo normales no fue posible detectar la presencia del transcrito del gen *VIAAT*, lo cual indica que no se expresa en las líneas celulares evaluadas.
- El tratamiento con el fármaco desmetilante promueve la expresión del gen *VIAAT*, lo que indica que la metilación del DNA es un mecanismo que interviene en la regulación de la expresión de este gen, ya sea directa o indirectamente.
- Las líneas celulares NPrEC, LNCaP y PC3 muestran patrones de metilación del DNA diferentes en la región analizada, lo que permite clasificarlas de acuerdo a los estado de metilación de ciertos dinucleótidos CpG. Hay un número mayor de CpG metilados en la línea celular PC3, que presenta un porcentaje de metilación del DNA en la región analizada de 83.6%; un número menor en LNCaP, con un porcentaje de 26.7%; y casi ninguno en NPrEC, que tiene un porcentaje de 1.5%. Se observa que cada línea celular posee un patrón y un porcentaje de metilación del DNA característico.

9. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar un estudio funcional de VIAAT para observar si la expresión de la proteína ejerce algún efecto antitumoral.
- ✓ Evaluar la presencia de ciertas marcas de histonas para determinar el mecanismo epigenético de represión de la transcripción.
- ✓ Evaluar si la adición de un fármaco inhibidor de las desacetilasas de histonas (HDAC) tiene algún efecto sobre la expresión del *VIAAT*.
- ✓ Analizar marcas epigenéticas en regiones vecinas para relacionar la hipermetilación del DNA con un posible mecanismo de LRES.
- ✓ Observar el comportamiento de estos patrones y porcentajes de metilación en otras líneas celulares dependientes de andrógenos (como 22Rv1 y VCaP) y en líneas independientes de andrógenos (como DU145) para determinar si estos resultados concuerdan con lo aquí reportado. Además, evaluarlo también en pacientes con características clínicas definidas para hallar correlaciones entre éstas y los estados diferenciales de metilación del DNA para el desarrollo o incorporación a un panel mayor de marcadores de metilación para ofrecer un panorama más completo que contribuya a un mejor diagnóstico y pronóstico.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, Hahn NM. 2011. "Epigenetics in Prostate Cancer." *Prostate Cancer* 2011: 1–12.
2. Attar R M, Takimoto CH, Gottardis MM. 2009. "Castration-Resistant Prostate Cancer: Locking Up the Molecular Escape Routes." *Clinical Cancer Research* 15 (10): 3251–3255.
3. Azuma H, Inamoto T, Sakamoto T, Kiyama S, Ubai T, Shinohara Y, Maemura K, Tsuji M, Segawa N, Masuda H, Takahara K, Katsuoka Y, Watanabe M. 2003. "Gamma-Aminobutyric Acid as a Promoting Factor of Cancer Metastasis; Induction of Matrix Metalloproteinase Production Is Potentially Its Underlying Mechanism" *Cancer Research* 63 (23): 8090–8096.
4. Barros SP, Offenbacher S. 2009. "Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease." *Journal of Dental Research* 88 (5): 400–408.
5. Bastian, PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. 2004. "Molecular Biomarker in Prostate Cancer: the Role of CpG Island Hypermethylation." *European Urology* 46 (6): 698–708.
6. Bedet C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B. 2000. "Constitutive Phosphorylation of the Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter in Rat Central Nervous System" *Journal of Neurochemistry* 75 (4): 1654–1663
7. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. 2009. "An Operational Definition of Epigenetics." *Genes & Development* 23 (7): 781–783.
8. Bird A. 2002. "DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory." *Genes & Development* 16 (1): 6–21.
9. Brait M, Sidransky D. 2011. "Cancer Epigenetics: Above and Beyond." *Toxicology Mechanisms and Methods* 21 (4): 275–288.
10. Cherlyn SYT, Woon PS, Liu JJ, Ong WY, Tsai GC, Sim K. 2010. "Genetic Association Studies of Glutamate, GABA and Related Genes in Schizophrenia and Bipolar Disorder: a Decade of Advance." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34 (6): 958–977.
11. Chessler SD, Simonson WT, Sweet IR, Hammerle LP. 2002. "Expression of the Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter in Pancreatic Islet Cells. Distribution of the Transporter Within Rat Islets." *Diabetes* 51 (6): 1763–1771.
12. Cheung, HH, Lee TL, Rennert OM, and Chan WY. 2009. "DNA Methylation of Cancer Genome." *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 87 (4): 335–350.
13. Chin SP, Dickinson JL, Holloway AF. 2011. "Epigenetic Regulation of Prostate Cancer." *Clinical Epigenetics* 2 (2): 151–169.
14. Christman JK. 2002. "5-Azacytidine and 5-Aza-2'-Deoxycytidine as Inhibitors of DNA Methylation: Mechanistic Studies and Their Implications for Cancer Therapy." *Oncogene* 21 (35): 5483–5495.
15. Cooper CS, Foster CS. 2009. "Concepts of Epigenetics in Prostate Cancer Development." *British Journal of Cancer* 100 (2): 240–245.
16. Craft N, Chhor C, Tran C, Beldegrun A, DeKernion J, Witte ON, Said J, Reiter RE, Sawyers CL. 1999. "Evidence for Clonal Outgrowth of Androgen-Independent Prostate Cancer Cells From Androgen-Dependent Tumors Through a Two-Step Process." *Cancer Research* 59 (19): 5030–

5036.

17. Dawson MA, Kouzarides T. 2012. "Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy." *Cell* 150 (1): 12–27.
18. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. "Inflammation in Prostate Carcinogenesis." *Nature Reviews: Cancer* 7 (4): 256–269.
19. Dehm SM, Tindall DJ. 2007. "Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer." *Molecular Endocrinology* 21 (12): 2855–2863.
20. Devaney J, Stirzaker C, Qu W, Song JZ, Statham AL, Patterson KI, Horvath LG, Tabor B, Coolen MW, Hulf T, Kench JG, Henshall SM, Benito RP, Haynes AM, Mayor R, Peinado MA, Sutherland RL, Clark SJ. 2011. "Epigenetic Deregulation Across Chromosome 2q14.2 Differentiates Normal From Prostate Cancer and Provides a Regional Panel of Novel DNA Methylation Cancer Biomarkers." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 20 (1): 148–159.
21. Devlin HL, Mudryj M. 2009. "Progression of Prostate Cancer: Multiple Pathways to Androgen Independence." *Cancer Letters* 274 (2): 177–186.
22. Ebihara S, Obata K, Yanagawa Y. 2003. "Mouse Vesicular GABA Transporter Gene: Genomic Organization, Transcriptional Regulation and Chromosomal Localization." *Molecular Brain Research* 110 (1): 126–139.
23. Ehrlich M. 2009. "DNA Hypomethylation in Cancer Cells." *Epigenomics* 1 (2): 239–259.
24. Esteller M. 2002. "CpG Island Hypermethylation and Tumor Suppressor Genes: a Booming Present, a Brighter Future." *Oncogene* 21 (35): 5427–5440.
25. Esteller M. 2011. "Epigenetic Changes in Cancer." *F1000 Biology Reports* 3:9.
26. Feldman BJ, Feldman D. 2001. "The Development of Androgen-Independent Prostate Cancer." *Nature Reviews: Cancer* 1 (1): 34–45.
27. Friedlander TW, Roy R, Tomlins SA, Ngo VT, Kobayashi Y, Azameera A, Rubin MA, Pienta KJ, Chinnaiyan A, Ittmann MM, Ryan CJ, Paris PL. 2012. "Common Structural and Epigenetic Changes in the Genome of Castration-Resistant Prostate Cancer." *Cancer Research* 72 (3): 616–625.
28. Gasnier B. 2004. "The SLC32 Transporter, a Key Protein for the Synaptic Release of Inhibitory Amino Acids." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5): 756–759.
29. Gingrich JR, Barrios RJ, Kattan MW, Nahm HS, Finegold MJ, Greenberg NM. 1997. "Androgen-Independent Prostate Cancer Progression in the TRAMP Model." *Cancer Research* 57 (21): 4687–4691.
30. Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV. 2006. "The Peripheral GABAergic System as a Target in Endocrine Disorders." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 124 (1-2): 1–8.
31. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. 2008. "DNA Methylation in Development and Human Disease." *Mutation Research* 647 (1-2): 30–38.
32. Gravina GL, Marampon F, Piccolella M, Motta M, Ventura L, Pomante R, Popov VM, Zani BM, Pestell RG, Tombolini V, Jannini EA, Festuccia C. 2011. "Hormonal Therapy Promotes Hormone-Resistant Phenotype by Increasing DNMT Activity and Expression in Prostate Cancer Models." *Endocrinology* 152 (12): 4550–4561.
33. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. 2012. "Androgen Action and Metabolism in Prostate Cancer." *Molecular and Cellular Endocrinology* 1–11.

34. Hamilton JP. 2011. "Epigenetics: Principles and Practice." *Digestive Diseases* 29 (2): 130–135.
35. Heemers HV, Tindall DJ. 2007. "Androgen Receptor (AR) Coregulators: a Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex." *Endocrine Reviews* 28 (7) : 778–808.
36. Herceg Z, Vaissière T. 2011. "Epigenetic Mechanisms and Cancer: an Interface Between the Environment and the Genome." *Epigenetics* 6 (7): 804–819.
37. Hoffman RM. 2011. "Clinical Practice. Screening for Prostate Cancer." *The New England Journal of Medicine* 365 (21): 2013–2019.
38. IARC, 2010. "Globocan, 2008."
39. INEGI. 2013. *Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer*.
40. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabunciyan S, Feinberg AP. 2009. "The Human Colon Cancer Methylome Shows Similar Hypo- and Hypermethylation at Conserved Tissue-Specific CpG Island Shores." *Nature Genetics* 41 (2): 178–186.
41. Jeltsch A. 2002. "Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases." *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology* 3 (4): 274–293.
42. Jones PA. 2012. "Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and Beyond." *Nature Reviews. Genetics* 13 (7): 484–492.
43. Jones, PA, Baylin SB. 2002. "The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer." *Nature Reviews. Genetics* 3 (6): 415–428.
44. Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y. 2009. "Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter Is a Cl⁻/Gamma-Aminobutyrate Co-Transporter." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 35073–35078.
45. Knudsen KE, Kelly WK. 2011. "Outsmarting Androgen Receptor: Creative Approaches for Targeting Aberrant Androgen Signaling in Advanced Prostate Cancer." *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 6 (3): 483–493.
46. Li LC, Dahiya R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18 (11):1427-31.
47. Li LC, Okino ST, Dahiya R. 2004. "DNA Methylation in Prostate Cancer." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1704 (2): 87–102.
48. Majumdar S, Buckles E, Estrada J, Koochekpour S. 2011. "Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer." *Current Genomics* 12 (7): 486–505.
49. Malousi A, Koidou S. 2012. "DNA Hypermethylation of Alternatively Spliced and Repeat Sequences in Humans." *Molecular Genetics and Genomics* 287 (8): 631–642.
50. Meyer LR, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kuhn RM, Wong M, Sloan CA, Rosenbloom KR, Roe G, Rhead B, Raney BJ, Pohl A, Malladi VS, Li CH, Lee BT, Learned K, Kirkup V, Hsu F, Heitner S, Harte RA, Haeussler M, Guruvadoo L, Goldman M, Giardine BM, Fujita PA, Dreszer TR, Diekhans M, Cline MS, Clawson H, Barber GP, Haussler D, and Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 15. <http://genome.ucsc.edu/>.
51. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. 2009. "Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications." *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (12): 3927–3937.

52. Moore LD, Le T, Fan G. 2012. "DNA Methylation and Its Basic Function" *Neuropsychopharmacology Reviews*: 1–16.
53. Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. 2009. "Epigenetic Alterations in Human Prostate Cancers." *Endocrinology* 150 (9): 3991–4002.
54. Niu Y, Altuwaijri S, Lai KP, Wu CT, Ricke WA, Messing EM, Yao J, Yeh S, Chang C. 2008. "Androgen Receptor Is a Tumor Suppressor and Proliferator in Prostate Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (34): 12182–12187.
55. Oh WJ, Noggle SA, Maddox DM, Condie BG. 2005. "The Mouse Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter Gene: Expression During Embryogenesis, Analysis of Its Core Promoter in Neural Stem Cells and a Reconsideration of Its Alternate Splicing." *Gene* 351: 39–49.
56. OMS. 2013. *Nota Descriptiva N°297*.
57. Padilla-Rodríguez, AL. 2008. "Lineamientos Para El Manejo, Diagnóstico Y Reporte De Cáncer De Próstata en Especímenes De Prostatectomía Radical." *Patología* 46 (3): 248-62
58. Parray A, Siddique HR, Nanda S, Konety BR, Saleem M. 2012. "Castration-Resistant Prostate Cancer: Potential Targets and Therapies." *Biologics: Targets and Therapy* (6): 267-276
59. Passoni NM, Di Trapani E, Suardi N, Gallina A, Abdollah F, Bianchi M, Picchio M, Giovacchini G, Messa C, Rigatti P, Montorso F, Briganti A. 2012. "Clinical and Diagnostic Assessment for Therapeutic Decisions in Prostate Cancer." *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 56 (4): 321–330.
60. Pelizzola M, Ecker JR. 2011. "The DNA Methylome." *FEBS Letters* 585 (13): 1994–2000.
61. Perry AS, O'Hurley G, Raheem OM, Brennan K, Wong S, O'Grady A, Kennedy AM, Marignol L, Murphy TM, Sullivan L, Barrett C, Loftus B, Thornhill J, Hewitt SM, Lawler M, Kay E, Lynch T, Hollywood D. 2012. "Gene Expression and Epigenetic Discovery Screen Reveal Methylation of SFRP2 in Prostate Cancer." *International Journal of Cancer* 132 (8): 1771–1780.
62. Pienta KJ. 2006. "Mechanisms Underlying the Development of Androgen-Independent Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 12 (6): 1665–1671.
63. Portela A, Esteller M. 2010. "Epigenetic Modifications and Human Disease." *Nature Biotechnology* 28 (10): 1057–1068.
64. Promega Corporation. 2010. "pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual, TM042": 1–28.
65. Putiri EL, Robertson KD. 2010. "Epigenetic Mechanisms and Genome Stability." *Clinical Epigenetics* 2 (2): 299–314.
66. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. 2001. "The Marks, Mechanisms and Memory of Epigenetic States in Mammals." *The Biochemical Journal* 356 (1): 1–10.
67. Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. 2004. "Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica." *Revista De Investigación Clínica* 56 (1) 56–71.
68. Sadar MD, Akopian VA, Beraldi E. 2002. "Characterization of a New in Vivo Hollow Fiber Model for the Study of Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence." *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (8): 629–637.
69. Schiöth HB, Roshanbin S, Hägglund MGA, Fredriksson R. 2013. "Evolutionary Origin of Amino Acid Transporter Families SLC32, SLC36 and SLC38 and Physiological, Pathological and

- Therapeutic Aspects." *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2-3): 571–585.
70. Schuller HM, Al-Wadei HAN. 2010. "Neurotransmitter Receptors as Central Regulators of Pancreatic Cancer." *Future Oncology* 6 (2): 221–228.
71. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. 2010. "Epigenetics in Cancer." *Carcinogenesis* 31 (1): 27–36.
72. Song CX, He C. 2011. "The Hunt for 5-Hydroxymethylcytosine: the Sixth Base." *Epigenomics* 3 (5): 521–523.
73. Suckow AT. 2006. "Identification and Characterization of a Novel Isoform of the Vesicular - Aminobutyric Acid Transporter with Glucose-Regulated Expression in Rat Islets." *Journal of Molecular Endocrinology* 36 (1): 187–199.
74. Sundberg BE, Wååg E, Jacobsson JA, Stephansson O, Rumaks J, Svirskis S, Alsiö J, Roman E, Ebendal T, Klusa V, Fredriksson R. 2008. "The Evolutionary History and Tissue Mapping of Amino Acid Transporters Belonging to Solute Carrier Families SLC32, SLC36, and SLC38." *Journal of Molecular Neuroscience* 35 (2): 179–193.
75. Suzuki H, Ito H. 1999. Role of androgen receptor in prostate cancer *Asian Journal of Andrology* 1 (3): 81-85
76. Tamburrino L, Salvianti F, Marchiani S, Pinzani P, Nesi G, Serni S, Forti G, Baldi E. 2012. "Androgen Receptor (AR) Expression in Prostate Cancer and Progression of the Tumor: Lessons From Cell Lines, Animal Models and Human Specimens." *Steroids* (2012): 1–6.
77. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM. 1996. "Mutations in the Androgen Receptor Gene Are Associated with Progression of Human Prostate Cancer to Androgen Independence." *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2 (2): 277–285.
78. Truong M, Yang B, Wagner J, Kobayashi Y, Rajamanickam V, Brooks J, Jarrard DF. 2012. "Even-Skipped Homeobox 1 Is Frequently Hypermethylated in Prostate Cancer and Predicts PSA Recurrence" *British Journal of Cancer*: 1–8.
79. Tsai HC, Baylin SB. 2011. "Cancer Epigenetics: Linking Basic Biology to Clinical Medicine." *Cell Research* 21: 502-517.
80. Watanabe M, Maemura K, Oki K, Shiraishi N, Shibayama Y, Katsu K. 2006. "Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) and Cell Proliferation: Focus on Cancer Cells." *Histology and Histopathology* 21 (10): 1135–1141.
81. Wu M, Ho SM. 2004. "PMP24, a Gene Identified by MSRF, Undergoes DNA Hypermethylation-Associated Gene Silencing During Cancer Progression in an LNCaP Model." *Oncogene* 23 (1): 250–259.
82. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, Irizarry RA, Morgan J, Hicks J, DeWeese TL, Isaacs WB, Bova GS, De Marzo AM, Nelson WG. 2008. "DNA Hypomethylation Arises Later in Prostate Cancer Progression Than CpG Island Hypermethylation and Contributes to Metastatic Tumor Heterogeneity." *Cancer Research* 68 (21): 8954–8967.
83. Young SZ, Bordey A. 2009. "GABA's Control of Stem and Cancer Cell Proliferation in Adult Neural and Peripheral Niches." *Physiology* 24: 171-185
84. Zheng S, Xu J, Isaacs S, Wiley K, Chang B, Bleecker E, Walsh P, Trent J, Meyers D, Isaacs W. 2001. "Evidence for a Prostate Cancer Linkage to Chromosome 20 in 159 Hereditary Prostate Cancer Families." *Human Genetics* 108 (5): 430–435.

11. ANEXO

- Secuencia utilizada para obtener los *primers* de metilación en el software MethPrimer. Esta secuencia abarca 1200 pb hacia el extremo 5' desde el sitio de inicio de la transcripción del gen *VIAAT*, obtenida del Genome Browser. Ubicación: chr20:37 351 906 – 37 353 105.

GTAATCCAACACACTAGCTCTGGCACACACACTGGAATGCGCGCAAACCACACAGACACAGAACACACGC
GGTTACCAAACCTCATTCTCAGAGGCCACACTGATCCAACCTCAAGCAGAGTCTGATACAGCATCGGTCTT
TGTCTCTGGGTCTCTCCCTTACTCGCGCTCACACACCCGTACCCCAATCAACACAAACAGCCCAAGCTTTC
ACAGCCTGGAGGCGGCCGTTCGGAGCAGGGCCCCAGCGCACCGCGAGCCTCTGCTTCCTCCGCCTTGCAGCG
CCGCGAGCCCTTCTTTCCTCCGCGCCTGGCCCCGTCTGCGCCCCCTCTCGGCGTGGGCATTTCGCAGACCCGC
TAGGAGGCTGACGAGAGGTGTCCTCATAGAGTCTGCCTTCTTCCAGACCCCCAAACGAAAAGAAAGAGAA
AAGCCAACCTTTCGCCTCCATTCTGCACGCATTTGGAGAGCGGCTGGTGGCGAGCGATCCGCACAATCGCT
TCCCTCGCGGCGTCCCTGGACGGGCGGAGAGAACC CGGGT GACTGAGCCTGAGGCTGAGCTTCTTGGGAG
CGATCCATGCCAGCCACTTCTACCTTCAAGGGGACTCGCGGCCGGGTTTACGCGCGAAGGATGGGTGCCA
GGGAAACTGACTTATAGACGACCCGCTCCGCGAGAGACTGACAACCTCAGTCTCGGGCTTTCGGGGCGCC
CAGACCAGTCTTAGCCAGAGGATCTGGGGCTGCACAGCTCCCGGACCCTGGAGGGGGTGGTCCGGGGGTG
GGAGACTGCGAGCATCAGCCCACGCCGGCCCCCTCCACCCCTGCGGCGGCGAGGTGGGAAGGGCCAGGATG
CGAGCTTAGCACCTCCCCTAGAAATGCAGCACTTCGCCCCCCCCACCTCCCCTGCCCTCGGCGCTCCCTCTT
TCACGCGCTCCCTCCCGCCTCCTTCCCAAGGGCGCCCTTCTTCTGCCCCAGCTCACGTCTGAATCCCTCG
GCGCCCCCTTCTCTTCTCCTAGCCCCTTCTCACGTCCCCTGCCTCCGGGTATTTCTCTCTCCAATCCC
CCACCCCGCACCGCCTGATTCCGAGGGGCGGGAGCGCATTGGGCTGCGCACGGGTGGGGGCGCCGCGCCA
GCTTCGCGTAGCTGCTCTGACGCCGCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCCGCAGCCCAG

- Secuencia de referencia original que contiene el fragmento amplificado por PCR para el análisis de metilación del DNA.

AGCCCAAGCTTTCACAGCCTGGAGGCGGCCGTTCGGAGCAGGGCCCCAGCGCACCGCGAGCCTCTGCTTCCT
CCGCCTTGCAGCGCCGCGAGCCCTTCTTTCTCCTCCGCGCCTGGCCCCGTCTGCGCCCCCTCTCGGCGTGGGCA
TTCGCAGACCCGCTAGGAGGCTGACGAGAGGTGTCCTCATAGAGTCTGCCTTCTTCCAGACCCCCAAACG
AAAAGAAAGAGAAAAGCCAACCTTTCGCCTCCATTCTGCACGCATTTGGAGAGCGGCTGGTGGCGAGCGAT
CCGCACAATCGCTTCCCTCGCGGCGTCCCTGGACGGGCGGAGAGAACC CGGGT GACTGAGCCTGAGGCTGA
GCTT