



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del papel de los repetidos CAG del receptor de andrógenos en  
cáncer de próstata

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Maricruz González Aguilar**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Greco Hernández Ramírez  
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Ángeles García Becerra  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez  
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Septiembre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO

PRESIDENTE	Camacho Arroyo Ignacio
VOCAL	Robles Flores Martha
VOCAL	Barrera Hernández David
VOCAL	García López Patricia
SECRETARIO	Dueñas González Alfonso

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE PROYECTO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE TRADUCCIÓN Y CÁNCER DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:  
DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

---

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:  
MARICRUZ GONZÁLEZ AGUILAR

---

(nombre y firma)

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
I. INTRODUCCIÓN	
1. La próstata.....	1
2. Cáncer de próstata (CaP).....	1
3. Epidemiología.....	1
4. Fondo genético del CaP.....	2
5. Factores de riesgo.....	3
6. Diagnóstico y tratamiento actual.....	4
7. Andrógenos.....	5
8. Receptor de andrógenos, gen (AR) y proteína (RA).....	6
9. Mecanismos de acción de los andrógenos.....	7
10. Variantes del RA.....	8
11. Correguladores del RA.....	10
12. Cambios del RA en CaP.....	12
13. Bioquímica de repetidos CAG.....	12
14. Repetidos CAG y fondo genético poblacional.....	15
II. JUSTIFICACIÓN.....	16
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Extracción de ADN genómico de muestras de sangre.....	19
2. Electroforesis en gel de agarosa.....	20
3. Secuenciación Sanger.....	21
4. Clonación de los fragmentos con 12, 22 y 33 CAG y la etiqueta de histidinas (tag His6X) en el vector TA (pTZ57/T).....	22
5. Transformación en bacterias DH5 $\alpha$ .....	25
6. Subclonación de los vectores TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG y TA-His6X en el vector pCMV-hAR.....	26
7. Clonación del fragmento P en el vector TA (pTZ57/T).....	29
8. Subclonación del vector TA-P en el vector pCMV-hAR.....	30

9. Visualización y análisis de secuencias.....	31
10. Cultivo de células PC3.....	31
11. Transfección de células PC3.....	32
12. Cuantificación de proteínas.....	32
13. SDS-PAGE y Western blot.....	33
14. Análisis de interacción de proteínas por ensayo de "pull down".....	33
VI. RESULTADOS.....	35
VII. DISCUSIÓN.....	46
VIII. CONCLUSIÓN.....	49
IX. AVANCES Y PENDIENTES.....	50
X. REFERENCIAS.....	51
XI. ANEXOS.....	56

# ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Receptor de andrógenos, gen
ARE	Elementos de respuesta a andrógenos
APE	Antígeno prostático específico
ARN	Ácido ribonucleico
CAG	Codón que codifica para glutamina
CaP	Cáncer de próstata
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
DHT	Dihidrotestosterona
DBD	Dominio de unión al ADN
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EXO	Exonucleasa
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína verde fluorescente
HPB	hiperplasia prostática benigna
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
LBD	Dominio de unión al ligando
NDT	Dominio amino terminal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBT	Solución salina tamponada con fosfato más Tween20 (0.2%)
Poli-Q	Poliglutamina
RA	Receptor de andrógenos, proteína
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
UV	Radiación ultravioleta
WB	Western blot
WT	Tipo salvaje, del inglés <i>Wild type</i>

## **Unidades**

°C	Grados Celsius
h	Hora
kDa	Kilodalton
min	Minuto(s)
s	Segundos
V	Volt
W	Watt
rpm	Revoluciones por minuto

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Nuevos casos de cáncer en población masculina mexicana reportados en 2020	2
Figura 2	Estructura química de la testosterona y la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT)	5
Figura 3	El gen y la proteína del receptor de andrógenos humano	6
Figura 4	Mecanismo de acción genómico del RA	8
Figura 5	Variantes de <i>splicing</i> alternativo del AR	9
Figura 6	Interacciones entre el RA y sus correguladores	10
Figura 7	Mapa del vector pTZ57/T o TA ( <i>Fermentas</i> )	24
Figura 8	Mapa del vector pCMV-hAR de <i>addgene</i>	26
Figura 9	Repetidos CAG en voluntarios sanos	35
Figura 10	Electroforesis en gel del exón 1 del AR	36
Figura 11	Visualización de la secuenciación de repetidos CAG	36
Figura 12	Mapa de los vectores TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG	37
Figura 13	Mapa del vector TA-His6X	37
Figura 14	Mapa del vector pCMV-hAR-His6X	38
Figura 15	Acercamiento al mapa del vector pCMV-HAR	38
Figura 16	Expresión de los vectores pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X en células PC3	41
Figura 17	Mapa del vector TA-P	42
Figura 18	Mapa del vector pCMV-hAR-His6X-P	42
Figura 19	Secuencia del vector pCMV-hAR-His6X-P	43
Figura 20	Expresión del vector pCMV-hAR-His6X-P en células PC3	44
Figura 21	Ensayo de Pull-down para purificación de la proteína RA-His6X	44
Figura 22	Mapa de los vectores pCMV-hAR-12CAG, pCMV-hAR-22CAG y pCMV-hAR-33CAG	45

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Coactivadores del RA	11
Tabla 2	Correpresores del RA	11
Tabla 3	Meta-análisis de repetidos CAG y su asociación con el riesgo de CaP	15
Tabla 4	Oligonucleótidos del exón 1a (AR)	19
Tabla 5	PCR con Taq ADN Polymerase High Fidelity	20
Tabla 6	Condiciones del termociclador para Taq ADN Polymerase High Fidelity	20
Tabla 7	Marcaje de ADN con BigDye™ Terminator v3.1	21
Tabla 8	Condiciones del termociclador para Marcaje de ADN con BigDye™ Terminator v3.1	21
Tabla 9	Oligonucleótidos que flanquean los sitios de KasI y AfIII en el AR	22
Tabla 10	Oligonucleótidos que flanquean los sitios de HindIII y BamHI	22
Tabla 11	Reacción de PCR Taq Pol <i>Fermentas</i>	23
Tabla 12	Condiciones de termociclador para amplificar el fragmento de repetidos CAG	23
Tabla 13	Condiciones de termociclador para amplificar el fragmento con el tag His6X	23
Tabla 14	Reacción de ligación entre el pCMV-hAR y los fragmentos de PCR	29
Tabla 15	Oligonucleótidos para insertar el fragmento P en el sitio de BamHI	29
Tabla 16	Condiciones de termociclador para oligonucleótidos HindIII	30

## RESUMEN

---

Los efectos biológicos de la testosterona y la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT), los principales andrógenos en los mamíferos, son mediados a través del receptor de andrógenos (RA), una proteína con actividad de factor transcripcional perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares. Cuando los andrógenos se unen al RA, este se activa y transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN. En la próstata el RA dirige el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales, pero también participa en el desarrollo y progresión de patologías como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP).

El CaP es una enfermedad de gran interés debido a que en México es el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres con un 29.9% de los casos, así como el de mayor mortalidad. Al inicio de su desarrollo, el CaP es dependiente de andrógenos por lo que el tratamiento clásico consiste en bloquear la acción de dichas hormonas, resultando en una disminución del crecimiento neoplásico. Sin embargo, el CaP suele volverse independiente de andrógenos y reanuda su crecimiento en una forma más agresiva, por lo que la progresión de un cáncer dependiente a uno independiente de andrógenos es un paso crítico en el avance de esta enfermedad. Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta transición, pero se propone que el RA juega un papel relevante.

Estudios han reportado que en el exón 1 del gen que codifica para el RA, se han observado variaciones de expansión y disminución en el número de codones CAG que codifican una cadena de glutaminas que pudieran estar asociados al inicio y progresión del cáncer. En investigaciones previas realizadas en diferentes países, se ha asociado el número de repetidos CAG con el riesgo de desarrollar CaP, aunque se desconoce el mecanismo bioquímico. Una apuesta interesante es estudiar a fondo la bioquímica de los repetidos CAG, cuyos resultados podrían ser útiles para el desarrollo de pruebas diagnósticas y pronósticas, así como para ayudar al diseño de nuevos tratamientos para combatir al CaP.

En el presente trabajo se diseñaron, construyeron y empezaron a probarse vectores con receptores de andrógenos con diferente número de repetidos CAG (12, 22 y 33), con el objetivo de utilizarlos en ensayos *in vitro* para estudiar el papel del número de repetidos CAG en los mecanismos bioquímicos involucrados en el desarrollo del CaP. Principalmente se pretende usarlos en estudios sobre su impacto en la interacción del RA con otras proteínas.

Palabras clave: Cáncer de próstata, repetidos CAG, receptor de andrógenos.

## **ABSTRACT**

Biological effects of testosterone and dihydrotestosterone (DHT), main androgens in mammals, are mediated through the androgen receptor (RA), a protein with transcriptional factor activity belonging to the nuclear receptor superfamily. When androgens bind to RA, it becomes activated and translocates to the nucleus where it binds to specific DNA sequences. In the prostate, RA directs the growth, differentiation, and survival of epithelial cells, it is also involved in the development and progression of pathologies such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa).

PCa is a disease of great interest because in Mexico it is the type of cancer with the highest incidence in men, with 29.9% of cases, as well as the one with the highest mortality. At the beginning of its development, PCa is dependent on androgens, so the classic treatment consists of blocking the action of these hormones, resulting in a decrease in neoplastic growth. However, PCa usually becomes androgen-independent and resumes its growth in a more aggressive form, so the progression from a cancer-dependent to an androgen-independent one is a critical step in the progression of this disease. The mechanism by which this transition occurs is currently unknown, however, it is proposed that AR plays a relevant role.

It has been reported that in exon 1 of the gene that codes for RA, variations of expansion and/or decrease in the number of CAG codons that encode a glutamine chain have been observed that could be associated with initiation and progression of cancer. In previous studies carried out in different countries, the number of CAG repeats has been associated with the risk of developing PCa, however, the biochemical mechanism involved. An interesting approach is to study the the role of CAG number repeats in PCa development which could be useful for the development of diagnostic and prognostic tests, as well as helping to design new treatments to combat PCa.

In this work, vectors with androgen receptors with different numbers of CAG repeats (12, 22, and 33) were designed, built, and began to be tested, to use in assays to study the role of the number of CAG repeats in biochemical mechanisms involved in the development of PCa. It is mainly intended to use them in studies on their impact on the interaction of AR with other proteins.

Key words: Prostate cancer, CAG repeats, androgen receptor.

# I.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. La próstata

Es una glándula exocrina túbulo-alveolar que mide aproximadamente 3 centímetros de largo y pesa alrededor de 20 gramos, es de color gris, consistencia dura y tiene forma de nuez. Rodea la porción inicial de la uretra y en general se compone principalmente de tejido glandular cuya función es producir un líquido que constituye del 30% al 35% del semen. Esta porción prostática del semen nutre a los espermatozoides y proporciona alcalinidad que ayuda a mantener un pH óptimo<sup>1,2</sup>.

### 2. Cáncer de próstata (CaP)

El CaP es una neoplasia hormono-dependiente de importante heterogeneidad. Es considerado un adenocarcinoma cuyo comportamiento clínico, respuesta a tratamientos y supervivencia varían dependiendo de cada paciente. La verdadera causa del carcinoma prostático se desconoce, pero se sabe que hormonas, específicamente andrógenos, juegan un papel importante en su desarrollo. El CaP suele comenzar con mutaciones en células basales en la zona periférica de la glándula, que es precisamente la parte de la próstata que se puede palpar mediante un tacto rectal, uno de los principales métodos de diagnóstico. Es común que los síntomas del carcinoma prostático aparezcan en la fase tardía de su evolución y se deben habitualmente a la infiltración local obstructiva, a las metástasis a distancia e infecciones urinarias<sup>1,3</sup>.

### 3. Epidemiología

El CaP es el cáncer no cutáneo más común en hombres en todo el mundo, con un estimado de 1, 414, 259 (7.3%) nuevos casos y 375, 304 (3.8%) muertes anualmente<sup>4</sup>. Según los datos reportados en 2020 por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el CaP es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia en la población mexicana, sólo después del cáncer de mama, con un 13.7% del total de casos de cáncer reportados. Con respecto a la población masculina, encabeza las cifras con el

29.9% de los casos, como se muestra en la figura 1, además de ser el cáncer con mayor tasa de mortalidad en la población masculina mexicana. A pesar de la alta supervivencia a largo plazo en los tumores localizados, el CaP metastásico sigue siendo en gran medida incurable incluso después de terapia. Se considera que la letalidad de la enfermedad avanzada es consecuencia de la falta de regímenes terapéuticos capaces de generar respuestas duraderas en el contexto de la heterogeneidad tumoral extrema a nivel genético y celular que presenta la enfermedad<sup>4, 5</sup>.

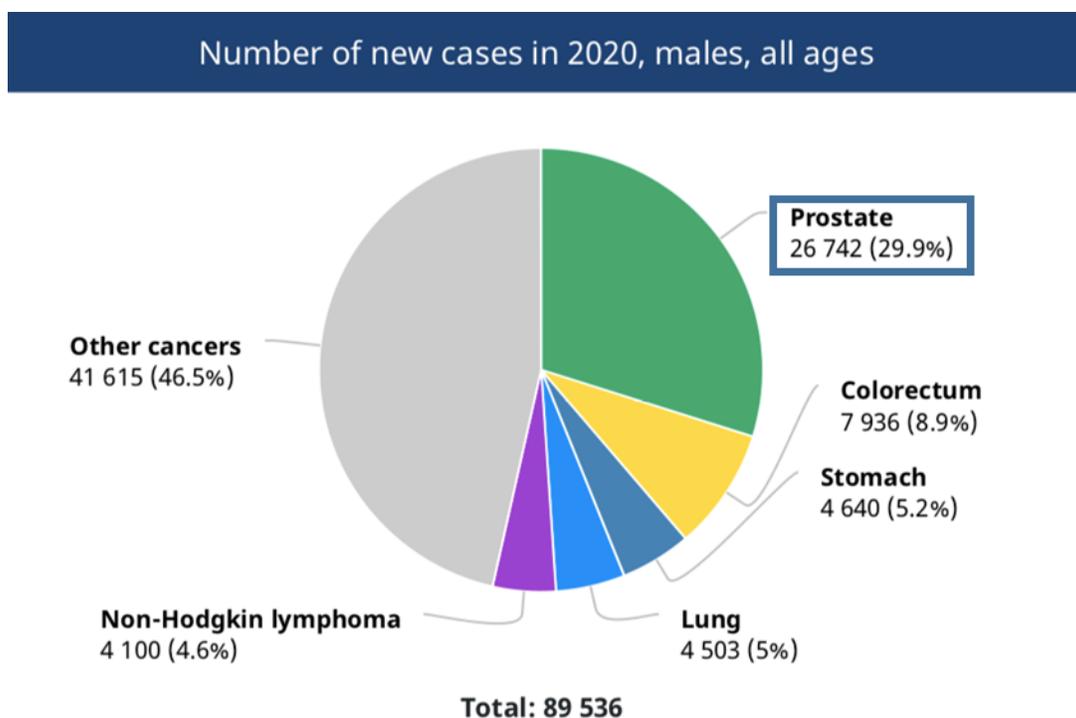


Figura 1. Nuevos casos de cáncer en población masculina mexicana reportados en Globocan 2020. En el primer lugar de nuevos casos de cáncer en población masculina mexicana se encuentra el cáncer de próstata, con un 29.9% del total de los casos. Fuente: IARC<sup>4</sup>.

#### 4. Fondo genético del CaP

Las tasas de CaP varían sustancialmente según la raza, el origen étnico y la geografía. Estas diferencias se pueden explicar por la variabilidad en el acceso a la detección y el tratamiento, la exposición a los factores de riesgo y la propia variación biológica para desarrollar ciertas enfermedades, pero sin duda el CaP tiene una de

las más altas influencias de la herencia de entre los tipos de cáncer principales<sup>6</sup>. Se ha descrito que existen diferencias notables en la incidencia y mortalidad de este padecimiento entre grupos raciales y étnicos. Por ejemplo, la incidencia de CaP más alta observada en Estados Unidos es entre los hombres afrodescendientes, con muertes atribuibles al CaP 2.4 veces mayores en comparación con los hombres caucásicos<sup>7</sup>. También se ha encontrado que las tasas de incidencia y mortalidad son más bajas entre los asiáticos, nativos americanos e hispanos en comparación con los hombres caucásicos. Además, diferencias en la prevalencia de múltiples *loci* de riesgo genético de CaP entre diferentes grupos, sugieren que los factores genéticos podrían explicar las diferencias en las tasas de incidencia, en resumen, varios estudios respaldan que el riesgo de desarrollar CaP varía dependiendo del grupo étnico<sup>7,8</sup>.

## **5. Factores de riesgo**

Se han establecido principalmente tres factores de riesgo no modificables establecidos para el desarrollo de cáncer: edad, grupo étnico e historia familiar<sup>9</sup>. La incidencia del CaP aumenta fuertemente con la edad, debido a la mayor exposición a agentes oxidantes y al incremento de la probabilidad de que se presenten mutaciones en las células que favorecen el desarrollo de la enfermedad. El CaP es raro en hombres menores de 40 años, pero la posibilidad de desarrollarlo aumenta rápidamente después de los 50 años: alrededor de 6 de cada 10 casos se encuentran en hombres mayores de 65 años. En cuanto al grupo étnico, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que ocurre con más frecuencia en hombres afroamericanos y en hombres caribeños de ascendencia africana que en hombres de otras etnias: los hombres afroamericanos tienen más del doble de probabilidades de morir de CaP que los hombres caucásicos. Dicha situación se atribuye a que, entre otros factores, tienen en promedio una mayor cantidad de testosterona en circulación en comparación con otras etnias, lo que implica una constante exposición a mayores cantidades de andrógenos. Por último, el CaP ocurre con menos frecuencia en hombres asiático-americanos e hispanos/latinos que en caucásicos. Las razones de estas diferencias étnicas no están claras hasta

el momento<sup>10</sup>. Aunado a esto, se ha observado que existe un componente heredable, ya que una proporción significativa de hombres reportan tener un historial familiar positivo al CaP, principalmente en un familiar de primer grado (padre o hermano), y generalmente son casos de inicio de la enfermedad a edades tempranas<sup>11</sup>. Existen otros factores modificables relacionados al estilo de vida, tales como la alimentación, consumo de alcohol y tabaco que también se han asociado de manera débil con esta enfermedad<sup>12, 13</sup>.

## **6. Diagnóstico y tratamiento actual**

El CaP que se detecta en forma temprana, cuando todavía está limitado a la glándula prostática, tiene mejores probabilidades de tener un tratamiento exitoso. La detección temprana consta principalmente de dos estudios: la prueba sérica del antígeno prostático específico (APE) y el tacto rectal. El APE es una proteasa de serina producida por el epitelio prostático cuya función es separar y licuar el coágulo seminal que se forma tras la eyaculación. El APE se considera un factor predictivo de CaP, ya que en varones sanos existe una cantidad mínima de APE circulando en el suero y se ha observado que en el CaP los valores de APE se elevan considerablemente. Sin embargo, no es un parámetro específico, ya que el APE puede incrementar debido a otras condiciones fisiológicas, como inflamación de la próstata. En la mayoría de estudios se utiliza como referencia un nivel de APE mayor de 4 ng/mL como indicador de riesgo, y junto con la detección de crecimiento sospechoso en el examen de tacto rectal se puede continuar con la toma de biopsia, para confirmar el diagnóstico<sup>14, 15</sup>. En el análisis de la biopsia, se suele utilizar el sistema de clasificación de Gleason para determinar el estadio del adenocarcinoma de próstata en el que se encuentra el paciente, basándose en las características histológicas del tumor<sup>16</sup>. En nuestro país la NOM-048-SSA2-2017 evalúa la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, vigilancia epidemiológica y promoción de la salud sobre el crecimiento prostático benigno (hiperplasia de la próstata) y el CaP (tumor maligno de la próstata).

## 7. Andr6genos

Los andr6genos son hormonas esteroides capaces de desarrollar y mantener las caracteristicas masculinas en los tejidos reproductivos, en particular el tracto genital, las caracteristicas sexuales secundarias, la fertilidad y contribuir al estado anab6lico de los tejidos somaticos. La testosterona junto con su metabolito de mayor actividad, la 5 $\alpha$ -DHT, son los principales andr6genos en la circulaci6n de mamiferos machos maduros. La testosterona (Figura 2a), por acci6n de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa se puede convertir en 5 $\alpha$ -DHT (Figura 2b)<sup>17</sup>.

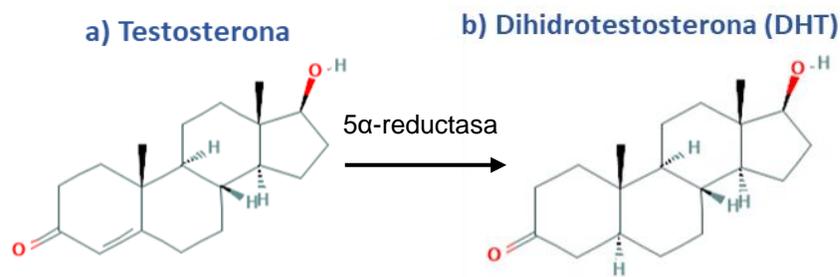


Figura 2. Estructura qu6mica de la testosterona (a) y la 5 $\alpha$ -DHT (b).

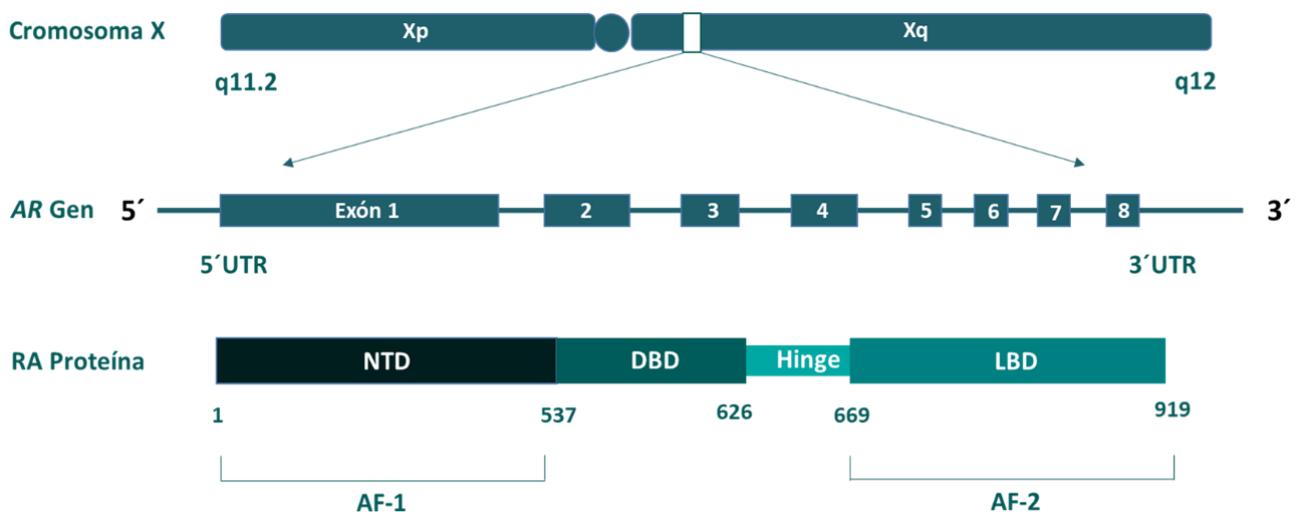
Fuente: National Center for Biotechnology.

La testosterona es sintetizada principalmente por las c6lulas de Leydig, ubicadas en el intersticio del test6culo entre los t6bulos seminiferos. La secreci6n de c6lulas de Leydig crea una concentraci6n local muy alta de testosterona en los test6culos, as6 como un gradiente de concentraci6n hacia el torrente sangu6neo, manteniendo los niveles de testosterona circulantes que ejercen efectos en tejidos diana sensibles a andr6genos. La producci6n de testosterona por las c6lulas de Leydig est6 estrechamente regulada por el eje hipotal6mico-pituitario-gonadal (HPG), a trav6s de la producci6n de la hormona luteinizante<sup>18</sup>.

Los efectos biol6gicos cl6sicos de los andr6genos est6n mediados principalmente por su uni6n al receptor de andr6genos (RA), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, que conduce a patrones caracteristicos de la expresi6n g6nica mediante la regulaci6n de la transcripci6n de una serie de genes diana sensibles a andr6genos<sup>19</sup>.

## 8. Receptor de andrógenos, gen (AR) y proteína (RA)

El gen que codifica para el RA se encuentra codificado en el cromosoma X, ubicado en Xq11-12<sup>3</sup>. Es un miembro clásico de la superfamilia de receptores nucleares que incluye receptores para los 5 grupos de esteroides de mamíferos: los glucocorticoides, mineralocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos, así como para hormonas tiroideas, el ácido retinoico y la vitamina D, entre otros<sup>19,20</sup>. El AR es un gen que consta de ocho exones que codifican para una proteína de aproximadamente 920 aminoácidos y 99.2 kDa. La proteína se conforma por cuatro dominios (Figura 3). El primero es el dominio funcional transactivador largo o N-terminal (NTD), es la región más grande y variable, comprende la mitad de la proteína y está codificado en el exón 1. El segundo es el dominio de unión al ADN (DBD) que consiste en dos dedos de zinc codificados en los exones 2 y 3, el tercero es el dominio de unión a ligando o C-terminal (LBD) y un sitio de unión a esteroides que junto con la región bisagra (Hinge) están codificados en los exones 4 a 8<sup>21,22</sup>.



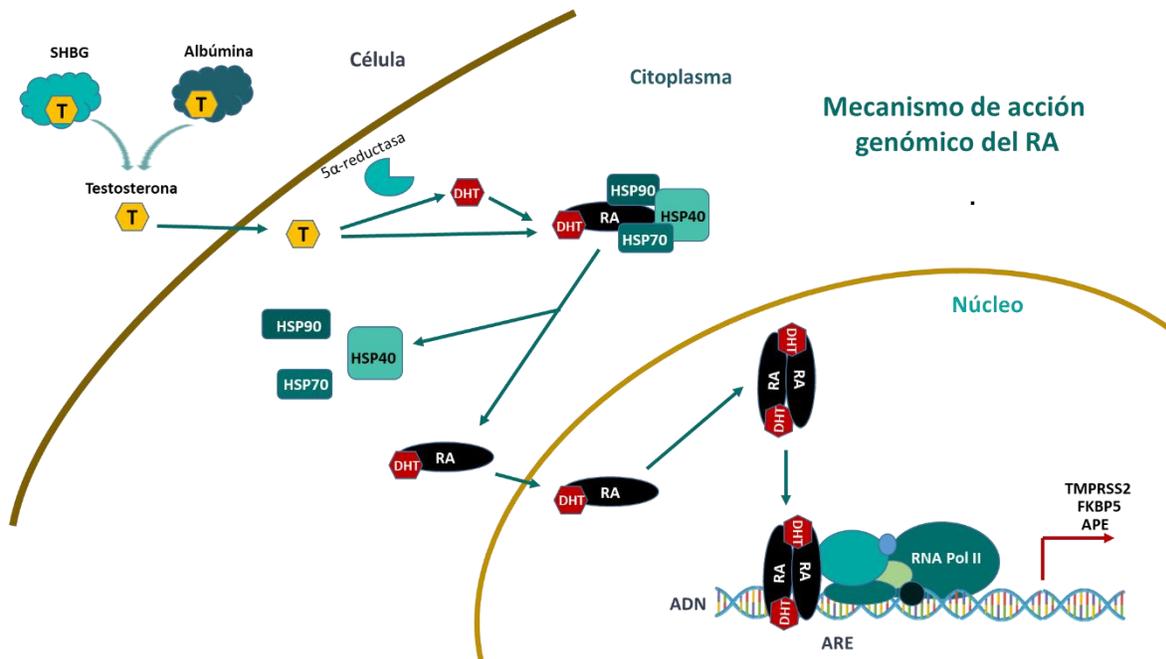
## 9. Mecanismos de acción de los andrógenos

Figura 3. El gen y la proteína del receptor de andrógenos humano. El receptor de andrógenos contiene cuatro regiones: NTD (codificado por el exón 1), DBD (codificado por los exones 2-3), la región bisagra (codificada por el exón 4) y LBD (codificado por los exones 5-8). Modificado de: Crona, 2017<sup>21</sup>.

Los andrógenos son capaces de ejercer su acción a través del RA por medio de dos mecanismos: el primero es de una manera dependiente a la unión al ADN para

regular la transcripción del gen diana, también conocido como mecanismo genómico, el segundo es independiente de la unión del ADN o mecanismo no genómico que provoca eventos celulares rápidos, como por ejemplo la activación de segundos mensajeros en cascadas de señalización<sup>21</sup>.

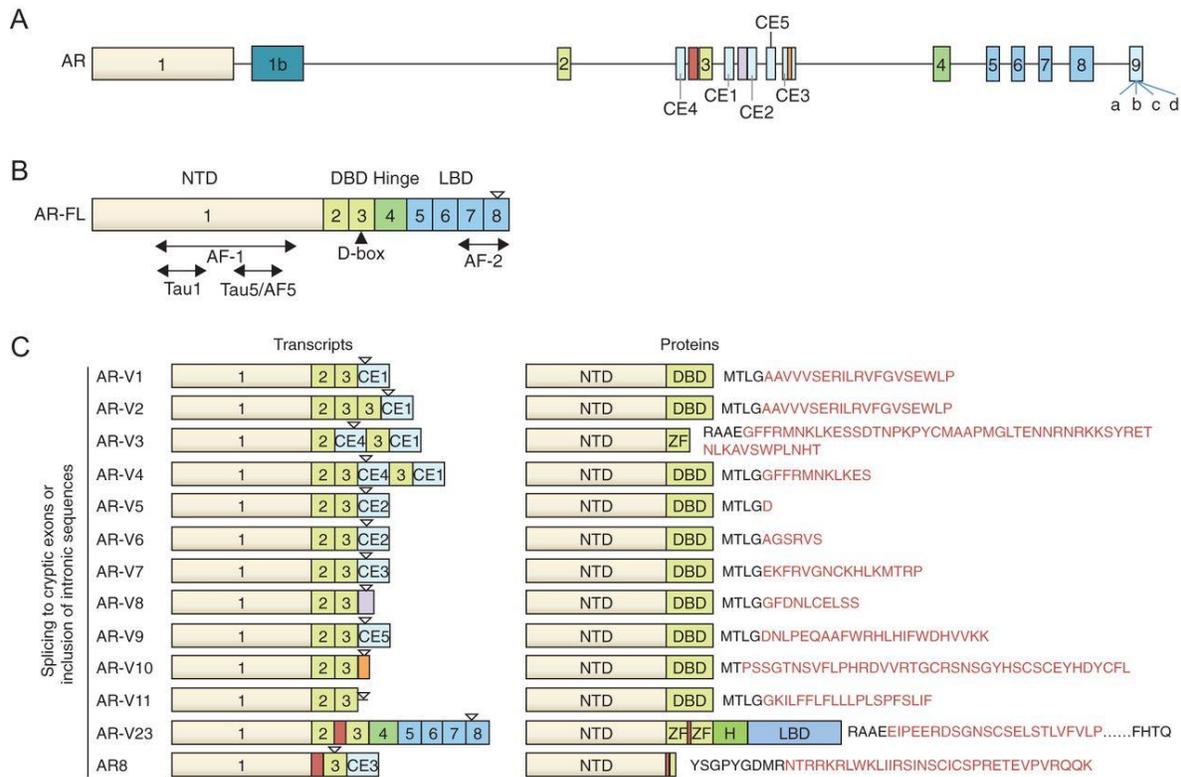
El primer mecanismo se muestra en la figura 4, en el que en un inicio el RA se encuentra en el citoplasma asociado a proteínas de choque térmico y otras proteínas chaperonas. Cuando llega la testosterona a la célula de próstata, transportada por albúmina o por la globina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), se libera e ingresa a la célula por difusión pasiva, dentro puede ser biotransformada por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa a su metabolito más activo: la 5 $\alpha$ -DHT. En la célula, cualquiera de los dos andrógenos es capaz de unirse al RA, dando como resultado un cambio conformacional que ocasiona la disociación de las proteínas chaperonas y la exposición de la señal de localización nuclear (NLS). Inmediatamente, el complejo andrógeno/RA se transloca al núcleo donde se dimeriza y se une a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE), dentro de los genes diana clásicos para modular su transcripción. Algunos de los genes blanco que se activan por acción del RA son genes que codifican para remodeladores de la cromatina; modificadoras de histonas (metilasas, acetilasas, etc.); proteínas involucradas en el *splicing* y metabolismo del ARN; reguladores del ciclo celular; reguladores de la apoptosis, etc<sup>23, 24, 25</sup>.



**Figura 4. Mecanismo de acción genómico del RA.** La testosterona llega a la célula mediante un transportador, se libera e ingresa a través de la membrana por difusión pasiva, dentro puede biotransformarse en 5 $\alpha$ -DHT por la 5 $\alpha$ -reductasa. La testosterona o la 5 $\alpha$ -DHT se puede unir al RA causando la disociación de las proteínas chaperonas, el complejo andrógeno/RA se transloca al núcleo y se dimeriza para unirse a los ARE ubicados en las regiones promotoras de los genes diana para ejercer su función transcripcional. Globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG); proteínas de choque térmico (chaperonas; HSP), elementos de respuesta a andrógenos (ARE). Modificado de: Lonergan, 2011<sup>21</sup>.

## 10. Variantes del RA

Hasta la fecha, se han reportado más de veinte diferentes tipos de variantes del RA debidas a *splicing* alternativo. Algunas variantes se muestran en la figura 5, la mayoría de ellas se encuentran truncadas y pierden la parte carboxilo terminal correspondiente al dominio de unión a ligando, lo que implica que pueden activarse en ausencia del mismo. Además, se ha visto que muchas de ellas se encuentran asociadas con actividad del RA incluso en baja concentración o ausencia de andrógenos<sup>24</sup>. Debido a que la vía de señalización del RA permanece activa en el CaP resistente a la castración (CRPC), a pesar de la baja o nula exposición a andrógenos, se cree que la activación del RA por vías distintas a la canónica son la principal causa de esto<sup>26,27,28</sup>.



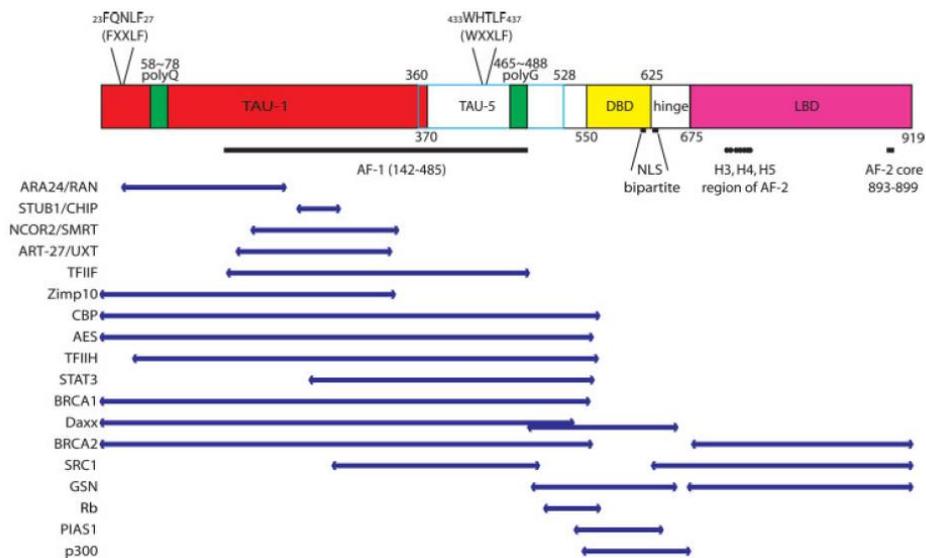
**Figura 5. Variantes de *splicing* alternativo del AR.** Representación esquemática de la estructura de los transcritos y proteínas del receptor de andrógenos y sus variantes. (A) Estructura del gen AR con exones canónicos y exones crípticos (CE). (B) Estructura del ARNm de AR-FL que muestra exones que codifican los diferentes dominios de la proteína (RA). (C) ARNm y estructuras de proteínas de diferentes variantes (AR-V) del receptor de andrógenos. Modificado de: Cao, 2016<sup>26</sup>.

Algunas de estas variantes han sido encontradas en casos de CRPC, y se reportan como parte de la causa por la que la terapia de antiandrógenos no es efectiva en ciertos casos de CaP, por lo que son un blanco interesante en el desarrollo de nuevos tratamientos para tratar esta enfermedad<sup>26</sup>. Sin embargo, no son la única razón por la que el RA pueda activarse, se han mencionado también algunos otros motivos como producción de andrógenos intratumorales, alteraciones en el nivel y estructura de la expresión del RA, mutaciones genéticas y activación transcripcional del RA por ligandos no androgénicos, así como la interacción con coactivadores<sup>28,29</sup>.

## 11. Correguladores del RA

La regulación de la actividad del RA puede ocurrir tanto a nivel genómico como proteómico, por ejemplo, por la interacción con otras proteínas reguladoras y/o modificaciones postraduccionales<sup>30</sup>. Los estados conformacionales del RA pueden direccionar la señalización biológica regulando la selectividad del ligando, el reclutamiento de proteínas para la activación o supresión y la posterior amplificación transcripcional modulando el tiempo de residencia en los elementos de respuesta de ADN. Por ejemplo, el estado conformacional del receptor es menos estable en ausencia de ligando, pero logra una forma bien definida y energéticamente estable en presencia de ligando. Debido al importante impacto en la función del RA, la comprensión de los cambios conformacionales del receptor es fundamental<sup>30,31</sup>.

Los correguladores son proteínas que interaccionan con el RA para potenciar o reprimir su actividad transcripcional. Se clasifican en coactivadores y correpresores, esto según el efecto que tengan al interactuar con el RA: los coactivadores mejoran la transactivación y los correpresores reducen la transactivación<sup>32</sup>. En la figura 6 se muestran ejemplos de correguladores del RA y la región en la que se unen a la proteína<sup>33</sup>.



**Figura 6. Interacciones entre el RA y sus correguladores.** Se muestran ejemplos de correguladores que interactúan con el RA y las líneas azules indican la región del RA con la que interactúan. Fuente: Chmelar, 2007<sup>33</sup>.

A continuación, en la tabla 1 y 2 se presentan algunos ejemplos reportados en la literatura de proteínas identificadas como coactivadores y correpresores del RA. Hasta el momento se conocen más de 300 correguladores del RA, que actúan de forma conjunta para activar genes de manera específica<sup>34-36</sup>.

**Tabla 1. Coactivadores del RA<sup>31</sup>.**

<b>Coactivador</b>	<b>Región de interacción</b>	<b>Función</b>
ARA24	NTD	GTPasa, involucrada en el transporte nucleocitoplasmático, mejora la transactivación mediada por AR, interactúa con el dominio terminal NH <sub>2</sub> que contiene la repetición de poliglutamina. La expansión del tracto de poliglutamina AR de 25 a 49 da como resultado una reducción del 50% en la interacción AR-ARA24.
ARA54	LBD	Mejora la transcripción en presencia de DHT.
ARA70	DBD-LBD	Mejora la transactivación de WT-AR y AR (T877A) en respuesta a DHT.
Ciclina E	NTD	Mejora la actividad transcripcional de AR independientemente de la progresión del ciclo celular.
RAF	NTD	Mejora la unión al ADN.

\*En gris, corregulador ARA24 que interactúa específicamente con la región de poliglutamina.

**Tabla 2. Correpresores del RA<sup>31</sup>.**

<b>Correpositor</b>	<b>Región de interacción</b>	<b>Función</b>
Calreticulina	DBD	Inhibe la unión y la transcripción del ADN.
Ciclina D1	NTD	Reduce la transcripción dependiente de ligando de una manera independiente del ciclo celular.

La actividad correguladora aberrante debido a mutaciones o niveles de expresión alterados puede ser un factor contribuyente en la progresión de enfermedades relacionadas con la actividad del RA, como el CaP<sup>37</sup>.

## **12. Cambios del RA en CaP**

En la próstata, el RA dirige el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células epiteliales, sin embargo, estos efectos también están asociados con el desarrollo y progresión de patologías como la HPB y el CaP. Al inicio de su desarrollo el CaP es dependiente de andrógenos, razón por la cual el tratamiento clásico consiste en bloquear la acción de éstos, con el fin de reducir el crecimiento neoplásico. A pesar de ello, tarde o temprano el CaP se vuelve independiente de los andrógenos, reanudando su crecimiento en una forma más agresiva. Así, la progresión de un CaP dependiente de andrógenos a uno independiente es un paso crítico en el avance de esta enfermedad. Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta transición, pero se piensa que el RA juega un papel relevante<sup>38, 39</sup>.

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales el RA es capaz de potenciar su acción incluso en bajas concentraciones o ausencia de andrógenos, algunos de ellos son: mutaciones; amplificación o sobreexpresión del RA; hipersensibilidad a los andrógenos y repeticiones cortas de glutamina codificadas por repetidos CAG<sup>19</sup>.

## **13. Bioquímica de repetidos CAG**

En el dominio NTD del AR se encuentra un segmento altamente variable de repetidos CAG que codifican para un fragmento de poliglutamina (poli-Q), que ha sido de particular interés porque varía mucho entre individuos y poblaciones. La región poli-Q está codificada por repeticiones CAG en el exón 1 del AR y es polimórfica: su longitud va de 8 a 31 repeticiones y se ha descrito que está inversamente correlacionada con la transactivación del receptor. Debido a que el RA juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, diferencias polimórficas en la longitud poli-Q pueden influir en el riesgo y progreso del CaP<sup>40</sup>. Cabe mencionar que los repetidos CAG no se relacionan únicamente con el CaP, pues también son ampliamente conocidos por la enfermedad de Kennedy o atrofia muscular espinal y bulbar, que se caracteriza por la presencia de más de 40 repetidos CAG en el AR. Esta enfermedad afecta a hombres y provoca daños importantes en los pacientes que la padecen, como pérdida de masa muscular

proximal y bulbar, disfagia, temblores, etc<sup>41</sup>. Los repetidos CAG también se encuentran presentes en otros genes, por ejemplo, en el gen que codifica a la huntingtina, en el que la presencia de expansiones de 30 a 180 repetidos CAG causan la enfermedad de Huntington<sup>42</sup>.

Con respecto al número de repetidos CAG en el contexto del CaP, se ha reportado que la presencia de repeticiones cortas de CAG ( $\leq 22$  repeticiones en muestras sanguíneas y de tejido prostático) en el dominio NTD se asocia con un mayor riesgo de sufrir CaP en comparación con individuos con repeticiones más largas. Esto se atribuye en parte a que, según estudios realizados *in vitro*, el número de repetidos CAG correlaciona inversamente con la actividad transcripcional del RA en algunas líneas celulares<sup>43</sup>. También es posible que variaciones en el medio ambiente de los correguladores prostáticos o interacciones con otras proteínas derivadas del número de repetidos CAG contribuyan a la asociación entre los repetidos CAG y el CaP<sup>44</sup>.

La variación del número de repetidos CAG tiene un impacto importante porque cambia el tamaño de la proteína, lo cual puede afectar el estado conformacional de la misma y alterar las interacciones con otras proteínas, que a su vez se traduce en la alteración de la actividad transcripcional del receptor. Por ejemplo, a través de enfoques bioquímicos y biofísicos se demostró que la eliminación de los repetidos CAG del RA conduce a una reducción en la estructura  $\alpha$ -helicoidal, mientras que el aumento de la longitud de las repeticiones poli-Q conduce a un aumento modesto en la estructura  $\alpha$ -helicoidal. También se ha descrito que repeticiones de poli-Q más cortas generalmente dan mayor actividad de transactivación al RA, mientras que repeticiones más largas causan una actividad reducida, y la eliminación del tracto poli-Q provoca un aumento de cuatro veces en la función de activación del RA en comparación con la proteína silvestre<sup>45,46</sup>.

Hasta la fecha se han realizado algunos estudios con diferentes enfoques sobre la bioquímica de los repetidos CAG, principalmente sobre su actividad transcripcional, por ejemplo, el estudio de Beilin *et al.* (2000), en el que examinan la actividad transcripcional *in vitro* del AR con diferentes número de repetidos CAG dentro del rango normal (15, 24 y 31) en líneas celulares prostáticas (LNCaP y PC3) y no prostáticas (COS-1, MCF7), en donde encuentran diferencia significativa en la actividad transcripcional entre 15 y 31 repetidos CAG en las líneas celulares COS-1 y LNCaP<sup>43</sup>, otro es el estudio realizado por Ding *et al.* (2004), en el que transfectan células DU145 con un plásmido con AR con repetidos CAG que varían en longitud de 14 a 25, y concluyen que el AR-17CAG tiene un 40% más de actividad de transactivación por unidad de proteína AR que el AR-21CAG (P <0.01), por lo que un AR-17CAG puede mediar una estimulación del crecimiento más eficaz de las células epiteliales de próstata dependientes de andrógenos y, por lo tanto, aumentar el riesgo de que las células de CaP se desarrollen de manera más eficiente en el cáncer<sup>47</sup>. Un último ejemplo es el trabajo realizado por Chamberlain *et al.* (1994), en el que como parte de sus estudios sobre los repetidos CAG en el AR en la atrofia muscular espinal y bulbar ligada al cromosoma X, construyeron diferentes AR en los que variaban la posición y tamaño del tracto de poliglutamina, analizaron la capacidad de estos receptores mutantes para unirse a andrógenos y activar la transcripción de genes reporteros sensibles al RA y encontraron que la eliminación del tracto de glutaminas en el AR, tanto en humanos como en ratas, daba como resultado una activación transcripcional elevada, lo que sugiere que la presencia del tracto de poliglutamina inhibe la transactivación<sup>48</sup>.

No hay trabajos que aborden la proteómica del RA en función de los repetidos CAG, se han descrito varios correguladores y los sitios en que se unen al RA, pero no se sabe cómo varían esas uniones en función de los repetidos CAG.

#### 14. Repetidos CAG y fondo genético poblacional

Gracias a decenas de estudios sobre repetidos CAG en poblaciones caucásicas, africo-descendientes y asiáticas en todo el mundo (resumen de meta-análisis publicados, Tabla 3), se sabe que las repeticiones cortas de CAG son más comúnmente encontradas en individuos afro-americanos, son menos frecuentes en individuos europeo-americanos y mucho menos frecuentes en individuos asiático-americanos.

**Tabla 3. Meta-análisis de repetidos CAG y su asociación con el riesgo de CaP.**

<b>Asociación con CaP</b>	<b>Controles (n)</b>	<b>Casos (n)</b>	<b>Artículos revisados</b>	<b>cita</b>
(+) Modesta	5275	4 274	23	Zeegers <i>et al.</i> 2004 <sup>49</sup>
(+) >22 CAG podrían proteger	11 327	10 179	50	Gu <i>et al.</i> 2012 <sup>50</sup>
(+) ligera con <22 en caucásicos y asiáticos	15 172	13 346	47	Sun <i>et al.</i> 2013 <sup>51</sup>
(+) significativa en caucásicos	18 888	14 803	51	Weng <i>et al.</i> 2017 <sup>52</sup>
(+) significativa en asiáticos >22 CAG	15 351	11 891	51	Qin <i>et al.</i> 2017 <sup>53</sup>

La mayoría de estos estudios concuerdan en que las poblaciones con menor número de repetidos CAG se asocian con un mayor riesgo de CaP<sup>54</sup>. Sin embargo, los resultados pueden variar entre poblaciones, ya que en algunos grupos no se encuentra asociación o es diferente el número de corte de repetidos CAG a partir del cual se considera que hay riesgo. En el caso de la población mexicana los estudios existentes son escasos.

## II.

## JUSTIFICACIÓN

---

Debido a la prevalencia e incidencia del CaP en la población masculina, es importante conocer más a fondo el papel del RA en el desarrollo de la enfermedad. La variabilidad de repetidos CAG en el RA es una característica importante que podría influir de diferentes formas en el desarrollo del cáncer. Razón por la cual nos interesa construir vectores con receptores de andrógenos con diferente número de repetidos CAG (corto, medio y largo) para expresarlos en líneas celulares de CaP y utilizarlos en un futuro para el estudio del impacto de estas variaciones en mecanismos bioquímicos relacionados con el RA en el contexto de CaP.

### III.

## HIPÓTESIS

---

La construcción de vectores plasmídicos con RA con diferente número de repetidos CAG servirá para construir un modelo *in vitro* de células de CaP que expresen RA con diferente tamaño de tracto poli-Q, que servirá como base para el posterior estudio de los repetidos CAG y su interacción con otras proteínas.

## **IV. OBJETIVOS**

---

### **Objetivo Principal**

Construir vectores con receptores de andrógenos con un número de repetidos CAG corto (15), medio (22) y largo (30) y usarlos para expresar los diferentes RA en una línea celular de CaP.

### **Objetivos particulares**

#### **a) Ensayos *in vitro***

1. Buscar secuencias de 15, 22 y 30 repetidos CAG en el AR en muestras sanguíneas de voluntarios sanos.
2. Clonar las secuencias de 15, 22 y 30 repetidos CAG y una etiqueta de histidinas (tag His6X) en el vector TA (pTZ57/T).
3. Subclonar los vectores TA-15 CAG, TA-22 CAG, TA-30 CAG y TA-His6X en el vector pCMV-hAR.
4. Transfectar los clones construidos en células PC3 para comprobar su expresión.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Extracción de ADN genómico de muestras de sangre

Se recolectaron muestras de sangre periférica en tubos con EDTA (se usó el sistema Vacutainer® de Becton Dickinson). Se extrajo ADN genómico de los leucocitos presentes en la muestra con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Se siguieron las instrucciones del fabricante y el ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, usando un espectrofotómetro NanoDrop Epoch (Biotek®).

Nota: En la sección de anexos se encuentra la información sobre la preparación de buffers utilizados en las posteriores metodologías.

Los oligonucleótidos del exón 1a empleados para secuenciar el fragmento de repetidos CAG (tabla 4), fueron diseñados en la tesis de maestría de González P.A. (2017)<sup>55</sup>, los demás oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en esta tesis.

**Tabla 4. Oligonucleótidos del exón 1a (AR).**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del producto
Exón 1a Forw	5'- GCG ACT ACC GCA TCA TCA CA- 3'	58 °C	432pb
Exón 1a Rev	5'- CTC ATC CAG GAC CAG GTA GC- 3'	55 °C	

Se utilizó la enzima Platinum® Taq ADN Polymerase High Fidelity (Invitrogen) para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo las indicaciones del fabricante. En las tablas 5 y 6 se muestran los reactivos y condiciones utilizadas.

**Tabla 5. PCR con Taq ADN Polymerase High Fidelity.**

Reactivo	Volumen (µL)
High Fidelity Buffer 10 X	1.5 µL
dNTP Mix 10 mM	0.3 µL
MgSO <sub>4</sub> 50 mM	0.6 µL
Forward oligonucleótido 10 µM	0.3 µL
Reverse oligonucleótido 10 µM	0.3 µL
Platinum® Taq ADN Polymerase High Fidelity (5U / µL)	0.1 µL
H <sub>2</sub> O	Variable
ADN (500 ng)	Variable
Volumen total=	<b>15 µL</b>

**Tabla 6. Condiciones del termociclador para Taq ADN Polymerase High Fidelity.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Alineación	58	30 s	
Extensión	68	45 s	
Extensión final	68	5 min	1

## 2. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% p/v en buffer TBE 0.5X con bromuro de etidio. Las muestras se cargaron adicionando el buffer de carga ADN Loading Dye 6X (Thermo Scientific) y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus ADN Ladder (Thermo Scientific).

Los geles se corrieron 120 V/ 60 min y se visualizaron en un transiluminador UV para corroborar que el amplicón fuera del peso adecuado. Una vez corroborado el peso del amplicón, se realizó un tratamiento de limpieza con fosfatasa alcalina de camarón (SAP) para inactivar los nucleótidos restantes y con exonucleasa I (EXO I) para degradar los oligonucleótidos residuales. Para la reacción se utilizaron 1.2 µL de SAP, 0.6 µL de EXO I y 6 µL del producto de PCR, con un volumen total de 7.8 µL. Las condiciones de incubación fueron 20 min a 37 °C y luego 10 min a 80°C.

### 3. Secuenciación Sanger

Para secuenciar las muestras de ADN se utilizó el método de Sanger que emplea electroforesis capilar. Para secuenciar, una vez que se limpiaron los productos de PCR, se realizó el marcaje del ADN para realizar una secuenciación tipo Sanger utilizando el kit comercial BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. (Applied Biosystems). En la tabla 7 se muestran los reactivos necesarios para el marcaje de ADN.

**Tabla 7. Marcaje de ADN con BigDye™ Terminator v3.1.**

Reactivo	Forward	Reverse
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2 µL	2 µL
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µL	1 µL
Producto de PCR limpio	3 µL	3 µL
<i>Forward</i> oligonucleótido 10 µM	0.5 µL	-
<i>Reverse</i> oligonucleótido 10 µM	-	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	3.5 µL	3.5 µL
Total=	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>

**Tabla 8. Condiciones del termociclador para marcaje de ADN con BigDye™ Terminator v3.1.**

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	96	1 min	25
Alineación	55	30 s	
Extensión	60	4 min	
Mantenimiento	4	Hasta purificar	

Se utilizó el método de purificación EDTA/Etanol, que se describe a continuación: En un tubo se agregaron los reactivos en el siguiente orden: 10 µL de ADN marcado, 2.5 µL de EDTA 125 mM y 30 µL de etanol absoluto grado biología molecular. Se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 5,645 rpm/30 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante por decantación. Se hizo un lavado con 30 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 5,645 rpm/15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar a 37 °C/1 h en oscuridad. Los amplicones marcados fueron analizados por electroforesis capilar en el 3500xL ADN Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

#### 4. Clonación de los fragmentos con 12, 22 y 33 CAG y la etiqueta de histidinas (tag His6X) en el vector TA (pTZ57/T).

De entre las secuencias de diferentes repetidos CAG que se obtuvieron, se decidieron utilizar las muestras con 12, 22 y 33 CAG. Para clonar los fragmentos se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el segmento de repetidos CAG de las muestras de ADN genómico seleccionadas, en su diseño se incluyeron los sitios de restricción de las enzimas KasI (979) y AflII (1344), que flanquean el fragmento de repetidos CAG.

**Tabla 9. Oligonucleótidos que flanquean los sitios de KasI y AflII en el AR.**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del producto
AR-KasI-Forw	5'- <b>GGC GCC</b> AGT TTG CTG CTG CTG CAG C -3'	69.3 °C	368 pb
AR-AflII-Rev	5'- <b>CTT AAG</b> CCG GGG AAA GTG GGG CCC A -3'	67 °C	

Se decidió agregar una etiqueta de 6 histidinas (tag His6X) a la secuencia del AR para la posterior purificación de la proteína RA. Para incorporar el tag His6X se utilizaron oligonucleótidos diseñados para el fragmento final del gen AR (exón 8 y parte del 7) considerando los sitios de restricción de las enzimas HindIII (2522) y BamHI (3747) del pCMV-hAR (ver figura 8).

**Tabla 10. Oligonucleótidos que flanquean los sitios de HindIII y BamHI.**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del producto
AR-HindIII-Forw	5'- <b>AAG CTT</b> CTG GGT GTC ACT ATG GAG CTC -3'	61.8	1055 pb
AR-BamHI- His6X-Rev	5'- <b>GGA TCC</b> TCA <b>ATG GTG ATG GTG ATG ATG</b> CTG GGT GTG GAA ATA GAT GGG CTT GAC- 3'	69.6	

\*En gris el fragmento del tag His6X agregado

En cada caso, se realizó una reacción de PCR con la Taq Pol Fermentas para obtener el amplicón del segmento con los repetidos de CAG seleccionados y el fragmento con el tag His6X. A continuación, en las tablas 11 y 12 se describen los reactivos y condiciones utilizadas.

**Tabla 11. Reacción de PCR Taq Pol Fermentas.**

Reactivo	Volumen
Buffer (10 X)	2.5 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
Forward oligonucleótido (10 µM)	1 µL
Reverse oligonucleótido (10 µM)	1 µL
Taq Pol Fermentas	0.4 µL
H <sub>2</sub> O	Variable
ADN (500 ng)	Variable
Volumen total=	<b>25 µL</b>

**Tabla 12. Condiciones de termociclador para amplificar el fragmento de repetidos CAG.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Alineación	67*	30 s	
Extensión	72	45 s	
Extensión final	72	5 min	1

\*Se hizo un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineación adecuada

**Tabla 13. Condiciones de termociclador para amplificar el fragmento con el tag His6X.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Alineación	64*	45 s	
Extensión	72	1 min 15 s	
Extensión final	72	5 min	1

\*Se hizo un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineación adecuada

Se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v, se visualizó rápidamente en el transiluminador UV para localizar los fragmentos de interés en cada caso y cortar las bandas correspondientes a cada uno de los fragmentos (de 12, 22 y 33 CAG) y al fragmento con el tag His6X. La exposición a la radiación debe ser mínima para evitar que los rayos UV dañen el ADN. Una vez obtenidas las bandas se extrajo el ADN del gel con el kit de extracción Zymoclean Gel DNA Recovery Kit. Con el ADN extraído se hicieron las reacciones de ligación de cada fragmento con el vector TA o PTZ57R/T (Figura 7). Para la reacción se utilizaron: 1  $\mu$ L de Buffer T4 10X, 7.1  $\mu$ L del fragmento de PCR, 0.4  $\mu$ L de la enzima T4 ADN ligasa, 0.5  $\mu$ L del Vector PTZ57R/T y 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 10  $\mu$ L. La reacción se dejó incubando toda la noche a 4 °C y posteriormente se utilizó para transformar células competentes.

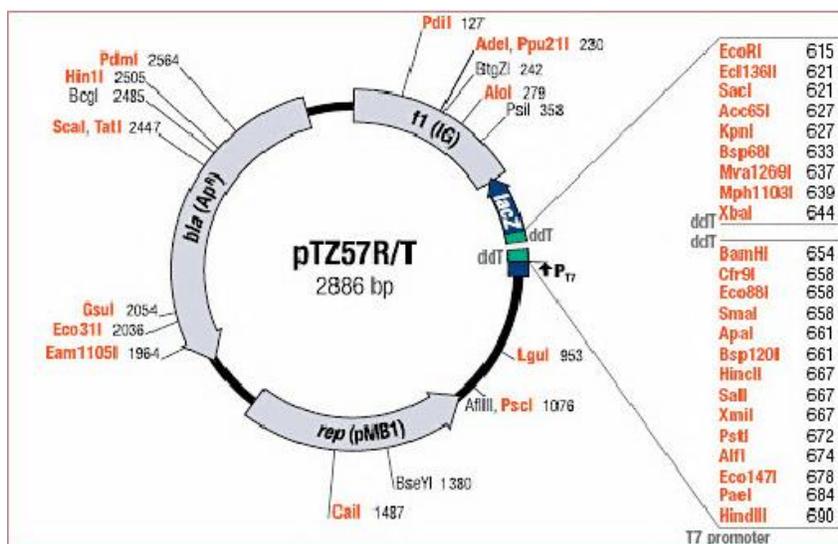


Figura 7. Mapa del vector pTZ57/T o TA (Fermentas). El vector se utilizó para clonar los productos de PCR correspondientes a los fragmentos con 12, 22 y 33 CAG y el fragmento con el tag His6X.

## 5. Transformación en bacterias DH5 $\alpha$ .

Para la transformación de los productos de ligación se siguió el siguiente protocolo: en esterilidad se colocaron 50  $\mu$ L de células competentes DH5 $\alpha$  más 10  $\mu$ L de la reacción de ligación, se incubaron por 20 min en hielo y se dió un choque térmico de 30 s a 42 °C. Luego se incubaron 3 min en hielo, se agregaron 300  $\mu$ L de medio LB y se incubaron a 37 °C/1 h con agitación (600 rpm). Después el tubo se centrifugó 1,1700 rpm/2 min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió la pastilla, se sembraron en placas de medio LB + Ampicilina (Ampi) y se incubaron de 15-17 h a 37 °C. Se seleccionaron colonias crecidas de cada una de las cajas para sembrarlas en 3 mL de medio líquido LB + Ampi. Con los cultivos obtenidos se realizó una miniprep para extraer el ADN plasmídico utilizando el kit E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I, se siguió el protocolo del fabricante. Al final de la extracción se cuantificó el ADN extraído con el equipo NanoDrop Epoch (Biotek). Posteriormente se hizo una digestión con enzimas de restricción AflII y KasI en el caso de los fragmentos de repetidos CAG y las enzimas HindIII y BamHI para el fragmento con el tag His6X, para corroborar que el fragmento tuviese el peso esperado. Para todas las reacciones de restricción realizadas en el presente proyecto se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 1  $\mu$ L de Buffer 10 X, 0.3  $\mu$ L de enzima, 300-500 ng de ADN y H<sub>2</sub>O hasta un volumen total de 10  $\mu$ L. Se dejaron incubar a 37 °C por 2 h y posterior a la incubación se hizo una electroforesis en un gel en donde se cargaron los 10  $\mu$ L de la reacción a un gel de agarosa al 1% p/v y TBE 0.5 X y se corrió durante 1 h/120 V.

Una vez corroborada la presencia del fragmento con el peso esperado, se hizo secuenciación tipo Sanger a cada una de las muestras, utilizando los oligonucleótidos M13 del vector TA para corroborar que la secuencia fuera la correcta. Los clones correctos se almacenaron en glicerol (-70 °C) hasta su uso.

Para construir los vectores deseados se tomó como base el vector pCMV-hAR de *addgene* (figura 8)

## Vector pCMV-hAR de *addgene* (Plasmid #8907)

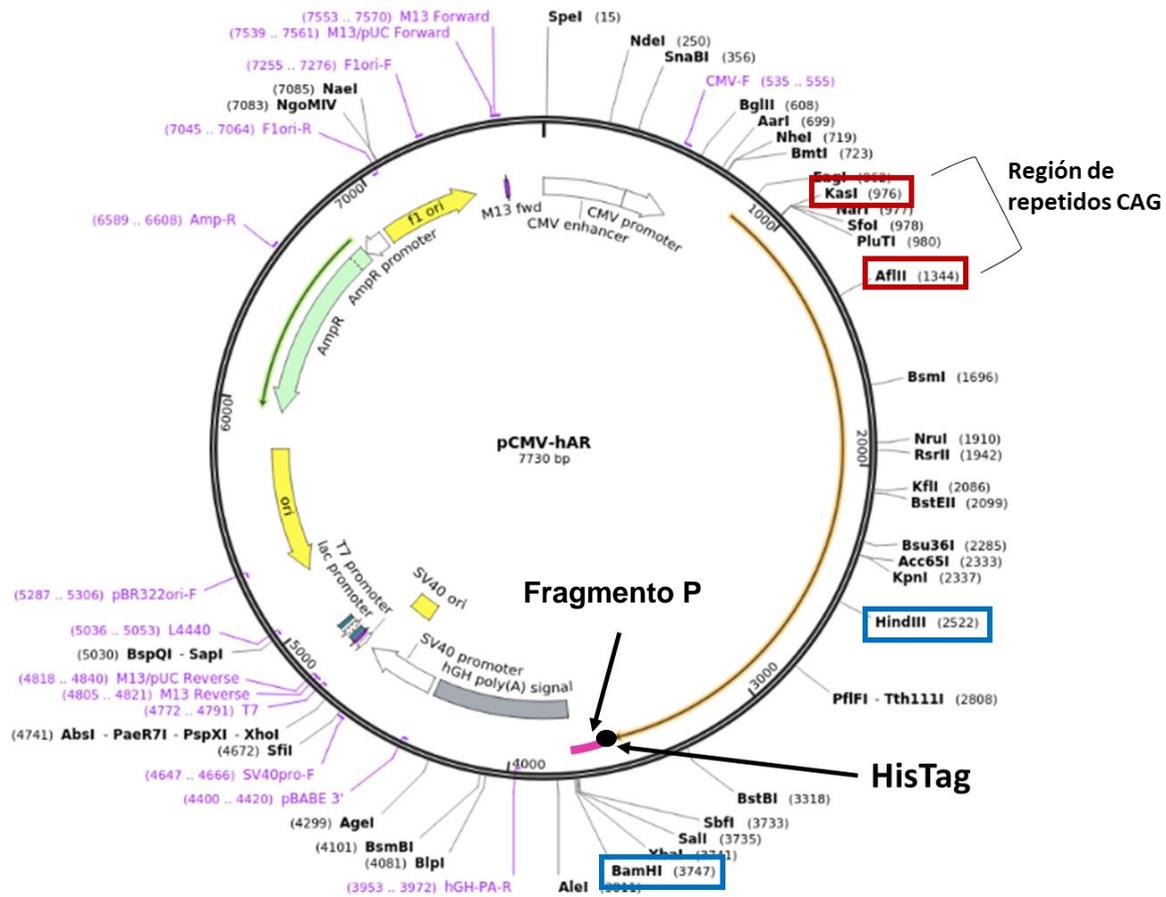
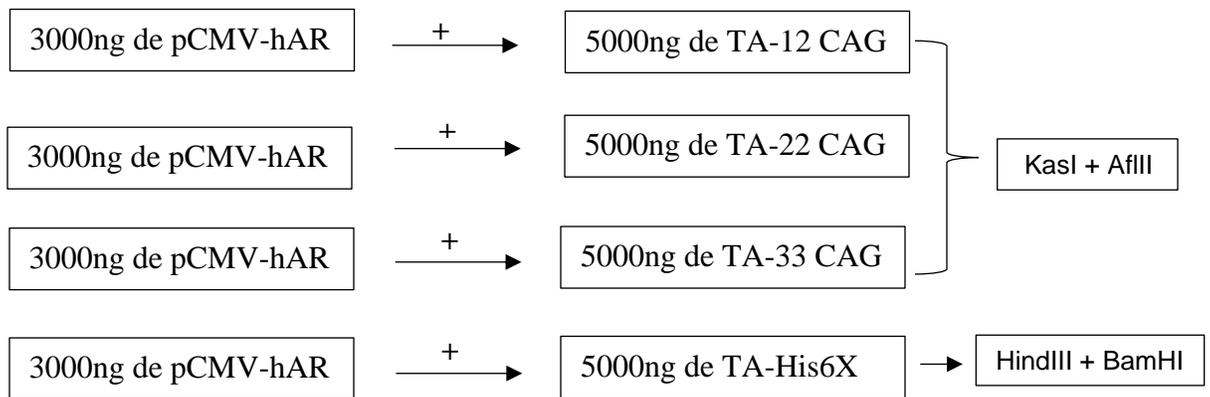


Figura 8. Mapa del vector pCMV-hAR de *addgene* (Plasmid #89078). Se señalan en rojo los sitios de corte de las enzimas KasI y AflII, región en la que se encuentran los repetidos CAG. En azul los sitios de corte de las enzimas HindIII y BamHI, región en la que se subclonó el tag His6X (punto negro), se señala con línea rosa el fragmento P, perdido al subclonar el tag His6X. <https://www.addgene.org/89078/>  
Gen: AR, Vector backbone: pCMV5. Resistencia bacteriana: Ampicilina Temperatura de crecimiento: 37 °C. Cepa de crecimiento: DH5alpha. Número de copias: *High Copy*.

### 6. Subclonación de los vectores TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG y TA-His6X en el vector pCMV-hAR

Sobre el vector pCMV-hAR se subclonaron los vectores TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG y TA-His6X. A continuación se detalla la metodología empleada.

Para cada una de las reacciones de subclonación se partió de:



En cada caso, los vectores se cortaron con su respectivo juego de enzimas: KasI + AflII y HindIII + BamHI, y se incubaron a 37 °C/2 h. Luego se corrieron en un gel de agarosa al 1% p/v por 1 h/120 V, se cortaron las bandas correspondientes al pCMV-hAR abierto y sin los fragmentos entre KasI y AflII y entre HindIII y BamHI respectivamente y los fragmentos liberados por los vectores TA correspondientes a cada fragmento de 12, 22 y 33 CAG y el fragmento con el tag His6X.

Se extrajo el ADN del gel y se cuantificó. Se utilizaron 50 ng de vector para la reacción de ligación y para determinar la cantidad de inserto para la reacción se utilizó la siguiente relación:

$$ng_{inserto} = \frac{(ng_{vector}) \times (pb \text{ del inserto})}{pb \text{ del vector}} \times 3$$

Para 12 CAG:

$$ng_{inserto} = \frac{(50 \text{ ng}_{vector}) \times (329 \text{ pb del inserto})}{7730 \text{ pb del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = 6.4 \text{ ng}$$

Para 22 CAG:

$$ng_{inserto} = \frac{(50 \text{ ng}_{vector}) \times (359 \text{ pb del inserto})}{7730 \text{ pb del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = 6.9 \text{ ng}$$

Para 33 CAG:

$$ng_{inserto} = \frac{(50 \text{ ng}_{vector}) \times (392 \text{ pb del inserto})}{7730 \text{ pb del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = 7.6 \text{ ng}$$

Para tag His6X:

$$ng_{inserto} = \frac{(50 \text{ ng}_{vector}) \times (950 \text{ pb del inserto})}{7730 \text{ pb del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = 18.4 \text{ ng}$$

**Tabla 14. Reacción de ligación entre el pCMV-hAR y los fragmentos de PCR.**

Reactivo	Volumen
Buffer T4 10X	1 µL
Enzima T4 ADN ligasa	0.4 µL
Vector	50 ng
Inserto	variable
H2O	variable
Volumen total=	<b>10 µL</b>

Luego de las reacciones de ligación, se hizo la transformación, selección de colonias, corte con enzimas de restricción y secuenciación para elegir los clones con el inserto correcto y sin mutaciones. Los correctos se almacenaron en glicerol (-70 °C) hasta su uso.

Se hicieron maxipreps de los vectores pCMV-hAR (original) y uno de los pCMV-hAR-His6X secuenciados, se utilizó el kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System, el ADN obtenido se utilizó en las posteriores transfecciones en células PC3 para ensayos de WB.

### **7. Clonación del fragmento P en el vector TA (pTZ57/T).**

Debido a que por la estrategia de clonación al incorporar el tag His6X al vector pCMV-hAR se perdió un pequeño fragmento de 158 pb del vector original (denominado en esta tesis como fragmento “P”, figura 8), Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar y clonar el fragmento perdido y subclonarlo con el vector pCMV-hAR-His6X, para el diseño se consideró un único sitio de restricción, el de la enzima BamHI.

**Tabla 15. Oligonucleótidos para insertar el fragmento P en el sitio de BamHI.**

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño
AR-X-BamHI-Forw	5´- <b>GGA TCC</b> AGC ATT GGA AAC CCT ATT TCC CCA CC-3´	64.9	158 pb
AR-X-BamHI -Rev	5´- <b>GGA TCC</b> TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA TGC AA-3´	66.6	

Se realizó la reacción de PCR de la enzima Taq Pol Fermentas (Tabla 12)

**Tabla 16. Condiciones de termociclador para oligonucleótidos HindIII.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Alineación	62*	45 s	
Extensión	72	1 min15 s	
Extensión final	72	5 min	1

\*Se hizo un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineación adecuada

Se siguieron los mismos protocolos antes descritos para clonar el fragmento P: se corrió en un gel de agarosa al 1% p/v para cortar la banda del fragmento, se extrajo el ADN del gel y posteriormente se hizo la reacción de ligación con el vector TA usando la enzima T4. Se siguió el mismo procedimiento de transformación, selección de colonias, corte con enzimas de restricción y secuenciación para elegir los clones con el inserto correcto y sin mutaciones. Los correctos se almacenaron en glicerol (-70 °C) hasta su uso.

## **8. Subclonación del vector TA-P en el vector pCMV-hAR**

Para subclonar se partió de:



Ambos se cortaron con la enzima BamHI y se incubaron 2 h/37 °C. Se corrieron en un gel de agarosa al 1% p/v por 1 h/120 V, se cortaron las bandas correspondientes al pCMV-hAR-His6X abierto y sin el fragmento P y el fragmento P liberado por el vector TA. Se extrajo el ADN del gel y se cuantificó.

A diferencia de la metodología anterior, antes de la reacción de ligación se hizo una reacción de desfosforilación, para evitar que el vector al abrirse en un único sitio pudiera volver a cerrarse antes de incorporar el fragmento P.

Para la reacción de desfosforilación se usaron: 1.5 µL de Buffer, 0.5 µL de fosfatasa alcalina (FastAP), 9 µL de ADN (600 ng) y 4 µL de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 15 µL. La reacción se incubó 15 min a 37 °C y luego 5 min a 55 °C en termociclador. Se limpió de restos de sales agregando 600 µL de medio ADB del kit Zymoclean Gel DNA Recovery, se siguió el protocolo del fabricante, se cuantificó y se procedió a la reacción de ligación (tabla 1). De igual forma se utilizaron 50 ng de vector para la reacción de ligación y se determinó la cantidad de inserto para la reacción.

$$ng_{inserto} = \frac{(ng_{vector}) \times (pb \text{ del inserto})}{pb \text{ del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = \frac{(50 ng_{vector}) \times (160 pb \text{ del inserto})}{7598 pb \text{ del vector}} \times 3$$

$$ng_{inserto} = 3.1 ng$$

Luego de la ligación, se hizo la transformación, selección de colonias, corte con enzimas de restricción y secuenciación para elegir los clones con el inserto correcto, en dirección adecuada y sin mutaciones, como resultado se obtuvo el vector pCMV-hAR-His6X-P. Los dos clones correctos se almacenaron en gliceroles (-70 °C) y se utilizaron para ensayos de WB y pull-down.

## 9. Visualización y análisis de secuencias

Las secuencias se visualizaron con el software BioEdit 7.2 Sequence Alignment Editor y se analizaron con el programa Serial Cloner (v. 2.6.1).

## 10. Cultivo de células PC3

Para los ensayos de transfección se utilizaron células PC3 (anexo 2), una línea celular de CaP que se ha reportado no expresa al receptor de andrógenos (AR-). Para el cultivo de la línea celular se utilizó medio DMEM-F12 + 6% de FBS y streptomycin-penicilina 1 X, las condiciones de crecimiento utilizadas fueron: temperatura: 37 °C, atmósfera: 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>, para los ensayos se utilizaron cultivos con una confluencia del 80%.

## 11. Transfección de células PC3

Se decidió probar primero la transfección del pCMV-hAR (original) y el pCMV-hAR-His6X secuenciado, para comprobar que ambos se expresaran adecuadamente para luego continuar con la subclonación con los diferentes repetidos.

En el primer experimento se probaron 3 diferentes cantidades de ADN a transfectar: 1, 3 y 5  $\mu\text{g}$ . También se incluyó un control negativo (transfección sin ADN) y se usó un plásmido (TL311621) como control de la técnica de transfección, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Los ensayos se hicieron en placas de 6 pozos, con una cantidad inicial de 250,000 células y 2 mL de medio de cultivo en cada pozo. Para transfectar se utilizó Lipofectamine 2000 Transfection Reagent cat. 11668-019 (Invitrogen), se siguió el protocolo del fabricante. Luego de la transfección, las células se rasparon y lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1 X y se centrifugaron a 9400 rpm/5 min a 4 °C. Para lisar las células se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se añadió RIPA + inhibidor de proteasas (de 80 a 100  $\mu\text{L}$  dependiendo del tamaño del pellet), se agitaron muy bien con vórtex y se dejaron incubando a -20 °C toda la noche. Al día siguiente los tubos se descongelaron y centrifugaron a 12,000 rpm/30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en el que se encontraban las proteínas totales para su posterior cuantificación.

## 12. Cuantificación de proteínas

Se cuantificaron las proteínas totales utilizando el método de Bradford. El método consiste en colocar las muestras en una placa de 96 pozos, con diluciones conocidas en un volumen de 160  $\mu\text{L}$  más 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Se incuban 20 min y posteriormente se leen a una longitud de onda de 595 nm. Para conocer la concentración de las muestras se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) con 6 puntos: 0, 5, 10, 30, 60 y 90 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] hecha por duplicado y cuantificada al mismo tiempo que las muestras, con la cual se determinó la ecuación de la recta y se calculó la concentración de cada muestra utilizando la relación: 
$$[\mu\text{g}/\text{mL}] = \frac{\text{abs}-b}{m}.$$

Las muestras se leyeron en el equipo NanoDrop Epoch (Biotek).

### **13. SDS-PAGE y Western blot**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE con el fin de separar las proteínas según su peso molecular. Se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de proteínas totales por pozo en un gel de acrilamida al 8% (anexo 1), para su separación en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se incluyó el marcador de peso molecular para proteínas BlueStar Prestained Protein Marker Cat: MWP03 de NIPPON Genetics Europe, y se corrió el gel a 30 V por 1.5 h. Las proteínas se electrotransfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa, previamente activada con metanol en una cámara de transferencia semi-seca con buffer de transferencia a 30 V por 45 min. Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de PBT + leche desgrasada al 5% durante 1 h, luego del bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C (anti-AR 1:500 o anti-His6X 1:1000 de Santa Cruz Biotechnology, los anticuerpos se diluyeron en la misma solución de bloqueo). Se hicieron 3 lavados de 10 min con PBT y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h (anti-mouse 1:2000 o anti-rabbit 1:1000), posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min con PBT. Por último, se revelaron adicionando sobre cada membrana una mezcla de 250  $\mu\text{L}$  de peróxido y 250  $\mu\text{L}$  de luminol, exponiendo una placa sensible a la luz sobre cada membrana por 15 min en un cuarto oscuro.

### **14. Análisis de interacción de proteínas por ensayo de "pull down".**

Para el ensayo de pull-down se partió de  $2 \times 10^6$  células PC3, que se incubaron hasta un 80% de confluencia. Se hizo la transfección con Lipofectamine 2000 Transfection Reagent cat. 11668-019 (Invitrogen), se siguió el protocolo del fabricante a razón de 1.5  $\mu\text{L}$  lipofectamine/ $\mu\text{g}$  de ADN. Se incubaron 48 h a 37 °C/5%  $\text{CO}_2$ . Se lavaron las células transfectadas con PBS, se rasparon de las placas y se colectaron en tubos de 1.5 mL. Se centrifugaron 1880 rpm/5 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en buffer de lisis suplementado con 0.05% de Tween 20, se usaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis por cada  $10^7$  células.

Las células se lisaron por sonicación, utilizando seis ráfagas de 15 s a 75 W con un período de enfriamiento de 10 s entre cada pulso, utilizando un sonicador equipado con una micropunta. Posteriormente se centrifugó el lisado a 18,800 rpm /10 min a 4 °C, para conseguir separar el pellet del sobrenadante que contiene a la proteína marcada. Se utilizó la resina Ni Sepharose® 6 Fast Flow Cat: GE17531801 Lot: 10223862, una resina de cromatografía de alta capacidad de unión para purificar proteínas marcadas con la etiqueta de histidinas (tag His6X). Para equilibrar la columna, se resuspendió el frasco de resina en partes iguales con etanol al 20%, es necesario tener cuidado para asegurarse de que se pipeteen cantidades constantes de perlas, ya que las perlas tienden a asentarse si la suspensión no se agita adecuadamente. Se tomaron 40 µL de la suspensión de perlas y se colocaron en tubos de 1.5 mL, se adicionó 1 mL buffer de lisis y se incubaron por 5 min, luego se centrifugaron a 2000 rpm/1 min a 4 °C.

Después de equilibrar la columna, se agregaron los 200 µL de lisado a las perlas. Los tubos se mezclaron suavemente en un agitador orbital durante 2 h a 4 °C. Se centrifugaron a 2000 rpm/1 min, el sobrenadante recuperado (FT) se reservó. Se agregó 1 mL de buffer de lavado, se mezcló la suspensión, se centrifugó a 2000 rpm/1 min, se retiró con cuidado el buffer de lavado de las perlas con una pipeta y se reservó (W1). Se repitió el paso anterior una vez más y se reservó nuevamente el sobrenadante (W2). Después del último lavado, el buffer residual se eliminó por completo y se agregaron 30 µL de buffer de elución, se mezcló e incubó durante 15 min, se centrifugó a 2000 rpm/1 min y se recogió con cuidado el eluido final (E), en el que se encuentra la proteína marcada con el tag His6X. Por último, se agregaron 30 µL de buffer de muestra a la resina (R). Todas las alícuotas (FT, W1, W2, E y R) se hirvieron y cargaron en un gel de acrilamida al 8% y se corrieron por 1.5 h a 30 V. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para visualizar las proteínas.

## VI.

## RESULTADOS

---

### Ensayos *in vitro*

#### 1. Buscar secuencias de 15, 22 y 30 repetidos CAG en el AR de voluntarios sanos.

Se recolectaron un total de 27 muestras de sangre periférica de voluntarios sanos de entre 17 y 75 años de edad. El promedio de repetidos CAG en las muestras analizadas fue de  $22.5 \pm 6.49$  CAG. La figura 9 muestra el número de repetidos CAG en las muestras que se recolectaron.

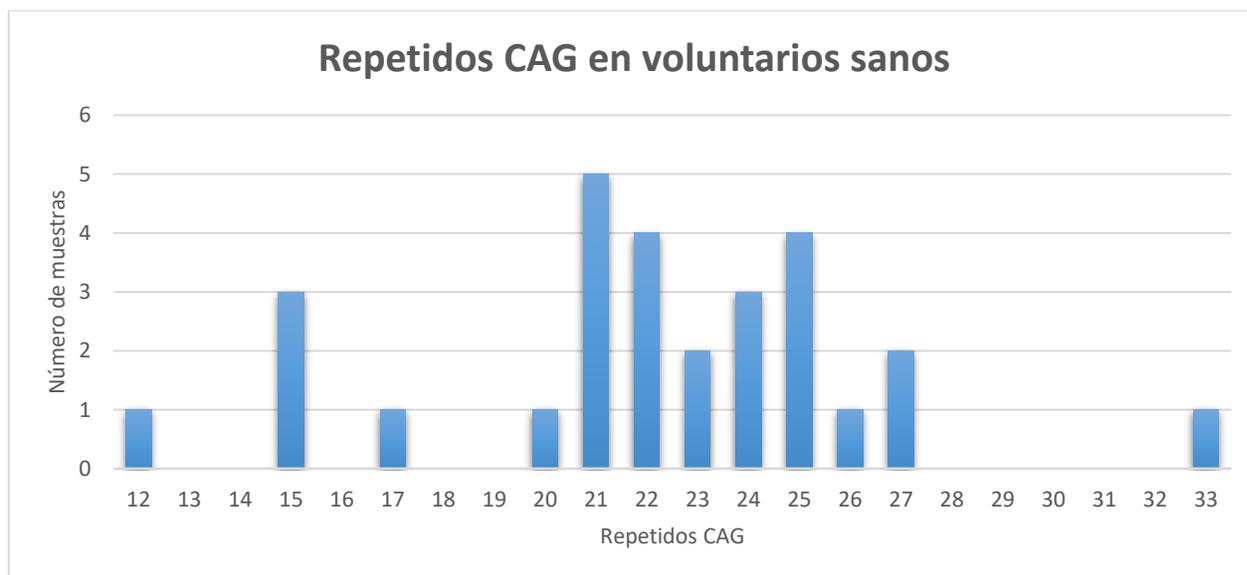


Figura 9. Repetidos CAG en voluntarios sanos.

El objetivo de la búsqueda era encontrar receptores de andrógenos con un número de repetidos CAG corto, medio y largo, tentativamente se pensó en 15, 22 y 30 repetidos, sin embargo, se logró encontrar un repetido todavía más corto de 12 CAG y uno más largo de lo esperado de 33 CAG, por lo que se decidió utilizar las muestras con 12, 22 y 33 CAG.



## 2. Clonar las secuencias de 12, 22 y 33 repetidos CAG y una etiqueta de histidinas (tag His6X) en el vector TA (pTZ57R/T).

Se clonaron y secuenciaron los vectores:

- TA-12CAG
- TA-22CAG
- TA-33CAG
- TA-His6X

En las figuras 12 y 13 se muestran los mapas de los vectores construidos.

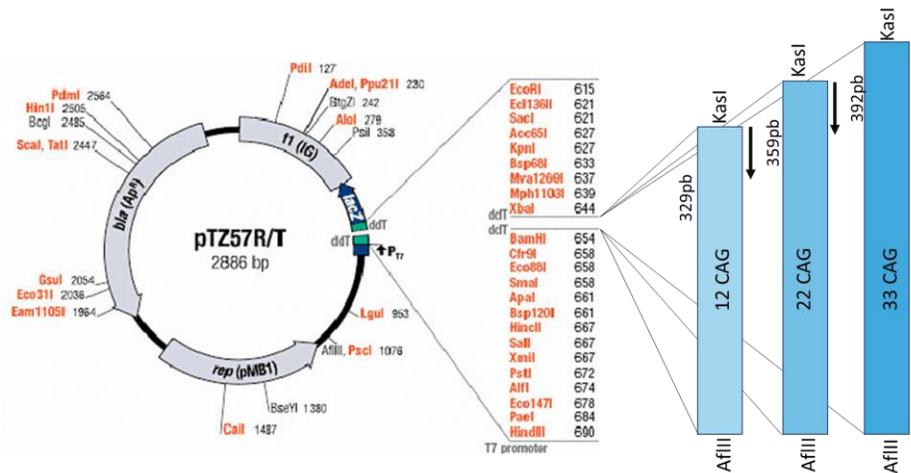


Figura 12. Mapa de los vectores TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG. Se muestran los sitios de las enzimas que flanquean los fragmentos: Kasi y AflIII, el peso de cada fragmento en pares de bases (pb) y la orientación del fragmento en el vector con una flecha negra.

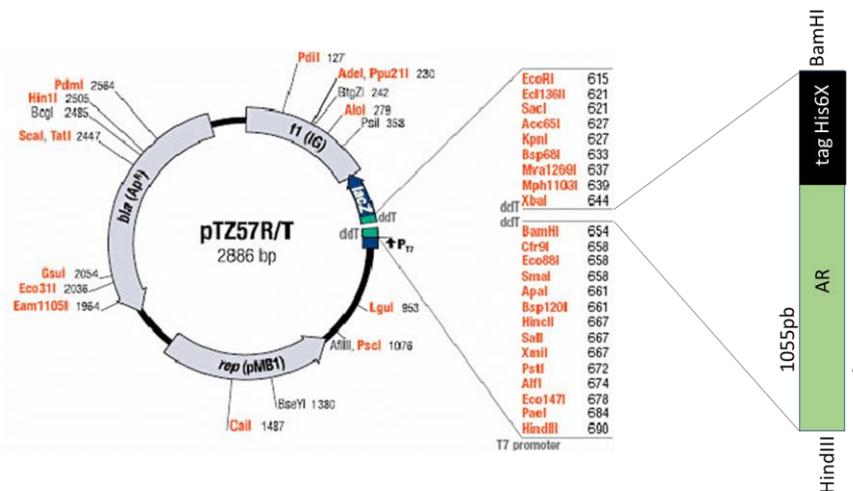


Figura 13. Mapa del vector TA-His6X. Se muestran los sitios de las enzimas que flanquean el fragmento del AR (verde) y tag His6X (negro): HindIII y BamHI, el peso del fragmento: 1055 pb y la orientación en el vector con una flecha negra.

### 3. Subclonar los vectores TA-12CAG, TA- 22CAG, TA- 33CAG y TA-His6X en el vector pCMV-hAR.

Se decidió subclonar primero el TA-His6X y el vector pCMV-hAR para obtener el vector pCMV-hAR-His6X (figura 14) y comprobar su expresión en células PC3 por medio de WB, para después de corroborar su expresión subclonar los diferentes repetidos CAG.

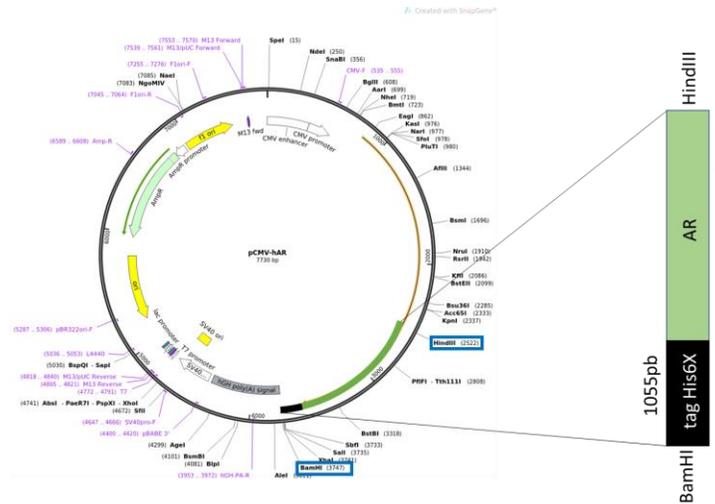


Figura 14. Mapa del vector pCMV-hAR-His6X. Se muestran los sitios de las enzimas que flanquean el fragmento del AR + tag His6X: HindIII y BamHI, el peso: 1055 pb y la orientación dentro del pCMV-hAR con una flecha negra.

Se decidió seguir este orden debido a que, por la estrategia de clonación, al cortar en los sitios de HindIII y BamHI para incorporar el fragmento con la última fracción del AR y el tag His6X, inevitablemente se perdía una pequeña región de 158 pb denominada en esta tesis como fragmento P (Figura 15). Debido a que no afectaba la integridad del gen, se esperaba que la falta de ese fragmento no afectase la expresión del vector en las células PC3, sin embargo, había la posibilidad de afectar dicha expresión, por lo que una vez obtenido el vector pCMV-hAR-His6X, se hicieron maxipreps y se montaron experimentos para transfectarse en células PC3 y corroborar su expresión.

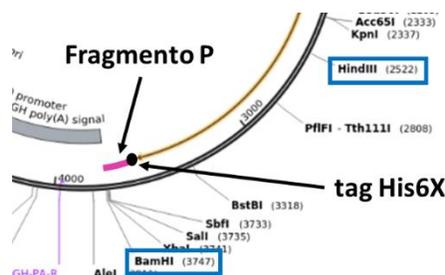


Figura 15. Acercamiento al mapa del vector pCMV-hAR. Se muestra el fragmento P (158 pb), la zona perdida al subclonar el fragmento de la última porción del AR más el tag His6X.

#### **4. Transfectar los clones construidos en células PC3 para comprobar su expresión y comparar las interacciones de los diferentes RA con otras proteínas.**

Los ensayos de WB y pull-down realizados tuvieron como objetivo estandarizar las cantidades de ADN a transfectar, la cantidad de lipofectamine a usar, probar los anticuerpos y en general empezar a estandarizar la metodología, además de obtener un resultado preliminar sobre la expresión de los vectores pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X.

En el primer ensayo de transfección de células PC3 se consideraron las siguientes condiciones:

- Transfección con pCMV-hAR
  - Transfección con pCMV-hAR-His6X
  - Control negativo (transfección sin ADN)
  - Control de transfección (con el plásmido TL311621, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP))
- > Se probaron tres diferentes cantidades de ADN a transfectar: 1, 3 y 5  $\mu\text{g}$  para los plásmidos pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X.
- > Se probaron diferentes cantidades de lipofectamine: 1.2, 1.5 y 1.8  $\mu\text{L}$  de lipofectamine/ 1  $\mu\text{g}$  de ADN (transfectando 3  $\mu\text{g}$  de pCMV-hAR).

Los resultados de estos primeros ensayos fueron los siguientes: luego de 24 h de la transfección, las células se observaron en el microscopio de fluorescencia y las células transfectadas con el plásmido TL311621 se vieron iluminadas en verde (figura en anexo 4), lo que significa que la transfección se hizo correctamente.

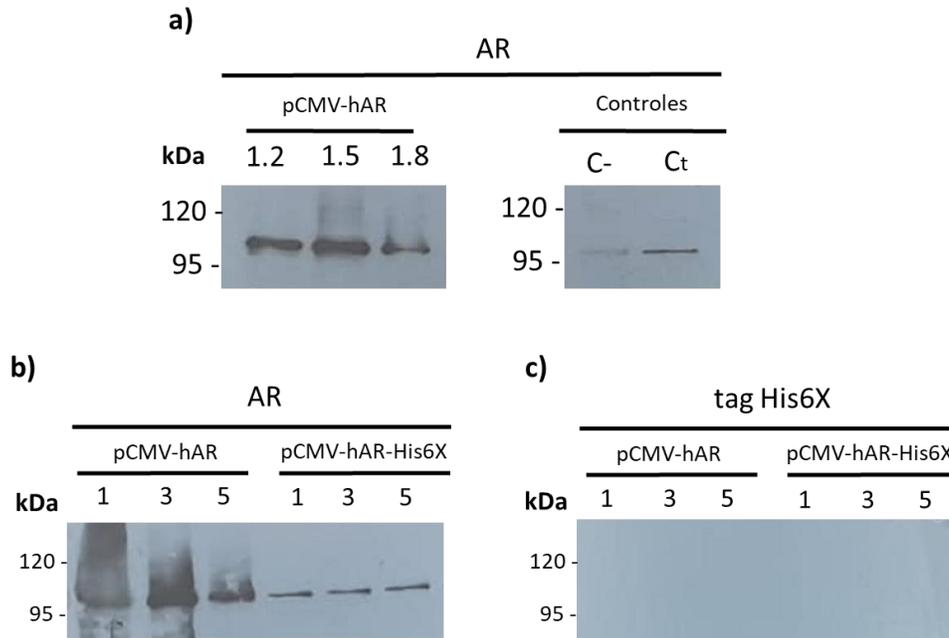
Los resultados de los WB revelados contra los anticuerpos anti-AR y anti-His6X se muestran en la figura 16. En la figura a) se presenta el resultado de la prueba de diferentes cantidades de lipofectamine: 1.2, 1.5 y 1.8  $\mu\text{L}$ . Se observa que la mejor respuesta es en 1.5  $\mu\text{L}$  de lipofectamine/  $\mu\text{g}$  de ADN, ya que se ve mejor la banda y las células no se maltratan tanto como con 1.8  $\mu\text{L}$  de lipofectamine.

Se muestran los resultados de los controles, primero el control transfectado sin ADN (C-) y el control de transfección (Ct), en este caso ambos funcionan como controles negativos, pues a ninguno se transfectó un AR, sin embargo, se logra ver una banda tenue en el peso del RA en ambos casos, que se atribuye a la expresión endógena del receptor.

Las figuras b) y c) muestran los resultados de la transfección con diferentes cantidades de ADN: 1, 3 y 5  $\mu\text{g}$  de pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X, ambos revelados con anti-AR (b) y anti-His6X (c). Observamos que de los dos vectores transfectados únicamente se expresa el vector pCMV-hAR, en los tres carriles se aprecian bandas en el peso esperado de 99 kDa y se ve una ligera mejor expresión en la muestra transfectada con 3  $\mu\text{g}$ , por lo que en adelante se harán las transfecciones con esta cantidad. Con respecto al vector pCMV-hAR-His6X se considera que no se expresa, pues a pesar de observarse bandas delgadas en los tres carriles, son parecidas a las que aparecen en los controles en los que no se transfectó AR, por lo que no se trata de la expresión del vector.

Con respecto a las bandas en los controles negativos, un detalle que llama la atención es que se si las células PC3 no expresan RA y no se transfectó el AR, no debería haber ninguna banda. La presencia de las bandas en los controles negativos puede deberse a que dentro de la línea celular PC3 existen diferentes sublíneas y no todas son AR (-): se ha descrito que hay una AR (+) que tiene mRNA de AR medible pero poca proteína, se desconoce cuál sublínea de PC3 se utilizó en los ensayos realizados, pero muy posiblemente sea una AR (+), que aunque muy poco, expresa RA y son las bandas delgadas que se observan en todas las condiciones<sup>48</sup>. En la figura c) se corrobora que no hay expresión del pCMV-hAR-His6X, pues el anticuerpo monoclonal anti-His6X no detecta ninguna señal, aunque cabe mencionar que no se pudo conseguir un control positivo que expresara el tag His6X para validar la función del anticuerpo.

Del mismo modo se probaron otros 7 clones de pCMV-hAR-His6X y se obtuvieron los mismos resultados.



**Figura 16. Expresión de los vectores pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X en células PC3.** Western blot de lisados totales de células PC3. a) Se transfectaron 3 µg de pCMV-hAR variando la cantidad de lipofectamine: 1.2, 1.5 y 1.8 µL lipofectamine/µg de ADN. Control negativo (C-): transfección sin ADN. Control de transfección (Ct): transfección con el plásmido TL311621 que expresa GFP. b) y c) Se transfectaron tres diferentes cantidades de ADN: 1, 3 y 5 µg de pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X, se revelaron con el anticuerpo policlonal anti-AR y el anticuerpo monoclonal anti-His6X, respectivamente.

Con estos primeros resultados preliminares se llegó a la conclusión de que muy probablemente el fragmento P si era necesario para la expresión del vector pCMV-hAR-His6X, por lo que parte de la estrategia siguiente fue reincorporar dicho fragmento al vector pCMV-hAR-His6X, para posteriormente probarlo y corroborar si presentaba expresión. Para conseguirlo, se clonó el fragmento P en el vector TA y se subclonó en el pCMV-hAR-His6X. Los mapas de los vectores construidos se muestran en las figuras 17 y 18.

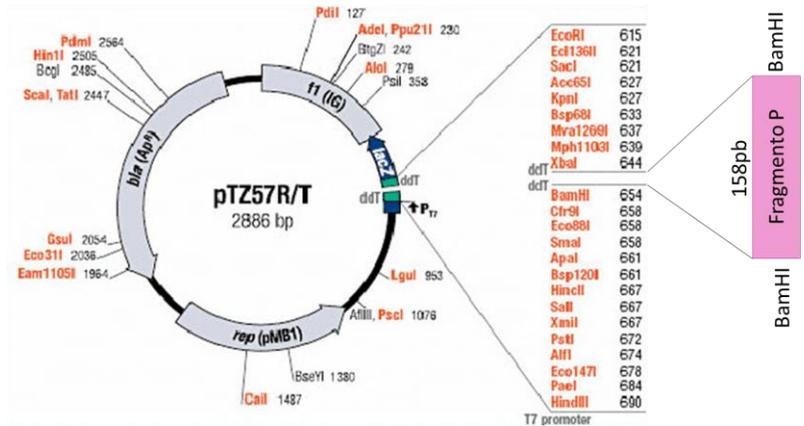


Figura 17. Mapa del vector TA-P. Se muestran los sitios de la enzima que flanquea el fragmento P (BamHI), su peso: 158pb y la orientación dentro del vector con una flecha negra.

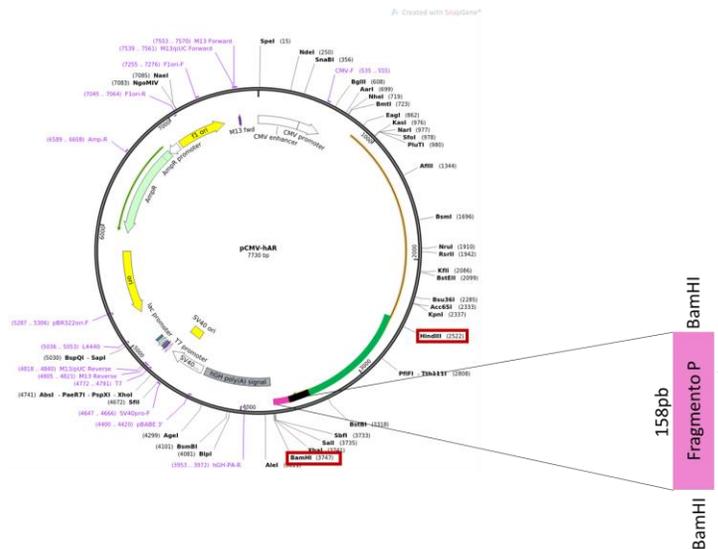
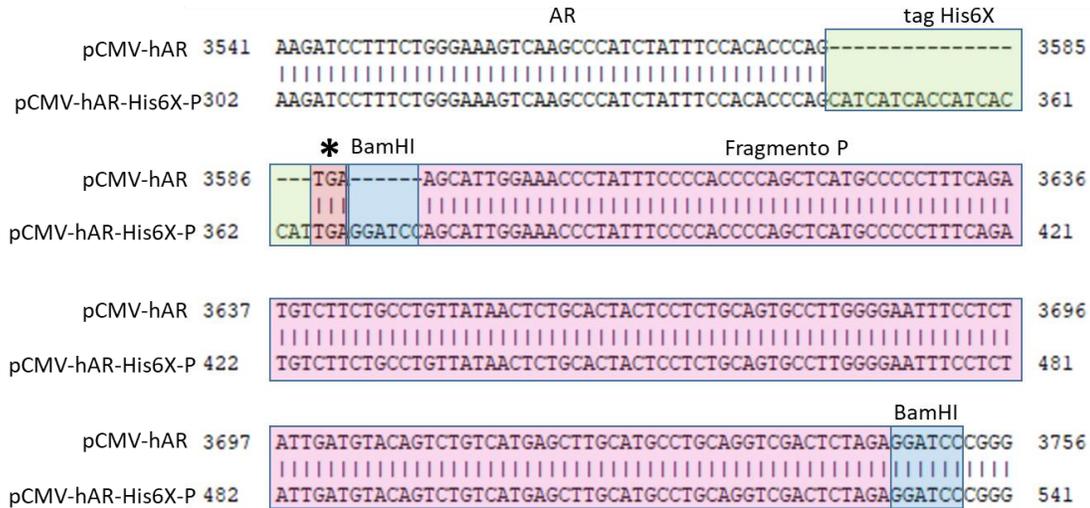


Figura18. Mapa del vector pCMV-hAR-His6X-P. Se muestran los sitios de la enzima que flanquea el fragmento P (BamHI), su peso: 158 pb y la orientación dentro del pCMV-hAR-His6X con una flecha negra.

Se secuenciaron un total de 10 clones de los cuales dos, el clon 1 y el clon 3, incorporaron el fragmento P en sentido adecuado, los demás o no lo incorporaron o lo incorporaron en el sentido equivocado. En la figura 19 se muestra la secuencia de uno de los dos clones pCMV-hAR-His6X-P. Se observa que la secuencia ya se encuentra completa, con el tag His6X y el fragmento P recuperado.



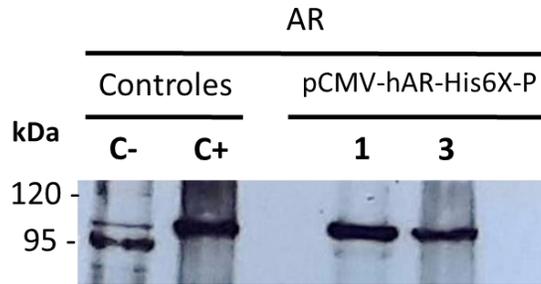
**Figura 19. Secuencia del vector pCMV-hAR-His6X-P.** Se señala en verde la región del tag His6X incorporada al pCMV-hAR, en rojo el codón de paro TGA, en rosa el fragmento P reinsertado al vector pCMV-hAR-His6X y en azul los sitios de corte de la enzima \* BamHI.

Los dos vectores que incorporaron el fragmento P en orientación correcta se utilizaron para transfectar nuevamente células PC3 y hacer ensayos de WB y pull-down.

Las condiciones que se incluyeron para el WB fueron:

- Control negativo (C-): sin ADN
- Control positivo (C+): pCMV-hAR
- Transfección con pCMV-hAR-His6X-P (Clon 1)
- Transfección con pCMV-hAR-His6X-P (Clon 3)

El resultado se muestra en la figura 20. Podemos observar que en el control negativo se observa la banda delgada similar a la observada en los ensayos anteriores. En el control positivo se observa una banda de mayor densidad que el control negativo, similar a la observada también anteriormente. En los carriles de los clones 1 y 3 del vector pCMV-hAR-His6X-P se observa que esta vez hay bandas similares en densidad y tamaño al control positivo, por lo que se concluye que la reincorporación del fragmento P funcionó para lograr la expresión del RA-His6X en las células PC3. Desafortunadamente en este ensayo no se pudo realizar el WB revelado contra anti-His6X porque el anticuerpo se agotó.

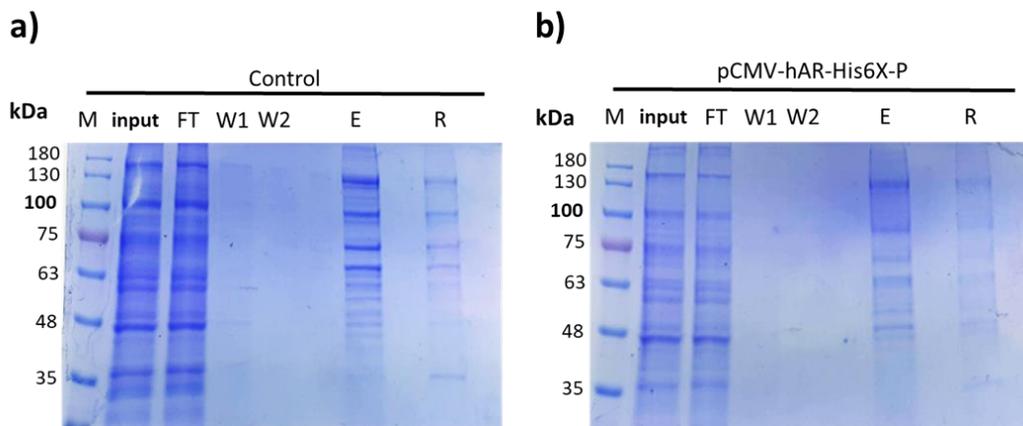


**Figura 20.** Expresión del vector pCMV-hAR-His6X-P en células PC3. Western blot de lisados totales de células PC3. Control negativo (C-): Sin ADN. Control positivo (C+): Transfección con pCMV-hAR. Se transfectaron los clones 1 y 3 del vector pCMV-hAR-His6X-P. Se observa en ambos clones bandas de tamaño parecido al control positivo.

Se decidió hacer también un ensayo de pull-down para probar directamente si se podía purificar la proteína RA marcada con el tag His6X. Las condiciones evaluadas fueron:

- Control sin transfectar
- Transfección con pCMV-hAR-His6X-P

Los resultados se muestran en la figura 21. Se esperaba ver una banda enriquecida de 99 kDa correspondiente al RA-His6X en el carril de eludido final (E) del gel b), sin embargo, como se aprecia en la figura 21, no hay presencia de la banda del peso esperado.



**Figura 21.** Ensayo de pull-down para purificación de la proteína RA-His6X. Tinción con azul de Coomassie. a) Control: células PC3 sin transfectar. b) Células PC3 transfectadas con pCMV-hAR-His6X-P. M: marcador de peso molecular. Input. FT: Flow through. W1: Wash 1. W2: Wash 2. E: Eluido. R: resina.

Debido a las dificultades presentadas en la expresión del vector pCMV-hAR-His6X, a la par de la subclonación del fragmento P y las pruebas de WB y pull-down, se pensó en una segunda estrategia para recuperar al RA en caso de que por algún motivo no funcione la estrategia con el tag His6X. Se trata de realizar una inmunoprecipitación (IP), utilizando un anticuerpo monoclonal que se una a la región carboxilo terminal o LBD, para que no interfiera con la zona de los repetidos CAG en el dominio NTD. Para esta metodología sería suficiente tener cada uno de los vectores pCMV-hAR con los diferentes repetidos, por lo que se decidió subclonar directamente los vectores TA-15CAG, TA-22CAG y TA-33CAG en el vector pCMV-hAR, en la figura se muestra el mapa correspondiente a dichos vectores, de los cuales queda pendiente su transfección para corroborar su expresión por medio de WB.

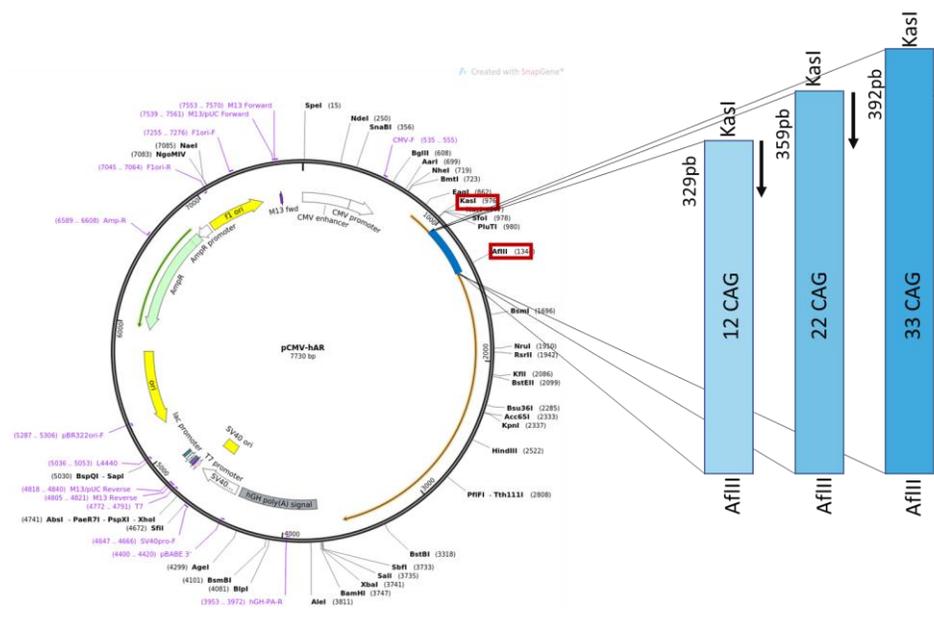


Figura 22. Mapa de los vectores pCMV-hAR-12CAG, pCMV-hAR-22CAG y pCMV-hAR-33CAG. Se muestran los sitios de las enzimas que flanquean a los fragmentos con los diferentes repetidos CAG: Kasi y AflIII, su peso en pares de bases (pb) y la orientación de cada fragmento con una flecha negra.

## VII.

## DISCUSIÓN

---

El CaP es una enfermedad compleja que afecta a millones de hombres en todo el mundo. Su alto impacto en la salud de la población masculina realza la importancia de la investigación y comprensión de su comportamiento y los mecanismos biológicos que lo desencadenan, para contribuir al desarrollo de estrategias que mejoren su detección y los tratamientos clínicos actuales<sup>56</sup>.

Se sabe que el RA es un gen clave implicado en la oncogénesis, desarrollo y progresión del CaP, ya que es fundamental para el inicio y crecimiento del tumor, además de que juega un papel importante en la respuesta a la terapia hormonal. En este sentido, algunos estudios han demostrado que el AR continúa expresándose y su señalización permanece intacta en tumores independientes de andrógenos, un claro ejemplo es la expresión incrementada del APE en CaP, un gen regulado por el RA. Este comportamiento descontrolado causa la subsecuente resistencia a las terapias convencionales, que suele ser fatal para los pacientes, siendo sinónimo de un peor pronóstico y reduciendo su esperanza de vida, razón por la que el estudio de este factor transcripcional puede aportar información valiosa para conocer mejor la fisiopatología molecular del CaP y utilizarla para mejorar el diagnóstico y tratamiento del mismo<sup>38,39,57</sup>.

Una característica relevante del AR es que en el exón 1 se encuentra codificado un fragmento de repetidos CAG que codifica para un tracto de poliglutaminas, dicho fragmento es polimórfico y varía de tamaño entre individuos y poblaciones<sup>19</sup>. En estudios *in vitro* se ha visto que esa variación en el número de repetidos CAG tiene un efecto en su actividad como factor transcripcional, incrementando su actividad a medida que disminuye el número de repetidos, aunque se desconoce el mecanismo por el que ocurre tal efecto<sup>43,47,48</sup>.

Por estos motivos, en este proyecto se decidió abordar el estudio del papel de los repetidos CAG del RA en el CaP desde un enfoque bioquímico, en el que se plantea

que los repetidos cortos de CAG pudieran favorecer el desarrollo del cáncer<sup>43,47</sup>. Nuestra hipótesis es que el cambio en el tamaño de la proteína del RA, como resultado de los diferentes números de repetidos CAG, puede modificar su conformación y afinidad por otras proteínas, como por ejemplo coactivadores y correpresores, lo que alteraría su actividad y podría favorecer ciertas vías de señalización o la transcripción de genes asociados por ejemplo con proliferación celular, que podrían beneficiar el desarrollo de CaP.

Como resultado de este trabajo, con respecto al enfoque molecular, se construyeron vectores con diferente número de repetidos CAG: corto (12), medio (22) y largo (33), con el objetivo de utilizarlos en ensayos *in vitro* para el estudio de la proteómica del RA en función de los repetidos CAG. Se utilizó como base el vector pCMV-hAR de *addgene*, un vector de expresión en mamíferos que contiene al gen AR humano. Se logró construir y empezar a probar el vector pCMV-hAR-His6X-P, el cual incluye una modificación para incorporar el tag His6X y la reincorporación del fragmento P, que se perdió en la primera estrategia de clonación para incorporar la etiqueta de histidinas. En teoría, el vector construido contiene todo lo necesario para funcionar y expresarse de igual manera que el pCMV-hAR sin modificar, y los resultados preliminares del WB apuntan a que es así, sin embargo, es necesario corroborarlo con otro WB utilizando un anti-His6X. Por otra parte, por cuestiones de tiempo, solamente se pudo hacer un ensayo de pull-down en el que no se logró purificar al RA-His6X, se pretende que como continuación de este proyecto se estandaricen las condiciones de la técnica para corroborar si se puede purificar la proteína por esta vía.

Una estrategia alternativa al uso del tag His6X para recuperar al RA es realizar una inmunoprecipitación (IP), ensayo para el cual se modificó el vector pCMV-hAR con los diferentes fragmentos con 12, 22 y 33 repetidos CAG para obtener los vectores: pCMV-hAR-12CAG, pCMV-hAR-22CAG y pCMV-hAR-33CAG. Para el ensayo de IP se investigó sobre el anticuerpo anti-AR adecuado a usar, debido a que se tiene que considerar que el anticuerpo no debe reconocer la región en la que se encuentran los repetidos CAG (dominio NTD), pues podría interferir en la interacción

de RA con las proteínas que nos interesa estudiar. El anticuerpo monoclonal elegido para estos ensayos fue el anti-AR Cat: ab226171 de abcam, que es adecuado para IP y reconoce la región de aminoácidos 870 a 920 del RA (dominio LBD), lo que resulta ideal porque no interfiere con la región de los repetidos CAG.

Por el momento, los resultados obtenidos no nos permiten concluir en qué medida afecta el tamaño de los repetidos CAG la unión con proteínas correguladoras del RA, sin embargo, se ha hecho un avance importante metodológico que contribuye al avance del estudio de dicho fenómeno. Es importante continuar con la investigación del papel de los repetidos CAG en la actividad del RA en el contexto del CaP porque es una enfermedad de alta prevalencia en nuestro país y en el mundo. Su estudio puede aportar información para ayudar en el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad, lo que beneficiaría a la población vulnerable a desarrollar este tipo de cáncer y mejorar la calidad de vida de los hombres que lo padecen o padecerán en un futuro.

## **VIII.**

## **CONCLUSIÓN**

---

Se lograron construir los vectores plasmídicos necesarios para la expresión del RA con diferente número de repetidos CAG (12, 22 y 33), se transfectaron en una línea celular de CaP y posteriormente se usarán como modelo en el estudio del papel de los repetidos CAG en el contexto del CaP.

## **IX.**

## **AVANCES Y PENDIENTES**

---

Los resultados obtenidos hasta el momento no nos permiten concluir en qué medida afecta el tamaño de los repetidos CAG la unión con proteínas correguladoras del RA, sin embargo, se hicieron importantes avances en el proyecto:

- Se clonaron los vectores: TA-12CAG, TA-22CAG, TA-33CAG, TA-His6X y TA-P.
- Se construyeron los vectores: pCMV-hAR-12CAG, pCMV-hAR-22 CAG, pCMV-hAR-33 CAG y pCMV-hAR-His6X-P.
- Se empezó a probar la expresión de los vectores pCMV-hAR y pCMV-hAR-His6X-P mediante WB.

Los siguientes pasos en el proyecto son:

- > Transfectar los vectores pCMV-hAR-12CAG, pCMV-hAR-22 CAG, pCMV-hAR-33 CAG y pCMV-hAR-His6X-P construidos en esta tesis en células PC3 para sobreexpresar las distintas versiones de AR.
- > Realizar ensayos de WB y pull-down para corroborar la expresión de los vectores construidos.
- > Realizar experimentos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo monoclonal anti-AR (ab226171, de abcam), que reconoce al RA en los aminoácidos 870-920.
- > Estudiar los patrones de proteínas que interactúa con cada uno de los receptores con diferente número de repetidos CAG.

## X.

## REFERENCIAS

---

- 1) Ruiz L, Pérez AI, Cruz JC, Lorenzo Y, Lienny E. Update on Prostate Cancer. *Correo Científico Médico* (2017) 21(3), 876-887.
- 2) Buchanan G, Craft PS, Yang M, Cheong A, Prescott J, Jia L, Coetzee GA, Tilley WD. PC-3 cells with enhanced androgen receptor signaling: a model for clonal selection in prostate cancer. *Prostate* (2004) 1;60(4):352-66.
- 3) Leslie SW, Soon-Sutton TL, Sajjad H, Larry E. Prostate Cancer. *StatPearls* (2021) Recuperado el 8 de agosto de 2021 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>
- 4) IARC. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. *International agency for research on cancer*. Recuperado el 3 de mayo del 2021 de <https://gco.iarc.fr/>
- 5) Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development* (2018) 32(17-18), 1105–1140.
- 6) Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol* (2017) 27(1):3-10.
- 7) Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* (2018) 8(12) a030361.
- 8) Haiman CA, Chen GK, Blot WJ, Strom SS, Berndt SI, Kittles RA, Rybicki BA, Isaacs WB, Ingles SA, Stanford JL, Diver WR, Witte JS, Chanock SJ, Kolb S, Signorello LB, Yamamura Y, Neslund-Dudas C, Thun MJ, Murphy A, Casey G, Sheng X, Wan P, Pooler LC, Monroe KR, Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Stram DO, Henderson BE. Characterizing genetic risk at known prostate cancer susceptibility loci in African Americans. *PLoS Genet* (2011) 7(5):e1001387.
- 9) Peter HG. Risk Factors for Prostate Cancer. *Rev Urol* (2002) 4(Suppl 5): S3–S10.
- 10) Ross R, Bernstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson B. Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *J Natl Cancer Inst* (1986) 76(1):45-8.
- 11) Giri VN, Beebe-Dimmer JL. Familial prostate cancer. *Semin Oncol* (2016) 43(5):560-565.
- 12) Quigley CA, DeBellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* (1995) 16(3):271-321.

- 13) Gonzalez-Montelongo MC, Marin R, Gomez T, Diaz M. Androgens are powerful non-genomic inducers of calcium sensitization in visceral smooth muscle. *Steroids* (2010) 75(8-9): 533-8.
- 14) Bensalah K, Lotan Y, Karam JA, Shariat SF. New circulating biomarkers for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* (2008) 11, 112–120.
- 15) Talamini R, La Vecchia C, Decarli A, Negri E, Franceschi S. Nutrition, social factors and prostatic cancer in a Northern Italian population. *Br J Cancer* (1986) 53(6): 817–821.
- 16) Bolaños MP, Chacón AC. Pathologic Gleason score for prostate cancer and its modifications. *Medicina Legal de Costa Rica* (2017) 34(1), 237-243.
- 17) McBride JA, Carson CC. Testosterone deficiency in the aging male. *Therapeutic advances in urology* (2016) 8(1), 47–60.
- 18) Quigley CA, DeBellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FF. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* (1995) 16: 271-321.
- 19) Davey R, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem* (2016) 37(1): 3–15.
- 20) Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology* (2017) 8.
- 21) Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis* (2011) 10, 20.
- 22) Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health* (2018) 36:e32.
- 23) Crona D, Young EW. Androgen Receptor-Dependent and Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers* (2017) 9(6), 67.
- 24) Eder IE, Culig Z, Putz T, Nessler-Menardi C, Bartsch G, Klocker H. Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. *Eur Urol* (2001) 40(3):241-51.
- 25) Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews* (2007) 28(7), 778-808.
- 26) Cao S, Zhan Y, Dong Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* (2016) 23(12):T199-T210.

- 27) Lu C, Luo J. Decoding the androgen receptor splice variants. *Translational andrology and urology* (2013) 2(3), 178–186.
- 28) Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cellular and molecular life sciences* (2011) 68(24), 3971–3981.
- 29) Knudsen KE, Scher HI. Starving the Addiction: New Opportunities for Durable Suppression of AR Signaling in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* (2009) 15(15), 4792–4798.
- 30) Jasuja R, Ulloor J, Yengo CM, Choong K, Istomin AY, Livesay DR, Jacobs DJ, Swerdloff RS, Mikšovská J, Larsen RW, Bhasin S. Kinetic and thermodynamic characterization of dihydrotestosterone-induced conformational perturbations in androgen receptor ligand-binding domain. *Molecular endocrinology* (2009) 23(8), 1231–1241.
- 31) Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* (2002) 23(2):175-200.
- 32) McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* (1999) 20(3):321-44.
- 33) Chmelar R, Buchanan G, Need EF, Tilley W, Greenberg NM. Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer* (2007) 120(4):719-33.
- 34) DePriest AD, Fiandalo MV, Schlanger S, Heemers F, Mohler JL, Liu S, Heemers HV. Regulators of Androgen Action Resource: a one-stop shop for the comprehensive study of androgen receptor action. *Database: the journal of biological databases and curation* (2016) bav125.
- 35) Heemers HV, Tindall DJ. Unraveling the Complexities of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Cancer Cell* (2009) 15, 245–247.
- 36) Agoulnik IU, Weigel NL. Coactivator selective regulation of androgen receptor activity. *Steroids* (2009) 74, 669–674.
- 37) Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* (2003) 10:209- 216.
- 38) Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* (2002) 1;20(13):3001-15.
- 39) Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* (2008) 15:841- 849.

- 40) Taplin ME, Ho SM. The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* (2001) 86:3467-3477.
- 41) MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion. *J Neurol Sci* (1996) 135(2):149-57.
- 42) Möncke-Buchner E, Reich S, Mücke M, Reuter M, Messer W, Wanker EE, Krüger DH. Counting CAG repeats in the Huntington's disease gene by restriction endonuclease EcoP15I cleavage. *Nucleic acids research* (2002) 30(16), e83.
- 43) Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* (2000) 25(1):85-96.
- 44) Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* (2004) 25:276-308.
- 45) Werner R, Holterhus PM, Binder G, Schwarz HP, Morlot M, Struve D, Marschke C, Hiort O. The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91: 3515–20.
- 46) Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica* (2015) 36(1), 3–23.
- 47) Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate* (2004) 58(1):23-32.
- 48) Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* (1994) 22(15):3181-6.
- 49) Zeegers MP, Kiemeny LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2004) 13(11Pt1):1765-71.
- 50) Gu M, Dong X, Zhang X, Niu W. The CAG repeat polymorphism of androgen receptor gene and prostate cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* (2012) 39, 2615–2624.
- 51) Sun JH, Lee SA. Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG)<sub>n</sub> repeat polymorphisms. *Int J Mol Med* (2013) 32, 1195–1203.

- 52) Weng H, Li S, Huang JY, He ZQ, Meng XY, Cao Y, Fang C, Zeng XT. Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* (2017) 7, 40554.
- 53) Qin Z, Li X, Han P, Zheng Y, Liu H, Tang J, Yang C, Zhang J, Wang K, Qi X, Tang M, Wang W, Zhang W. Association between polymorphic CAG repeat lengths in the androgen receptor gene and susceptibility to prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* (2017) 96(25), e7258.
- 54) Rojas D, Manzo DJ. The androgen receptor in the prostate physiopathology. *eNeurobiología* (2011) 2(4):230511.
- 55) González P. Identificación de mutaciones en el gen del receptor de andrógenos de pacientes mexicanos con cáncer de próstata. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México] (2017) UNAM.
- 56) Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC Reiter RE, Gillissen S, Van der Kwast T, Bristow RG. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers* (2021) 7, 9.
- 57) Taplin ME, Balk SP. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* (2004) 91(3):483-90.

**ANEXO 1****Soluciones y medios de cultivo****Buffer TBE 10X (Tris/Ácido bórico/EDTA)**

Para preparar 1L:

- Pesar 108 g Tris y 55 g ácido bórico, disolver en 900 mL de agua bidestilada
- Agregar 40 mL de una solución 0.5 M de Na<sub>2</sub>EDTA, ajustar volumen a 1 L con agua bidestilada. Guardar cerrado a temperatura ambiente.

**Medio LB**

Para prepara 1 L pesar:

- 10 g de peptona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de NaCl

Agregar 900 mL de agua bidestilada y mezclar, ajustar pH a 7.0 con NaOH.

Ajustar el volumen a 1 L con agua bidestilada, esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente.

**Medio LB sólido + Ampicilina (placas)**

Pesar los componentes descritos para medio LB y agregar 15 g de agar por cada litro. Esterilizar en autoclave de la misma manera y permitir enfriar a unos 50°C.

Vaciar en placas Petri estériles, dejar enfriar y guardar a 4°C.

**Buffer de transferencia**

Para preparar 1 L pesar:

- 3.03 g de Tris-Base
- 14.4 g de glicina

- 200 mL de metanol (20%v/v)

Mezclar en 900 mL de agua bidestilada, llevar a 1 L y almacenar en un frasco cerrado.

### **Buffer para SDS-PAGE (Running buffer) 10X**

Para preparar 1 L pesar:

- 10 g de SDS
- 30.3 g de Tris-Base
- 144.1 g de glicina

Mezclar en 900 mL de agua bidestilada, llevar a 1L y almacenar en un frasco cerrado.

### **PBS 10X**

Para preparar 1L pesar:

- 80 g de NaCl
- 2 g de KCl
- 26.8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Mezclar en 800 mL de agua bidestilada, ajustar pH a 7.4 con HCl y llevar a 1 L y almacenar en un frasco cerrado.

### **PBT**

Para preparar 1 L:

- Partir de PBS 1X y adicionar 0.2% de Tween 20.

Agitar muy bien, almacenar en un frasco cerrado.

### **Solución de bloqueo (Bloking)**

Para preparar 1 L:

- Partir de PBT y adicionar 5% de leche desgrasada en polvo
- Mezclar muy bien usar en el momento.

## **Buffer RIPA**

Para preparar 10mL de RIPA 1X colocar:

- 1.5 mL NaCl 1M
- 500 µL Tris pH 7.5 1M
- 500 µL DOC (deoxicolato de sodio) 10%
- 100 µL SDS (Dodecil Sulfato De Sodio) 10%
- 1 mL Tritón 1%
- 6.4 mL H<sub>2</sub>O

Disolver y agregar 1 tableta de inhibidor de proteasas con pinzas, agitar con mosca hasta que se disuelva por completo.

Hacer alícuotas y guardar a -20 °C. (Se debe descongelar lo menos posible)

## **Gel de acrilamida al 8%**

> Gel separador

Para preparar 20 mL, agregar en el siguiente orden:

- 9.3 mL H<sub>2</sub>O
- 5.3 mL acrilamida 30%
- 5.0 mL Tris 1.5M pH 8.8
- 0.2 mL SDS 10%
- 0.2 mL APS 10%
- 0.012 mL TEMED

Colocar en vidrios montados en soporte con para que se forme el gel.

> STACK

Para preparar 5 mL, agregar en el siguiente orden:

- 3.4 mL H<sub>2</sub>O
- 0.83 mL acrilamida 30%
- 0.63 mL Tris 1M pH 6.8
- 0.05 mL SDS 10%

- 0.05 mL APS 10%
- 0.005 mL TEMED

Agregar 0.4 mL de isopropanol sobre el gel separador y colocar el STACK.  
Esperar a que se forme el gel y desmontar para usar.

### **Medio DMEM-F12**

Para preparar 1L:

- 1 sobre de Gibco™ DMEM/F-12
- 2.438 g NaHCO<sub>3</sub>
- 3.574 g HEPES buffer
- 10 mL piruvato de sodio 100 mM

Mezclar y ajustar a pH 7.2, posteriormente filtrar para esterilizar.

Antes de usar, agregar y ajustar concentración de FBS al 6% y streptomicina-penicilina 1X.

### **Para pull-down:**

#### **Buffer de lisis (Lysis buffer)**

Para preparar 1 L:

- 6.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O
- 17.54 g NaCl
- 0.68 g imidazole

Mezclar y ajustar pH a 8.0 utilizando NaOH

#### **Buffer de lavado (Wash buffer)**

Para preparar 1 L:

- 6.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O
- 17.54 g NaCl
- 1.36 g imidazole

Mezclar y ajustar pH a 8.0 utilizando NaOH

### **Buffer de elución (Elution buffer)**

Para preparar 1 L:

- 6.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O
- 17.54 g NaCl
- 17 g imidazole

Mezclar y ajustar pH a 8.0 utilizando NaOH

## **ANEXO 2**

### **Células PC3**

Descripción de la línea celular:

Organismo: *Homo sapiens*, humano

Tejido: próstata

Edad: 62 años

Género masculino

Morfología: epitelial

Propiedades de crecimiento: adherente

Enfermedad: adenocarcinoma; Grado IV

## **ANEXO 3**

Anticuerpos utilizados:

**Anti-AR:** AR Antibody (C-19), sc-815 de Santa Cruz Biotechnology.

**Anti-His6X:** His-Tag (27E8) Mouse mAb #2366, de Cell Signaling Technology.

**Anti-rabbit:** mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357 de Santa Cruz Biotechnology.

**Anti-mouse:** m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 de Santa Cruz Biotechnology.

## ANEXO 4

Foto de microscopio de fluorescencia, células PC3 luego de 24 h transfectadas con el vector TL311621.

