

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**FÁRMACOS EPIGENÉTICOS CON EFECTO EN LA ACTIVIDAD
PROMOTORA DEL GEN *RBI* EN CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS**

POR

L.B.G. JORGE EDUARDO VARGAS GÓMEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

AGOSTO, 2019

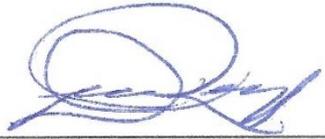
**“FÁRMACOS EPIGENÉTICOS CON EFECTO EN LA ACTIVIDAD
PROMOTORA DEL GEN RB1 EN CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS”**

Comité de Tesis



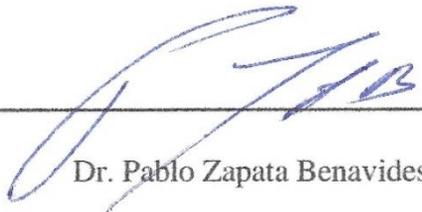
Dra. Vianey González Villasana.

Presidente



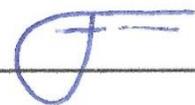
Dra. Diana Reséndez Pérez.

Secretario



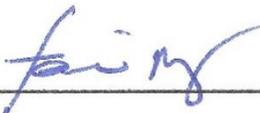
Dr. Pablo Zapata Benavides.

Vocal



Dr. José Manuel Vázquez Guillén.

Vocal



Dr. Fermín Mar Aguilar

Vocal

**“FÁRMACOS EPIGENÉTICOS CON EFECTO EN LA ACTIVIDAD
PROMOTORA DEL GEN RB1 EN CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS”**

Dirección de Tesis



Dra. Vianey González Villasana

Director Interno



Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León.

Director Externo

**“FÁRMACOS EPIGENÉTICOS CON EFECTO EN LA ACTIVIDAD
PROMOTORA DEL GEN RB1 EN CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS”**

Por

L.B.G. Jorge Eduardo Vargas Gómez

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Vianey González Villasana, y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la asesoría del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León. El proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social a través del Fondo de Investigación en Salud con número de registro R-2014-1906-22 y número de protocolo FIS/IMSS/PROT/G17-2/1746.



Dra. Vianey González Villasana.

Director Interno



Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León

Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de progresar en mi formación académica, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado (Becario No. 817006), al Instituto Mexicano del Seguro Social, por la disposición de las instalaciones y equipo, así como el financiamiento otorgado para la realización del proyecto y el apoyo económico complementario (Becario No. 2017-85).

Al Dr. Uchiumi de la Universidad de Ciencias de Tokio por la donación de plásmidos usados en este proyecto. A mi comité de tesis por sus sugerencias y correcciones a lo largo del proyecto.

A mis directores de tesis Dra. Vianey González Villasana y Dr. Mario A. Bermúdez de León por su apoyo, guía y tiempo brindado en la realización del proyecto.

DEDICATORIA

*A mis padres porque cada paso dado
es derivado de sus enseñanzas*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Cáncer.....	3
2.2. Estadística del cáncer	3
2.2. Cáncer hepático	4
2.3. Factores relacionados al desarrollo del cáncer hepático.....	4
2.4. Genes involucrados en el desarrollo del cáncer	6
2.5. Cambios transcripcionales.....	7
2.6. Epigenética	8
2.7. Cambios covalentes en histonas	8
2.8. Metilación del DNA	9
2.9. Gen supresor de tumores <i>RBI</i>	10
2.8. Fármacos epigenéticos	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVO	16
5.1. Objetivo general	16

5.2. Objetivos específicos.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1. Recuperación de las construcciones	17
6.2. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5- α competentes con la construcción pGL4-RB1	17
6.3. Caracterización del vector pGL4-RB1	17
6.4. Caracterización de las construcciones	18
6.5. Purificación de DNA plasmídico.	19
6.6. Cultivo celular	20
6.7. Selección y determinación de la concentración del fármaco.....	21
6.8. Tratamientos farmacológicos.	21
6.9. Transfección celular	22
6.10. Extracción de DNAg	23
6.11. Conversión del DNA por tratamiento con bisulfito.	23
6.12. PCR a partir del DNA genómico tratado con bisulfito.....	24
6.13. Clonación de los fragmentos amplificados.	25
6.14. Secuenciación.....	26
6.15. Análisis estadísticos	28
7. RESULTADOS.....	29
7.1. Caracterización de las construcciones pGL10 [Luc2] y pGL4-RB1.....	29
7.2. Secuenciación del vector pGL4-RB1.....	29
7.3. Actividad promotora del gen <i>RB1</i> en la línea celular HepG2.	30
7.4. Actividad promotora del gen <i>RB1</i> en la línea celular Huh-7.....	34
7.5. Análisis de metilación de islas CpG en el promotor <i>RB1</i> en presencia de fármacos epigenéticos en la línea celular HepG2.....	35
8. DISCUSIÓN	38

9. CONCLUSIÓN.....	43
10. PERSPECTIVAS	44
11. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores para la región blanco del ensayo BSP.....	25
Tabla 2. Cálculos para la amplificación por PCR del promotor RB1 para BSP.....	25
Tabla 3. Programa para la amplificación del promotor RB1 para BSP	25
Tabla 4. Cálculos para la reacción de marcaje	27
Tabla 5. Programa para la reacción de marcaje	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios en la metilación del DNA en células con cáncer	10
Figura 2. Expresión del gen <i>RBI</i> por efecto de fármacos epigenéticos en células HepG2	13
Figura 3. Vector pGL4.10 [luc2]Vector.....	19
Figura 4. Caracterización de los vectores pGL4.10 [Luc 2] y pGL4-RB1 por enzimas de restricción.....	29
Figura 5. Análisis de la secuencia del vector pGL4-RB.1.....	30
Figura 6. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular HepG2..	31
Figura 7. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular HepG2 en presencia de fármacos epigenéticos a las 24 h.	32
Figura 8. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular HepG2 en presencia de 5-Aza-2' desoxicitidina a 24h y 48h.	32
Figura 9. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular HepG2 en presencia de fármacos epigenéticos a las 48 h.	33
Figura 10. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular HepG2 en presencia del fármaco isotretinoína a diferentes concentraciones.....	34
Figura 11. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular Huh-7.....	34
Figura 12. Actividad luciferasa del promotor <i>RBI</i> en la línea celular Huh-7 en presencia de fármacos epigenéticos a las 24 h.	35
Figura 13. Análisis de metilación del promotor <i>RBI</i> en presencia de fármacos epigenéticos en la línea celular HepG2.....	37

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AFB1	Aflatoxina B1
BSP	Secuenciación por bisulfito (por sus siglas en inglés <i>Bisulfite sequencing PCR</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNAg	ADN genómico (<i>genomic DNA</i>)
DNMT	DNA metiltransferasa (<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gravedades
h	Hora u horas
HAT	Histona acetiltransferasa
HCC	Carcinoma hepatocelular (por sus siglas en inglés <i>Hepatocellular carcinoma</i>)
HDAC	Histona desacetilasa
HDM	Histona desmetilasas
HMT	Histona metiltransferasa
LB	Laura Bertani
min	Minutos
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitros
mRNA	RNA Mensajero (por sus siglas en inglés <i>Messenger RNA</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (por sus siglas en inglés <i>Ribonucleic acid</i>)

S	Segundo o segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico (por sus siglas en inglés <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
TA	Temperatura Ambiente
T_m	<i>Melting temperature</i>
URL	Unidades Relativas de Luciferasa
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
μg	Microgramo
μM	Micromolar
μL	Microlitro

RESUMEN

El gen *RBI* es un gen supresor de tumores que se encuentra reprimido en el carcinoma hepatocelular. Previamente, se observó que los niveles de mRNA del gen *RBI* se incrementan por efecto de dos fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida, en la línea celular HepG2. En la presente tesis se analizó el efecto de estos fármacos sobre la región promotora del gen *RBI* en las líneas celulares de cáncer hepático HepG2 y Huh-7. La evaluación de la actividad promotora de *RBI* se realizó a través de un sistema de vectores plasmídicos conteniendo al promotor fusionado al gen reportero de luciferasa (construcción pGL4-RB1). Los plásmidos se transfectaron en las líneas celulares mediante lipofección. Una vez transfectadas, las células fueron expuestas a fármacos moduladores de la epigenética a diferentes concentraciones y periodos de tiempo, y se determinó la actividad de luciferasa. Por otro lado, para la determinación de los niveles de metilación en el promotor de *RBI*, se llevó a cabo el ensayo de secuenciación por bisulfito de sodio, empleando el DNA genómico de las células HepG2 que fueron tratadas con el fármaco isotretinoína, para después realizar la conversión por bisulfito. Luego de la conversión, se realizó la amplificación del promotor mínimo de *RBI*, y el fragmento amplificado se subclonó en un vector comercial para el análisis de metilación por secuenciación automatizada. Los resultados obtenidos muestran un incremento de 13.55% y 25% de la actividad promotora del gen *RBI* por efecto del fármaco isotretinoína a las concentraciones de 5 y 10 μM en la línea celular HepG2 a las 24 h. A las 48 h a una concentración de 10 μM , la actividad del promotor disminuyó 39% en las células HepG2 y 44% en la línea celular Huh-7 (24 h). No se observó una diferencia significativa en la actividad del promotor *RBI* en presencia del fármaco talidomida en ninguno de los ensayos realizados en las dos líneas celulares. En el perfil de metilación del promotor de *RBI*, no se observó una diferencia significativa en el porcentaje de metilación de las islas CpG en presencia de isotretinoína en las células HepG2. Nuestros resultados sugieren que el fármaco isotretinoína es capaz de incrementar la actividad del promotor de *RBI* en células hepáticas, pero no a través de la modificación del porcentaje de metilación en la región promotora.

ABSTRACT

The *RB1* gene is a tumor suppressor gene. It has been observed that the *RB1* gene is repressed in hepatocellular carcinoma. Previously it was observed that the expression of *RB1* was increased in the presence of the epigenetic drugs isotretinoin and thalidomide in the HepG2 cell line. In the present work we analyzed the effect of these drugs in the promoter region of the *RB1* gene in the HepG2 and Huh-7 cell line. The evaluation of the luciferase activity of *RB1* that was performed by a plasmidic vector system containing the promoter fused to the luciferase reporter gene (construction pGL4-RB1). Plasmids were transfected into cell lines by lipofection. Once transfected, the cells were exposed to the epigenetic modulating drugs at different time periods and the luciferase activity was measured. On the other hand, for the determination of levels of methylation in the *RB1* promoter, the sequencing test was carried out by sodium bisulfite, using the genomic DNA of HepG2 cells that were treated with the drug isotretinoin, to then perform bisulfite conversion. After conversion, amplification of the minimum *RB1* promoter was performed, and the amplified fragment was subcloned into a commercial vector for automated sequencing methylation analysis. The results showed an increase of 13.55% and 25% in the promoter activity of the *RB1* gene due to the effect of the drug isotretinoin concentrations 5 and 10 μM in the HepG2 cell line at 24 h. After 48 h at concentration of 10 μM , the promoter activity decreased 39% in HepG2 cells and 44% in Huh-7 cell line at 24 h. No significant difference in the activity of the *RB1* promoter was observed in the presence of the drug thalidomide, in any of the tests performed on the two lines. In the methylation profile of the *RB1* promoter, no significant difference was observed in the percentage of methylation of the CpG islands in the presence of isotretinoin in HepG2 cells. Our results suggest that the drug isotretinoin is able to increase the activity of the *RB1* promoter in liver cells, but this event is not through the modification of the percentage of methylation in the promoter region.

1. INTRODUCCIÓN

Se ha denominado cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento de células anormales más allá de su comportamiento habitual, pudiendo invadir partes adyacentes del cuerpo y/o propagarse a otros órganos (NIH, 2019). Se estima que en el 2018 a nivel mundial se presentaron 9,555,027 muertes ocasionadas por el cáncer, de estas 781,631 se debieron al cáncer hepático, ocupando así el cuarto lugar de mortalidad por cáncer (GLOBOCAN, 2018). A pesar de estos números, el carcinoma hepatocelular (*HCC, Hepatocellular Carcinoma*) es uno de los tipos de cáncer menos comprendido, lo que limita sus opciones terapéuticas. Los principales factores para el desarrollo de esta enfermedad son el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, alcohol e hígado graso (McGlynn *et al.* 2015)). Los eventos genéticos que contribuyen a la iniciación y progresión del HCC pueden ser clasificados como genómicos (mutaciones somáticas y cambios en la estructura del genoma, como fusión de genes o variaciones en el número de copias), epigenéticos (cambios en la metilación del DNA, remodelamiento de la cromatina, cambios en la presencia de microRNAs), transcripcionales y RNA largos no codificantes (lnc RNAs). Cuando las mutaciones no somáticas ocurren en protooncogenes o genes supresores de tumores pueden provocar el desarrollo de la tumorigénesis. Se han identificado diversas mutaciones en el HCC, las mejor caracterizadas son en los genes *CTNNB1, TP53, AXIN1, ARID1A, ARID2, NFE2L2* y *RBI* (Dhanasekaran *et al.* 2019). El gen *RBI* se localiza en el cromosoma 13, en el brazo largo, tiene 178,212 pares de bases, presenta un mRNA de 4,840 pb, y su proteína consta de 928 aminoácidos (Hong *et al.*, 1989). La proteína *RBI* interactúa con más de 110 proteínas, incluyendo factores que se unen al DNA, así como también proteínas con múltiples funciones en la remodelación de la cromatina y control del ciclo celular (Anwar *et al.* 2014; Lamber *et al.* 2013; Uchida 2016). Se ha observado que el gen *RBI* se encuentra silenciado en el HCC, por metilación en su región promotora (Pogribny & Rusyn 2014). La pérdida de la funcionalidad de *RBI* se ha relacionado con un mal pronóstico en HCC (Edamoto *et al.* 2003), por lo que el desarrollo de terapias que ayuden a restablecer su funcionalidad podrían ser de gran ayuda para el tratamiento del HCC. Debido al potencial de reversibilidad de las modificaciones epigenéticas recientemente se ha enfocado el estudio de estos cambios como blancos clave

para el desarrollo de nuevas terapias. En los últimos años se han identificado agentes capaces de revertir cambios epigenéticos aberrantes en las células tumorales y así restaurar el fenotipo epigenético "normal", los cuales han sido catalogados como fármacos epigenéticos (Anestopoulos *et al.* 2015). Previamente en nuestro grupo de trabajo se evaluó la expresión de *RBI* en presencia de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida en la línea celular de cáncer hepático HepG2, presentando un aumento significativo en sus niveles de mRNA. Por lo que en la presente investigación se propuso determinar si los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida incrementan la actividad del promotor del gen *RBI* en las líneas celulares hepáticas HepG2 y Huh-7.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

Se ha denominado cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento de células anormales más allá de su comportamiento habitual, que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y/o propagarse a otros órganos. Se han establecido tres parámetros que definen al cáncer: es multifactorial, se desarrolla en múltiples etapas y es multigénico (Vogelstein *et al.* 2013).

Los factores que provocan el cáncer se dividen en dos grupos; factores endógenos y factores exógenos (Yoo & Jones 2006). Como factores endógenos se encuentra el aumento de radicales libres, la sobreexpresión de enzimas participantes en procesos transcripcionales y el aumento de los niveles hormonales. Como factores exógenos se tienen factores ambientales químicos y físicos; donde los compuestos intercalantes o aquellos que se unen al DNA son químicos y la radiación UV no ionizante es físico (Helleday *et al.* 2014).

El cáncer puede afectar casi cualquier parte del cuerpo y tiene subtipos que requieren estrategias específicas de manejo (Reis *et al.* 2016). A pesar de la diversidad de este grupo de patologías se han propuesto marcas distintivas para ubicar al tipo de cáncer. Dentro de estas marcas se encuentra la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a muerte celular, replicación inmortal, inducción de angiogénesis, activación de invasión, metástasis, reprogramación en el metabolismo energético y evasión del sistema inmune. Estas modificaciones en el metabolismo permiten a la célula una autorregulación generando un microambiente benéfico para su desarrollo (Hanahan & Weinberg 2000, 2011). Para el desarrollo de este microambiente no se ha encontrado una causa única, sino un mal funcionamiento multifactorial afectado tanto por vías génicas como epigenéticas en el cual se pueden ver comprometidos tres grupos de genes: genes de reparación, oncogenes y genes supresores de tumores (Bélanger *et al.* 2005).

2.2. Estadística del cáncer

Se estima que en el 2018 a nivel mundial se presentaron 9,555,027 muertes ocasionadas por el cáncer, de estas 781,631 se debieron al cáncer hepático, ocupando así el cuarto lugar de mortalidad entre tipos de cáncer (GLOBOCAN, 2018).

En el 2018 GLOBOCAN reportó que se estimaban 7,265 nuevos casos de HCC, calculando 6,867, de acuerdo con estas cifras se posiciona en el puesto 10 de mayor número de nuevos casos de cáncer y en el lugar 3 de mayor número de muertes (GLOBOCAN, 2018).

En otros estudios publicados en el 2016 por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el que se incluyó la población que había sido atendida por el organismo reportaba durante el año 2013 se reportaba al cáncer hepático como la 5ta causa de muerte de tipos de cáncer en una población de 20 años en adelante, con 2,203 casos (representando el 7.4% del total de casos), dividiéndose los casos en 1092 en hombres y 1,111 en mujeres (Borja *et al.* 2016).

En México se estima que en el 2018 se presentaron 7,265 casos de nuevos de cáncer hepático, ubicándolo en el décimo lugar de incidencia entre tipos de cáncer, respecto a la mortalidad ocupa el tercer lugar, estimando 6,868 muertes en este mismo año (GLOBOCAN, 2018). A pesar de estos alarmantes números, el carcinoma hepatocelular es uno de los canceres menos comprendidos, limitando así sus opciones terapéuticas.

2.2. Cáncer hepático

Existen diferentes manifestaciones de cáncer en el hígado, el más común es el Carcinoma Hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés de *Hepatocellular carcinoma*). Es el principal tipo de cáncer hepático en adultos. Su crecimiento puede darse de dos formas: algunos empezando como un tumor sencillo que continúa creciendo, y cuando la enfermedad es avanzada se propaga a otras partes del hígado; Un segundo tipo es el que se desarrolla con la presencia de diversas manchas de pequeño tamaño presentes en el hígado. De acuerdo con la ACS (American Cancer Society) este desarrollo es más frecuente en personas que han padecido cirrosis de hígado.

2.3. Factores relacionados al desarrollo del cáncer hepático

Entre los factores que afectan principalmente al desarrollo del Carcinoma Hepatocelular, se encuentran el virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, aflatoxina, alcohol y tabaco. Se ha descrito diferencias considerables en cómo afectan estos factores a distintas poblaciones según su género, o procedencia étnica (Ryerson *et al.* 2016). En países con una gran diversidad de etnias se ha observado variaciones en los índices y causas dentro

de grupos étnicos provenientes de diversas partes del mundo, presentando una variación dependiente del grupo étnico y su locación (McGlynn *et al.* 2015).

En las regiones con mayores índices de HCC de Asia y África los factores de mayor riesgo son el VHB y aflatoxina AFB1. Mientras que en las regiones con menor índice los factores de mayor importancia son VHC, consumo excesivo de alcohol y desordenes metabólicos, como diabetes, obesidad y síndrome metabólico (McGlynn *et al.* 2015).

Países con una prevalencia mayor al 2% del VHB han visto incrementado sus porcentajes de incidencia y mortalidad de HCC (De Martel *et al.* 2015). El modo de actuar del VHB es integrando su DNA dentro del genoma de células hepáticas en la mayoría de los casos de HCC (Kohli 2016).

El VHC pertenece a la familia de virus de RNA Flaviviridae (Lafaro *et al.* 2015). En el norte de África se presenta la mayor tasa de infecciones crónicas por VHC. El VHC presenta variaciones en relación con el desarrollo de HCC en distintos países: de 44% a 60% en Italia, de 80% a 90% en Japón. Se ha registrado que se aumentan 17 veces las posibilidades de desarrollar HCC si se presenta una infección por VHC (Lafaro *et al.* 2015).

Otro de los factores fuertemente relacionados con el desarrollo de HCC son las aflatoxinas. Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus*, las cuales ingresan al organismo infectando los alimentos, y es conocido su efecto hepatocarcinogénico. La aflatoxina con mayor efecto es la Aflatoxina B1 (AFB1), y ha sido clasificada por la IARC (*International Agency For Research on Cancer*) dentro del grupo 1 de carcinógenos humanos. África, el sureste de Asia y China son las zonas donde se han registrado los mayores niveles de AFB1 (Lafaro *et al.* 2015). La exposición a AFB1 implica a una mutación en el DNA en el gen supresor de tumores p53 en la tercera base del codón 249. El riesgo de desarrollo de HCC puede aumentarse 4 veces en personas expuestas a AFB1 (Lafaro *et al.* 2015).

El alcohol es otro factor involucrado en el desarrollo de HCC, pues su consumo frecuente resulta en falla crónica de hígado. Se ha registrado sinergia del alcohol en presencia de VHB y VHC que con lleva al desarrollo de HCC (McGlynn *et al.* 2015). En un meta-

análisis de varios estudios se estimó un aumento de 16% en padecimiento de cáncer de hígado en consumidores que ingirieron alcohol más de 3 veces al día y un 22% en los que ingerían más de 6 veces por día (McGlynn *et al.* 2015).

Se ha observado una relación de los desórdenes metabólicos como obesidad y diabetes con el desarrollo de HCC. Se ha estimado un aumento de 2 a 2.5 veces en la probabilidad de desarrollar HCC en relación al padecimiento de diabetes, en distintas poblaciones e independiente de otros factores. A la vez se ha observado relación con el sobrepeso, una persona con sobrepeso presenta 1.17 veces más riesgo de desarrollar HCC, mientras que una persona con obesidad presenta un incremento de 1.87 más de riesgo (McGlynn *et al.* 2015).

Se ha demostrado que varios factores de riesgo asociados con el HCC pueden promover daños en el DNA, intercalamiento en el DNA y aberraciones cromosómicas. Por lo tanto, las alteraciones en las vías de respuesta a daño en el DNA pueden acumular estas lesiones para desencadenar la hepatocarcinogénesis y su progresión (Yang *et al.* 2014).

Los eventos genéticos que contribuyen a la iniciación y progresión del HCC pueden ser clasificados como genómicos (mutaciones somáticas y cambios en la estructura del genoma, como fusión de genes o variaciones en el número de copias), epigenéticos (cambios en la metilación del DNA, remodelamiento de la cromatina, cambios en la presencia de microRNAs), RNA largos no codificantes (lnc RNAs) y transcripcionales (cambios en la expresión génica) (Dhanasekaran *et al.* 2019).

2.4. Genes involucrados en el desarrollo del cáncer

Los genes de reparación no tienen un papel en el control de proliferación o el crecimiento celular, pues desempeñan su función como un conjunto de moléculas actuando en grupo dependiendo del tipo de reparación que se realice; los de reparación por desapareamiento o MMR (*Mismatched repair*), reparación por escisión de nucleótidos o NER (*Nucleotide excision repair*), y reparación por escisión de bases o BER (*Base excision repair*) (Kunkel *et al.* 2015; Li *et al.* 2015). Estos grupos de genes cumplen la función de reparar errores que ocurren en la replicación del DNA o por exposición a mutágenos que pudieran desarrollar alteraciones en la información génica (Friedberg 2003). Al encontrarse mutados los genes de reparación, se incrementan la presencia de mutaciones en el genoma,

incrementando así las posibilidades de que se muten los protooncogenes (convirtiéndolos en oncogenes) y/o genes supresores de tumores, promoviendo el desarrollo o progresión de procesos neoplásicos.

Los oncogenes son genes los cuales han sido alterados, y tienen mayor actividad que en su estado normal, presentando actividad en etapas donde debería haber baja o nula actividad. Esto puede ser causado al ocurrir una translocación del gen a una zona de alta actividad, o un aumento en el número de copias, o cambios en la secuencia aminoacídica que altere la regulación o funcionamiento del producto del gen (Pagliarini *et al.* 2015).

Los genes supresores de tumores son los encargados de controlar el ciclo celular y salvaguardan el funcionamiento adecuado de la célula previniendo procesos anormales. La función de los supresores de tumores puede ser a través del arresto del crecimiento excesivo de células o el crecimiento y propagación de células con errores en su genoma, por medio de la inducción a un estado de senescencia, u ordenando la muerte celular por apoptosis. El funcionamiento de este grupo de genes puede verse afectado si algún gen presenta una mutación en su secuencia nucleotídica que conlleve a un cambio aminoacídico que afecte el funcionamiento de la proteína, Otras mutaciones pueden generar a una proteína trunca, o cambios en los niveles de expresión afectados por mutaciones en regiones reguladoras tales como la unión de factores de transcripción, miRNAs o cambios en la región promotora (Sherr & McCormick 2002; Yoo & Jones 2006).

Cuando las mutaciones no somáticas ocurren en protooncogenes o genes supresores de tumores pueden provocar el desarrollo de la tumorigénesis. Se han identificado diversas mutaciones en el HCC, las mejor caracterizadas son en los genes *CTNNB1*, *TP53*, *AXIN1*, *ARID1A*, *ARID2*, *NFE2L2* y *RBI* (Dhanasekaran, *et al.* 2019).

2.5. Cambios transcripcionales

En histonas dependiendo específicamente en el residuo de lisina la metilación puede llevar a la activación o represión de la transcripción. Generalmente la metilación de la lisina en la posición 9 de la histona H3 (H3K9), H3K27 y H4K20 están asociadas con la represión de genes. Por el contrario, la metilación de H3K4 y H3K36, así como la acetilación de la H3 y H4 producen la activación de la expresión de genes (Perri *et al.* 2017).

Algunos ejemplos de cambios en la metilación que pueden influenciar en el desarrollo de la HCC son la trimetilación de la lisina 4 y la lisina 27, las cuales su sobreexpresión se encuentra correlacionada en pacientes con una supervivencia general reducida y un mal pronóstico². Otro mecanismo de regulación de genes por epigenética es la remodelación de la cromatina, lo que incluye el cambio dinámico en la estructura de la cromatina que regula la expresión génica, apoptosis y reparación del DNA (Dhanasekaran, *et al.* 2019).

2.6. Epigenética

La epigenética concierne “más allá de los genes” o “algo además de la genética” y es definida como un grupo de cambios heredables en la expresión de genes ocurridos sin alteraciones en la secuencia de DNA (Perri *et al.* 2017). En el núcleo eucariótico, el DNA es compactado en una estructura definida como cromatina, la cual es la unidad básica del nucleosoma. Cada nucleosoma está constituido por un complejo multiprotéico llamado histona, rodeada por 145 pb a 147 pb de DNA. Una histona está compuesta por un octámero de 4 pares de proteínas, llamadas H3, H4, H2A y H2B. Estas grandes moléculas están primeramente superenrolladas y después empaquetadas en histonas, permitiendo su compresión en una sola célula (Perri *et al.* 2017). La cromatina puede presentar dos estados diferentes en su conformación, dependiendo del enrollamiento del DNA, pudiendo encontrarse de manera relajada permitiendo la transcripción de genes, eucromatina; y el DNA en estado superenrollado, lo cual no permite el acceso a la maquinaria necesaria, para llevar a cabo la transcripción. Siendo estos mecanismos de regulación de la expresión génica los cuales derivan en múltiples fenotipos (Perri *et al.* 2017). Estos estados de condensación y relajamiento son regulados por epigenética. Siendo los 3 procesos principales en la regulación de estos estados; la expresión de miRNAs, metilación del DNA y modificaciones covalentes de la cromatina (Biswas & Rao 2017; Perri *et al.* 2017).

2.7. Cambios covalentes en histonas

Los cambios covalentes en las histonas juegan un papel de importancia en la regulación epigenética. Diferentes enzimas son capaces de interactuar con las histonas y metilarlas, acetilarlas, ubiquitinarlas o fosforilarlas. El resultado de estas modificaciones pueden ser la relajación de la cromatina, promoviendo la expresión de genes o la compresión de la cromatina resultando en la represión de genes. Las modificaciones en histonas pueden

activar o silenciar genes, dependiendo de los residuos agregados en las histonas blanco, y finalmente en la modificación extendida.

La acetilación de lisinas en el extremo terminal-N de una histona puede eliminar las cargas positivas de las histonas, permitiendo al DNA cargado negativamente separarse de ellas y adquirir una configuración preparada para la transcripción. La acetilación de histonas es mediada por las enzimas histona acetil transferasa (HAT), mientras que la desacetilación esta catalizada por las histonas desacetilasas (HDAC).(Perri *et al.* 2017).

2.8. Metilación del DNA

La metilación consiste en la unión covalente de grupos metilo (-CH₃) que ocurre exclusivamente en la posición 5 de la citosina. La reacción de metilación es mediada por enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMT's) (Kulis & Esteller 2010). Las DNA metiltransferasa son un grupo de enzimas involucradas en la regulación de la expresión génica (Shehzad *et al.* 2014). La apropiada metilación del DNA es esencial para el desarrollo y funcionamiento correcto de las células, por lo que un funcionamiento anormal de este puede conducir a enfermedades como el cáncer (Kulis & Esteller 2010).

Se ha reportado en diversas manifestaciones de cáncer que las DNA metiltransferasa causan metilación aberrante de los genes supresores de tumores, volviéndolos hipermetilados y transcripcionalmente silenciados (Shehzad *et al.* 2014).

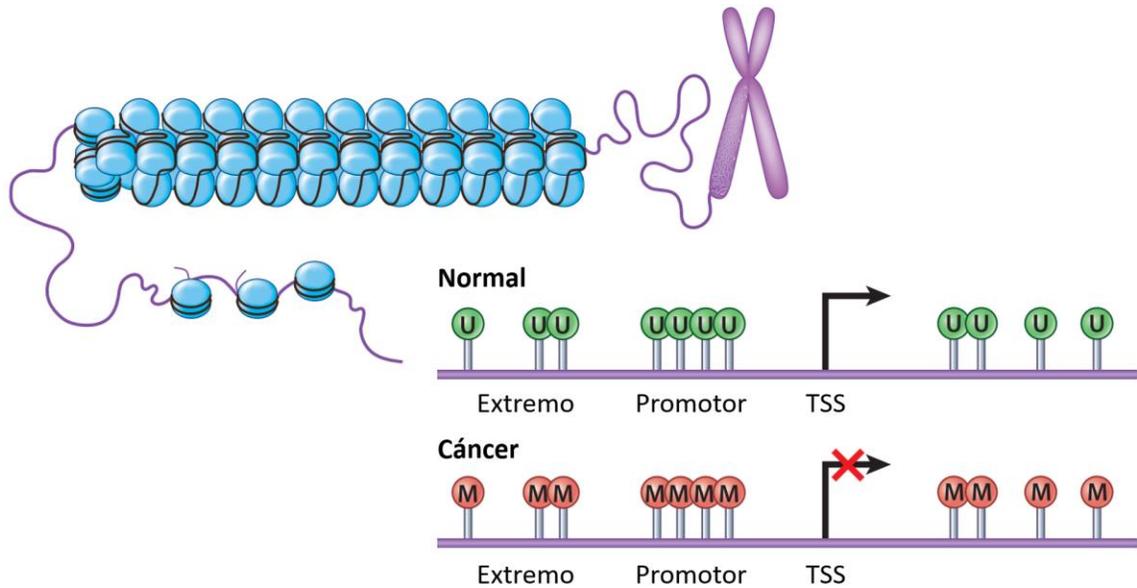


Figura 1. Cambios en la metilación del DNA en células con cáncer. Promotor con islas CpG en células normales (superior) generalmente carecen de metilación del DNA en las islas CpG (Verdes- U). En el cáncer (inferior), muchos genes presentan metilación en el DNA en las regiones de islas CpG presentes en los promotores, acompañado de un panorama de represión de la cromatina y silenciamiento génico anormal (Rojas-M). Tomado de (Ahuja *et al.* 2016).

Numerosas vías que representan características o sellos distintivos del cáncer (*Hallmarks of cancer*) frecuentemente se llegan a su inactivación de manera inapropiada debido a la metilación del DNA. Estos incluyen genes implicados en la transducción de señales (*APC*), señales de crecimiento (*RASSF1A*), la reparación del DNA (*MGMT*, *MLH1*, *BRCA1*), desintoxicación (*GSTP1*), invasión de tejidos y metástasis (*CDH1*), integridad del genoma (*CHFR*), diferenciación (*MYOD1*), angiogénesis (*THSBS1*, *VHL*), apoptosis (Caspasas, *p14*, *DAPK*) y regulación del ciclo celular (*p15*, *p16*, *RBI*) (Anderson & Tost 2017).

2.9. Gen supresor de tumores *RBI*

El gen *RBI* (Retinoblastoma 1) recibe este nombre, debido a su primera descripción la cual fue en cáncer de retina infantil. Se localiza en el cromosoma 13, en el brazo largo (13q14.2). Su gen mide 178,212 pb (Incluyendo regiones no traducidas). Constituido por 27 exones, con tamaños de 31 a 1,899 pb. En el caso de los intrones varían de 80pb hasta 60kpb. Su mRNA tiene una longitud de 4,840 pb. La proteína consta de 928 aminoácidos y presenta un peso molecular de 106, 159 Da (OMIM, 2019).

La transcripción de *RBI* se inicia desde múltiples posiciones y las secuencias cercanas a los sitios de iniciación son ricas en GC. Muchas de las características que presenta el promotor de *RBI* son similares a las asociadas con los genes *housekeeping* de expresión ubicua (Hong et al., 1989). Se cree que la función de *RBI* se puede encontrar comprometida cuando se presentan mutaciones cercanas al inicio de la región codificante en la mayoría de los cánceres esporádicos (Mittnacht, 2005). Se ha demostrado que *RBI* presenta interacción con más de 110 proteínas, incluyendo factores que se unen al DNA, así como también proteínas con múltiples funciones en la remodelación de la cromatina y componentes de la maquinaria de la ubiquitina ligasa (Anwar et al. 2014; Lamber et al. 2013; Uchida 2016).

RBI es miembro de la familia de proteínas pocket, en la cual se encuentran proteínas parálogas de *RBI*, *RBIL1/P107* y *RBIL2/P130*, que muestran similitud en la mayoría de la secuencia, incluyendo el dominio característico “pocket” (Classon & Dyson 2001). Mediante este dominio la familia RB interacciona con proteínas que contengan un motivo linear LeuXCysXGlu, encontrada en proteínas virales, incluyendo la proteína E7 del virus del papiloma humano, además proteínas celulares y la interacción con proteínas con el motivo GluXXXAspLeuPhe; este último motivo está presente en la región C-terminal de transactivación de la familia de factores de transcripción E2 (E2Fs) (Lamber et al. 2013). *RBI* contiene además dos regiones conocidas por su participación en la interacción de proteínas, el dominio N-Terminal (RB-N), el cual está relacionado en la arquitectura de RB-P y cuenta con una superficie de interacción a proteína análoga que participa en la unión de LXCXE en el dominio pocket, y el dominio C-Terminal, RB-C, que interactúa en la asociación con el dímero de superficie resultante de la asociación de E2Fs con sus proteínas compañeras de dímero (Lee et al. 2002).

La proteína pRB y los demás miembros de la familia p107 y p130 regulan la respuesta celular, por medio del control de la actividad del factor de transcripción E2F y la regulación de sus genes blancos durante el ciclo celular. En la fase G0, pRB hipofosforilado se une e inhibe el dominio de transactivación de E2F. En etapa proliferativa pRB se vuelve hiperfosforilado por lo tanto inactivado por cinasas dependientes de ciclinas (CDK), separándose y liberando a E2F, permitiendo la interacción con los genes blanco,

involucrados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Sherr & McCormick 2002). Además, la pérdida o mutación de *RBI* desencadena una desregulación de E2F y una proliferación aberrante, ayudando al desarrollo del cáncer (Chinnam & Goodrich 2011; Cobrinik2005). Una vía alterna para mediar el control del ciclo celular cuando no está presente *RBI* es mediante la vía *p53*. Se ha observado que en ausencia de estos genes supresores de tumores se afecta en gran medida el desarrollo y tratamiento del carcinoma hepatocelular (Chinnam & Goodrich 2011; Nantasantiet al. 2016).

Se ha observado que el gen *RBI* se encuentra silenciado en el HCC, por metilación en su región promotora (Pogribny & Rusyn 2014). La pérdida de la funcionalidad de *RBI* se ha relacionado con un mal pronóstico en HCC (Edamoto *et al.* 2003), por lo que el desarrollo de terapias que ayuden a restablecer su funcionalidad podría ser de gran ayuda para el tratamiento del HCC.

2.8. Fármacos epigenéticos

Debido al potencial de reversibilidad de las modificaciones epigenéticas recientemente se ha enfocado el estudio de estos cambios como blancos clave para el desarrollo de nuevas terapias y nuevos enfoques. En los últimos años se han sido identificados agentes capaces de revertir cambios epigenéticos aberrantes en las células tumorales y así restaurar el fenotipo epigenético "normal", los cuales han sido catalogados como fármacos epigenéticos (Anestopoulos *et al.* 2015).

Los fármacos epigenéticos son compuestos químicos dirigidos a: las modificaciones postraduccionales de proteínas de histonas y a enzimas encargadas de la metilación del DNA.(Toh *et al.* 2017).

Estos fármacos pueden actuar como inhibidores de las HAT, inhibidores de las HDAC, inhibidores de las histonas metiltransferasas (HMTs), inhibidores de las histonas desmetilasas (HDM) e inhibidores de las DNMTs (Qi *et al.*2016; Toh *et al.* 2017).

Se ha registrado un incremento de las DNMTs en una variedad de tipos de cáncer, afectando la expresión de distintos genes, entre ellos genes supresores de tumores. Lo que

conlleva a un silenciamiento de sus regiones promotoras, reprimiendo la expresión génica (Singh *et al.* 2016).

En el presente trabajo a partir de la búsqueda en el catálogo de medicamentos básicos del sector salud se seleccionaron 987 con potencial uso en el cultivo celular, de ellos se realizó un segundo filtro en el que se seleccionaron los fármacos isotretinoína y talidomida con base a los registros en la literatura en que se demostraba su efecto epigenético. Previamente en nuestro grupo de trabajo se evaluó la expresión de *RBI* en presencia de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida en la línea celular de cáncer hepático HepG2, presentando un aumento significativo en sus niveles de mRNA (Figura 2).

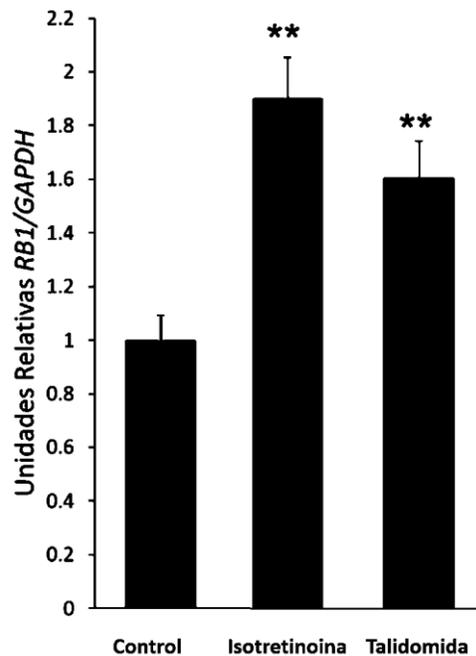


Figura 2. Expresión del gen *RBI* por efecto de fármacos epigenéticos en células HepG2. La expresión génica de *RBI* fue evaluada 48 h después de los tratamientos con Isotretinoína (10 μ M) y Talidomida (0.04 μ M) Control: células sin tratar **P < 0.05

3. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos farmacológicos usados para combatir al cáncer hepático no son del todo efectivos. Por lo que es necesario buscar nuevas estrategias que permitan, entre otras cosas, recuperar la funcionalidad de los mecanismos de control celular. El gen *RBI* que generalmente se encuentra silenciado en distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer hepático, representa un elemento clave en el control de la división celular. Una posible estrategia para inducir la expresión de genes supresores de tumores, como *RBI*, es a través del uso de moléculas remodeladoras de la cromatina, entre las que se encuentran los fármacos epigenéticos.

4. HIPÓTESIS

Los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida incrementan la actividad del promotor del gen *RB1* en las líneas celulares hepáticas HepG2 y Huh-7.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Analizar la actividad promotora del gen *RBI* humano en líneas celulares de cáncer hepático en presencia de dos fármacos moduladores de la epigenética.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad del promotor *RBI*, fusionado al gen reportero luciferasa, en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.
- Evaluar la actividad del promotor *RBI* por efecto de dos fármacos epigenéticos en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.
- Determinar los patrones de metilación en la región promotora del gen *RBI* en la línea celular HepG2 por efecto de dos fármacos epigenéticos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recuperación de las construcciones pGL4.10[Luc2] y pGL4-RBI

Los vectores plasmídicos pGL4.10[Luc2] y pGL4-RBI fueron donados por el Dr. Uchiumi de la Universidad de Ciencias de Tokio. Los plásmidos fueron resuspendidos como se describe: se colocó el papel filtro en un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL y se añadieron 200 μ L de buffer TE 1 \times . Después de 20 min, el buffer se recuperó y se procedió a realizar alícuotas para conservarlas a -20°C.

6.2. Transformación de bacterias *E. coli* DH5- α competentes con la construcción pGL4-RBI

Las construcciones fueron transformadas en bacterias *E. coli* DH5- α competentes con cloruro de rubidio siguiendo el protocolo de transformación estándar. Inicialmente se transfirieron 100 μ L de bacterias competentes a un tubo de 1.5 mL, después se agregaron 2 μ L del vector pGL4-RBI incubándola en hielo por 60 min, luego se incubó el tubo a 42 °C por 90s, después se pasó a hielo 2 min, posterior a ello se agregó 1 mL de medio LB (Luria-Bertani) e incubó a 37°C en agitación por 60 min. Después se sembraron 100 μ L de la reacción en placas con agar LB con ampicilina (50 μ g/ μ L) y se incubó por toda la noche a 37°C. Posterior a ello se seleccionaron las colonias formadas y correctamente separadas, y se realizó la extracción del DNA plasmídico.

6.3. Caracterización del vector pGL4-RBI

El DNA plasmídico se extrajo mediante el protocolo de extracción por lisis alcalina. Por cada colonia a extraer se inoculó cada una en 3 mL de medio LB con 50 μ g/ μ L de ampicilina, dejándose en incubación durante toda la noche a 37 °C en agitación constante y aireación suficiente. Posteriormente se transfirieron 1.5 mL de cultivo a un microtubo estéril. Se centrifugó a máxima velocidad por 4.5 min a 4°C. Se desechó el medio sin llevarse el sedimento, añadiendo a continuación el contenido restante del medio y volviendo a centrifugar, se desechó nuevamente el medio. Se agregaron 750 μ L de STE, se centrifugó a máxima velocidad por 30 s a 4°C. Se removió STE por aspiración, dejando la pastilla tan seca cómo sea posible. En seguida se resuspendió la pastilla en 100 μ L de solución de lisis alcalina I fría, se agitó en vórtex, asegurando que la pastilla se resuspendiera completamente. A continuación, se agregaron 200 μ L de solución de lisis

alcalina II preparada al momento; conformada por NaOH al 0.2 N, SDS al 1% y agua libre de nucleasas. Después se realizó agitación por inversión 5 veces, posteriormente a ello se incubó en hielo 5 min. En seguida se añadieron 150 mL de solución de lisis alcalina III fría, mezclando por inversión varias veces, e incubando de 3-5 min en hielo. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad por 5 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un microtubo estéril.

Para obtener una muestra con la suficiente pureza, se añadió 1 volumen igual en fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló en vórtex y se centrifugó a máxima velocidad por 2 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo; sin tomar la interfase. Posteriormente, se procedió con la precipitación del DNA agregando 2 volúmenes de etanol absoluto a TA, mezclando por inversión e incubando a TA por 2 min. Se centrifugó el tubo a máxima velocidad por 5 min a 4°C. Removiendo el sobrenadante por aspiración. En seguida se agregó 1 mL de etanol al 70%, mezclando por inversión varias veces. Se centrifugó a máxima velocidad por 2 min a 4°C, removiendo el sobrenadante por aspiración, cuidando de no tomar el pellet. Se colocó el microtubo abierto esperando por la evaporación del alcohol. Una vez eliminado el alcohol, se disolvió en 50 µL de TE 1X y se añadió 1 µL de RNasa. La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4. Caracterización de las construcciones

Se caracterizó mediante ensayos de restricción enzimática utilizando las enzimas *SmaI* y *MscI*, (New England Biolabs, Ipswich, MA. USA) en el que se procesó 3 µL del plásmido pGL4-RB1 con 0.5 µL de enzima *MscI*, 1.5 µL Buffer NEB CutSmart, 9.5 µL de agua libre de nucleasas. Dejando incubar la reacción en movimiento durante toda la noche a 37°C, posteriormente se añadieron 0.5 µL de enzima *SmaI* incubando a TA por 3 horas. Se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red.

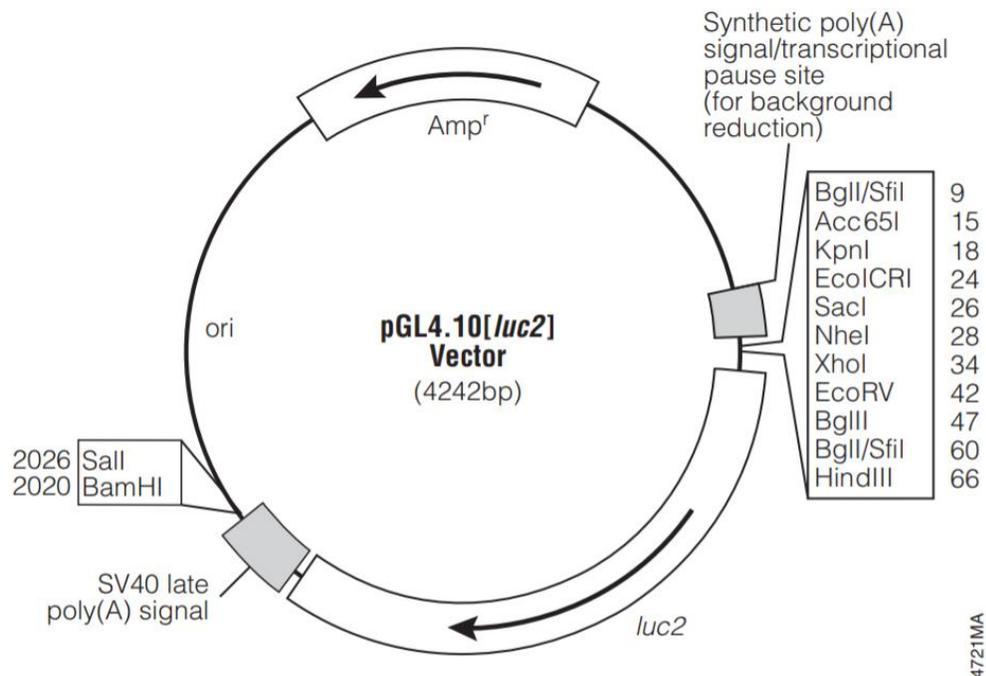


Figura 3. Vector pGL4.10 [luc2]Vector. El vector pGL4.10 codifica el gen reportero luciferasa *Luc2* (*Photinus pyralis*), diseñado para una alta expresión y una transcripción anómala reducida. Esta optimizado para codones de expresión en mamíferos. No contiene regiones promotoras.

Los vectores que presentaron el patrón correspondiente a la simulación *in silico* fueron seleccionados y purificados usando columnas de intercambio iónico.

6.5. Purificación de DNA plasmídico.

Se realizó la purificación de las construcciones de los vectores pGL4.10[Luc2] y pGL4-RB1 utilizando el kit Qiagen Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, DEU) conforme a las instrucciones del proveedor. En 3 mL de medio LB con ampicilina (50 ng/μL) se inocularon de manera independiente bacterias transformadas con los plásmidos pGL4.10[Luc2] y pGL4-RB1, incubando toda la noche en agitación constante (300 rpm) a 37°C. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio LB con ampicilina (50 ng/μL) para cada construcción, incubando en las condiciones previamente descritas. Se recolectaron las bacterias agregando cada cultivo en dos tubos de 50 mL, se centrifugaron por 15 min a 6,000 g a 4°C, desechando el sobrenadante, se agregó el volumen restante, repitiendo la centrifugación en las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante cuidando de no tomar el pellet bacteriano. Se resuspendió el pellet celular en 4 mL de Buffer P1

adicionado con RNasa y Lyse Blue mediante el uso del vortex para resuspender el pellet celular, hasta que quedara homogéneo. Posteriormente, se agregaron 4 mL de Buffer P2. Se mezcló por inversión el tubo de 4-6 veces, incubando a TA por 5 min. Se agregaron 4 mL de Buffer P3, se mezcló vigorosamente mediante inversión de 4-6 veces, se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó a 7,000 g por 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar los restos celulares y proteicos, se pasó el sobrenadante a tubos de 15 mL. Se centrifugaron los tubos de 15 mL por 30 min a 7,000 g a 4°C. Se colocó la columna en un tubo de 50 mL y se agregaron 4 mL de Buffer QBT, y dejando que se vaciara la columna por gravedad. Se agregó el sobrenadante de los dos tubos de 15 mL, con cuidado de no tomar restos celulares. Permitiendo que pasara por la columna por gravedad. Se lavó la columna con 20 mL de Buffer QC, primero agregando 10 mL permitiendo que fluyera, y posteriormente agregando el volumen restante. Se cambió la columna a un tubo nuevo de 15 mL. Se eluyó el DNA con 5 mL de Buffer QF.

Después, se realizó el paso de precipitación, en el cual al tubo con la elución del DNA se le agregaron 3.5 mL de isopropanol a TA, mezclando hasta homogenizar, se centrifugó a 4°C por 30 min a 15,000 rpm. En seguida se decantó el sobrenadante cuidando de no tomar la pastilla. Se agregó 1 mL de etanol al 70% para el lavado de la pastilla de DNA, se centrifugó a 4°C por 15 min a 15,000 g, a continuación, se realizó el decantado del sobrenadante cuidando de no tomar la pastilla, se dejó secar a TA, posteriormente se resuspendió en 200 µL de agua destilada libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.6. Cultivo celular

Se seleccionó la línea celular hepática HepG2 (ATTC, HB-8065) (Rockville, MA. USA), derivada de cáncer hepático humano como modelo para la evaluación de la actividad promotora del gen supresor de tumores *RBI*. La línea celular tiene la expresión normal y nativa de *p53*, es positiva para la expresión del supresor de tumores *RBI*, tiene mutada al oncogen *Ras* y es negativa para el virus de la hepatitis B. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales. Las células fueron cultivadas en una

incubadora a 37 °C con atmósfera húmeda, 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se cultivaron en botellas de 75 cm² y el pasaje se realizó de 2-3 veces por semana. Para los ensayos con fármacos se utilizaron cajas de 6 pozos y se sembraron aprox. 2×10⁵ células por pozo el día previo a la transfección celular, una línea celular de carcinoma hepatocelular.

La línea celular HuH-7 es una línea celular inmortal de células tumorigénicas de tipo epitelial. Aislada a partir de un tumor hepático en un hombre japonés de 57 años en 1982. Las cuáles fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 1 mM de piruvato de sodio. Las células fueron cultivadas en una incubadora a 37 °C con atmósfera húmeda, 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se cultivaron en botellas de 75 cm² y el pasaje se realizó de 2-3 veces por semana. Para los ensayos con fármacos se utilizaron cajas de 6 pozos y se sembraron aprox. 2×10⁵ células por pozo el día previo a la transfección celular.

6.7. Selección y determinación de la concentración del fármaco.

Se utilizó el Diccionario de Especialidades Farmacéuticas y la base de datos del catálogo de medicamentos del IMSS para realizar una búsqueda sistemática de aquellos medicamentos que tengan una presentación que permita solubilizarlos en el medio de cultivo. Se excluyeron aquellos medicamentos que en su presentación sean ungüentos, fórmulas alimenticias, anticuerpos, etc. Se seleccionaron aquellos de los que se tengan reportes o indicios de tener actividad en los mecanismos epigénéticos ya sea de manera directa o indirecta. Posteriormente se realizó una búsqueda en la literatura acerca de las concentraciones utilizadas previamente en cultivos celulares de los medicamentos.

6.8. Tratamientos farmacológicos.

Para los ensayos de actividad luciferasa; 5 h después de la transfección se realizó el cambio de medio de cultivo DMEM con 0.1% de DMSO para los ensayos control, todos los tratamientos fueron resuspendidos en medio DMEM con DMSO 0.1%. En la línea HepG2 se evaluó el efecto de los fármacos isotretinoína 10 µM, talidomida 0.04 µM y 5-aza-2' desoxicitidina incubando a 37°C, 0.5% de CO₂ por 24 y 48 h. También se evaluó el fármaco isotretinoína a las concentraciones de 5, 10 y 20 µM por 24 h. En la línea Huh-7 se evaluó el efecto de los fármacos isotretinoína 10 µM, talidomida 0.04 µM y 5-aza-2' desoxicitidina. Se incubó a 37°C, 0.5% de CO₂ por 24 h.

Para los ensayos de secuenciación por bisulfito (BSP); Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEM con 0.01% DMSO como control todos los tratamientos fueron resuspendidos en medio DMEM con DMSO 0.1%. En la línea HepG2 se evaluó el efecto del fármaco isotretinoína 10 μ M por 24 h, y como control de agente desmetilante 5-aza-2' desoxicitidina 1 μ M por 48 h, se incubó a 37°C, 0.5% de CO₂. Las condiciones de los tratamientos fueron determinados con base a los resultados más significativos del ensayo luciferasa.

6.9. Transfección celular

Las construcciones plasmídicas fueron transfectadas en células HepG2 y Huh-7 en cajas de 6 pozos usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se usó la construcción pGL4-RB1 junto con el vector phRL-CMV (que contiene al gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* incluido para normalizar la eficiencia de transfección) en un microtubo con medio Optimem (Invitrogen). En un tubo separado se colocó el reactivo Lipofectamine 2000 previamente diluido en medio Optimem y se mezcló con el microtubo que contenía los plásmidos. Después de 30 min de incubación a TA, los complejos DNA-Lipofectamine fueron adicionados a 2×10^5 células. Los vectores pGL4.10 [luc2] vector y pGL3 Control Vector fueron transfectados en paralelo como controles negativo y positivo, respectivamente. Después de 5 h de incubación, el medio fue reemplazado con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, y con los fármacos isotretinoína y talidomida. Luego de 24 a 48 h de transfección las células fueron lavadas con solución salina al 1 \times (PBS) y homogenizadas en una solución de lisis al 1 \times (Passive Lysis Buffer, Promega) por 15 min en una plataforma oscilatoria. La actividad del gen reportero luciferasa fue evaluada por medio del sistema de luciferasa dual (Dual Luciferase Assay System, Promega) y el luminómetro Glomax 96 (Promega). La actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* fue normalizada con la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis*. Se usó el vehículo de los fármacos como control.

6.10. Extracción de DNAg

Se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA) las células fueron sembradas a una confluencia de 2×10^5 con su respectivo tratamiento. Se retiró el medio de la placa y se lavó con 1 mL de PBS 1X, se añadieron 2 mL de PBS y 0.5 μ L de tripsina se incubó a 37°C por 5 min, posteriormente se inactivó la tripsina y se lavó la placa. Se pasó el volumen completo de células a un tubo falcón y se centrifugó a 3500 rpm por 5 min a TA. Se retiró el medio tratando de conservar el pellet celular, se agregó 1 mL de medio nuevo y se resuspendió el pellet celular, se pasó a tubo de 1.5 mL y se centrifugó por 10 s para formar nuevamente un pellet, se removió el sobrenadante dejando un volumen residual de 30 μ L aproximadamente, se agregaron 200 μ L de PBS 1X y se centrifugó a 16,000 g por 10 s, se retiró el PBS 1X dejando 30 μ L, y se resuspendió las células en el líquido restante por medio de agitación en vortex. Se añadieron 600 μ L de *Nulcei Lysis solution* y se pipeteó hasta no ver cúmulos de células. Se añadieron 3 μ L de *RNAse Solution* al lisado y se mezcló por inversión durante 5 min, se incubó por 25 min a 37°C, posteriormente se dejó enfriar a TA. Se agregaron 200 μ L de protein precipitation solution y se realizó vortex por 20 s a alta velocidad. Se dejó reposar en hielo por 5 min, se centrifugó por 4 min a 16,000 g a TA, formando un pellet blanco. Se removió el sobrenadante sin tocar el pellet y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL con 600 μ L de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta observar hebras blancas de DNA, se centrifugó por 1 min a 16,000 g a TA, el DNA formó un pellet blanco, y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 600 μ L de etanol al 70% a TA se mezcló por inversión para lavar, se centrifugó por 1 min a 16,000 g a TA. Se aspiró el etanol buscando tomar la mayor cantidad de volumen sin tocar el pellet, se invirtió el tubo y se dejó reposando hasta secar en papel absorbente (aproximadamente 15 min). Se agregaron 100 μ L de *DNA Rehydration solution* y se incubó toda la noche a -4°C. Posteriormente se cuantificó, visualizó en un gel de agarosa y se almacenó -4°C.

6.11. Conversión del DNA por tratamiento con bisulfito

Se extrajo el DNAg y se realizó el tratamiento de bisulfito conforme a las especificaciones del kit comercial InnuCONVERT Bisulfite All-in-one Kit (Analytik Jenna, Jena, DE-TH) a partir de las líneas celulares HepG2 y Huh-7. Se formó el pellet de células centrifugando a 3,000g x 5 min a TA y desechando el sobrenadante. Se añadieron 190 μ L de Lysis

Solution BC y 15 μ L de Proteinasa K a la muestra. Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente para eliminar gotas. Se incubó a 60°C por 3 h en termomixer a 800 rpm. Posteriormente, se preparó la reacción de bisulfito: 50 μ L de lisado, mas 70 μ L Conversion Reagent, mas 30 μ L de Conversion Buffer. Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente para eliminar gotas. Se incubó reacción a 85°C x 45 min a 800rpm. Se añadieron 700 μ L de Binding Solution GS a la muestra y se mezcló en vortex, hasta que la muestra quedara homogénea. Se colocó el Spin Filter (SF) en el Receiver Tube (RT) y se transfirió la muestra. Se cerró el tubo y se centrifugó a 14,000g x 1 min. Se descarto el RT con el filtrado y se colocó el SF en un RT nuevo. Se abrió el SF y se añadieron 200 μ L de Washing Solution BS, se cerró e incubó a TA por 10 min. Se centrifugó a 14,000g por 1 min. Se descarto el RT con filtrado y colocó un nuevo SF en nuevo RT. Se agregaron al SF 500 μ L de Washing Solution C, se cerró el tubo y se centrifugó a 14,000g por 1 min. Se descartó el RT con filtrado y se colocó un SF en un RT nuevo. Se abrió el SF y se agregaron 650 μ l de Washing Solution BS, se cerró y se centrifugó a 14,000g por 1 min. Se descartó el RT con filtrado y se colocó un SF en u RT nuevo. Se abrió el SF y se añadieron 650 μ L de etanol absoluto, se cerró y se centrifugó a 14,000g por 1 min. Se descartó el RT con filtrado y colocó un RT nuevo. Repetir el lavado de etanol. Se colocó el SF en un Elution Tube (ET) de 1.5 mL, evitando arrastrar algún residuo de etanol. Se abrió la tapa de SF y se incubó a 60°C por 10 min. Se añadieron 25 μ L de Elution Buffer a SF. Se incubó a TA por 1 min. Se centrifugó a 8,000g por 1 min dos veces y se almacenó a -80°C.

6.12. PCR a partir del DNA genómico tratado con bisulfito

Se diseñaron primers específicos para la región promotora del gen *RBI*, siguiendo las especificaciones de guías (K. Patterson *et al.* 2011). Adicionalmente se utilizó el programa Methyl Primer Express Software V1.0 (Applied Biosystems) para la comprobación del reconocimiento de la secuencia. La temperatura designada para la TM de los cebadores en el programa de PCR fue establecida por lo cálculos del programa Methyl Primer Express Software, el resultado fue observado en geles de electroforesis, considerando la amplificación de una sola banda como una amplificación exitosa.

Tabla 1. Cebadores para la región blanco del ensayo BSP

Nombre del cebador	Secuencia	TM
Fwd RB1MPE	GGT TTT TTA GTT TAA TTT TTT ATG A	55.19
Rvs RB1 MPE	TCC TAC TCT AAA TCC TCC TC	54.05

Tabla 2. Cálculos para la amplificación por PCR del promotor *RBI* para BSP

	Inicial	Final	Reacción
Buffer	10 x	1 x	2.5 μ L
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5 μ L
Primer Forward	100 ng/ μ L	5 ng/ μ L	1 μ L
Primer Reverse	100 ng/ μ L	5 ng/ μ L	1 μ L
DNA Taq polimerasa	5U/ μ L	0.25 U/ μ L	0.125 μ L
H ₂ O NF	--	--	13.875 μ L
DNA	--	--	1 μ L
Total			20 μ L

Tabla 3. Programa para la amplificación del promotor *RBI* para BSP

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	1 min	
95°C	1min	38 Ciclos
54°C	1 min	
72°C	10 min	
72°C	∞	

6.13. Clonación de los fragmentos amplificados

Se utilizó el vector PCR 2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma. USA) en el cual se ligaron los productos de PCR, posteriormente se transformó en bacterias *E. coli*. Se realizó una PCR Colony a partir de las colonias que crecieron, considerando una integración exitosa del fragmento del promotor *RBI* aquellas que presentaran la

amplificación cercana a las 420 pb. Se tomaron en cuenta como mínimo 5 colonias que presentaran la amplificación del fragmento, provenientes de cada tratamiento.

Se realizó extracción plasmídica de aquellas colonias que presentaron la integración exitosa. Se utilizó el kit QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Hilden, DEU). Cada colonia se inoculó en 3 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/µL) incubando toda la noche a 37°C, en agitación constante. El cultivo de cada colonia se agregó a un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL, centrifugando a 13900 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante, repitiendo este procedimiento hasta agotar el volumen.

Posteriormente, se resuspendió la pastilla bacteriana en 250µL de Buffer P1, después se agregaron 250 µL de Buffer P2 mezclando por inversión de 4-6, se añadieron 350 µL de Buffer N3 y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13900 rpm por 10 min. Después se agregó el sobrenadante en la columna Qiagen, se centrifugó a 13900 rpm durante 1 min. Luego se lavó la columna utilizando 500 µL de Buffer PB, se centrifugó a 13900 rpm por 1 min se lavó la columna con 750 µL de Buffer PE centrifugando a 13900 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y se centrifugó otro min. Para la elución del DNA se transfirió la columna a un microtubo de centrifugación nuevo y se añadieron a la columna 50 µL de Buffer EB, se dejó incubar por 1 min a TA, después se centrifugó a 13900 rpm por 1 min. Se almacenó el volumen obtenido a -20°C.

6.14. Secuenciación

Los productos obtenidos a partir de la extracción de DNA plasmídico fueron procesados utilizando el kit BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing. A continuación, se describe la reacción de secuenciación. Los primers utilizados fueron los mismos que los empleados en la amplificación del DNA genómico.

Tabla 4. Mezcla para la reacción de marcaje

	Volumen 1 Reacción
Buffer de secuenciación 5X	4 µL
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4 µL
Primer	1 µL
DNA	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	10 µL

Tabla 5. Programa para la reacción de marcaje

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	30 s	25 Ciclos
50°C	15s	
60°C	4 min	
18°C	∞	

Después se realizó una precipitación etanólica para eliminar compuestos que pudieran interferir posteriormente en la lectura de la secuencia; en el microtubo de centrifugación en el que fue realizada la reacción de secuenciación se agregaron 2 µL de EDTA a 125mM, 2 µL de acetato de sodio 3 M y 50 µL de etanol 100% en el orden mencionado. En seguida, se agitó en vortex por 30 s, se dejó incubando por 15 min a TA, después se centrifugó a 2500g por 30 min a 4°C, se retiró el sobrenadante cuidando de no tocar la pastilla de DNA, en seguida se agregaron 70 µL de etanol a 70%, dando ligeros golpes al microtubo. Se centrifugó a 2500 g por 15 min a 4°C. Se removió el sobrenadante mediante aspiración dejando la menor cantidad de etanol posible, cuidando de no tocar la pastilla. Se dejó secar el microtubo a temperatura con la tapa abierta durante 15 min o hasta que se dejaron de observar restos de etanol, se guardó a 4°C hasta su lectura.

Una vez realizada la precipitación se resuspendió la muestra en 10 µL de formamida, después se realizó una incubación de desnaturalización a 95°C por 2 min, luego una incubación en hielo por 5 min. Una vez preparada la muestra se cargó en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA).

6.15. Análisis estadísticos

Para determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos en el ensayo de actividad luciferasa, se llevó a cabo un análisis usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney utilizando el paquete estadístico SPSS (IBM, Armonk, NY. USA).

Para determinar la significancia estadística de la secuenciación por bisulfito se llevaron a cabo dos pruebas utilizando la plataforma QUMA: *quantification tool for methylation analysis*. (Center of Development Biology- RIKEN, Chuo-ku, Kobe, JP). Para la comparación del conjunto de islas CpG en las secuencias de interés contra el tratamiento control se realizó la prueba de Mann-Whitney. Para el análisis de cada sitio CpG se evaluó usando la prueba exacta de Fisher. Se consideró un valor de significancia de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de las construcciones pGL10 [Luc2] y pGL4-RB1

Se realizó la caracterización de los vectores pGL4.10 [Luc2] y pGL4-RB1, conteniendo al promotor de *RBI*, mediante enzimas de restricción. El vector pGL4.10[Luc 2] presentó el patrón de tres bandas esperado con tamaños de 1.892 pb, 1825 pb y 525 pb, mientras que la construcción pGL4-RB1 presentó el patrón de cuatro bandas con tamaños de 1825 pb, 1,150 pb, 1,034 pb y 525 pb (Figura 4). Las bandas obtenidos coincidieron con los patrones de los vectores analizados *in silico*.

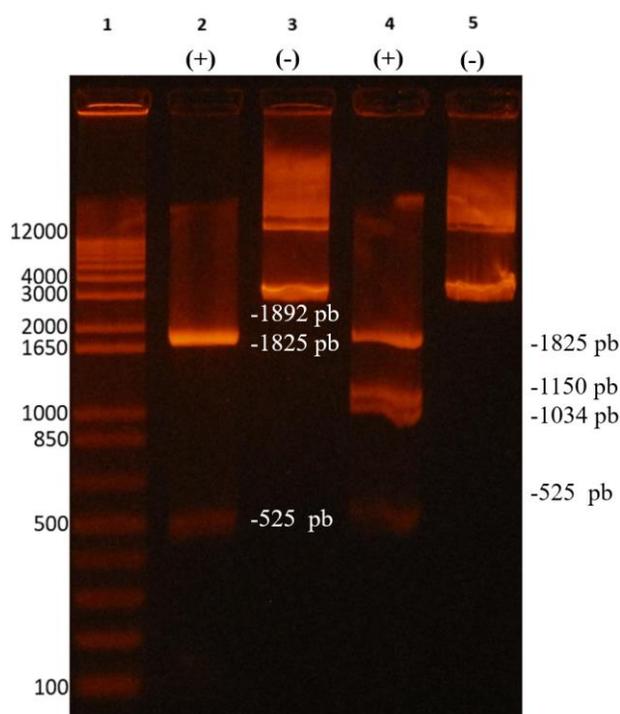


Figura 4. Caracterización de los vectores pGL4.10 [Luc 2] y pGL4-RB1 por enzimas de restricción. Gel de agarosa al 1%, teñido con gel red. 1, Marcador de peso molecular (1 Kb plus, Invitrogen). 2 y 3, Caracterización del vector pGL4.10 [Luc2]. 4 y 5, Caracterización del vector pGL4-RB1. (+) vectores con enzimas de restricción *MscI* y *SmaI*. (-) controles sin enzimas de restricción.

7.2. Secuenciación del vector pGL4-RB1

Para comprobar la identidad de la secuencia del promotor *RBI* en el vector pGL4-RB1 se realizó un ensayo de secuenciación utilizando el primer universal RV3. No se observaron

diferencias en la secuencia nucleotídica con respecto a la secuencia de referencia (Figura 5). De este modo se corroboró la óptima integridad de la secuencia promotora.

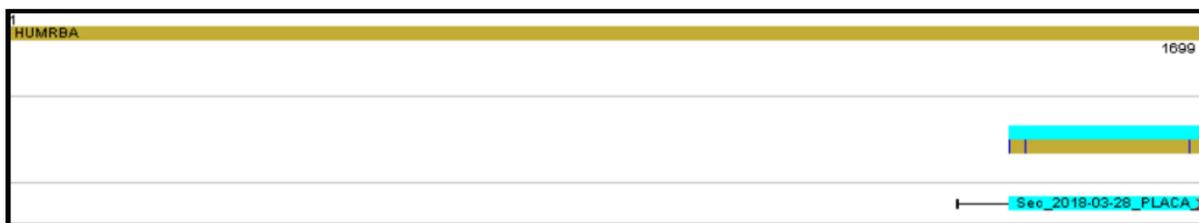


Figura 5. Análisis de la secuencia del vector pGL4-RB.1 Alineamiento de la secuencia de referencia (amarillo) y la secuencia del fragmento del promotor *RB1* (azul) en el vector pGL4-RB1, secuencia de referencia (*Gene Bank, NG_009009.1*).

7.3. Actividad promotora del gen *RB1* en la línea celular HepG2

La actividad promotora de *RB1* se evaluó mediante transfección transitoria en la línea celular HepG2 utilizando lípidos policationicos. Se realizó la co-transfección de los vectores pGL4.10[Luc2], pGL4-RB1 y pGL3 Control vector con el vector phRL-CMV, éste último para normalizar la eficiencia de transfección. Posterior a las 24 h de la transfección se realizó el lisado de las células para luego medir la actividad luciferasa.

Las células transfectadas con el vector pGL4.10 [Luc2] (Control negativo) fueron establecidas arbitrariamente con valor de 1. Con base en lo anterior, la actividad luciferasa mostrada por las células transfectadas con el vector pGL3 Control Vector (Control positivo) tuvo un valor de 154 URL, y las células transfectadas con el vector pGL4-RB1 presentaron un valor de 429 URL (Figura 6). Con estos datos se pudo comprobar la correcta funcionalización del sistema de transfección en la línea celular HepG2.

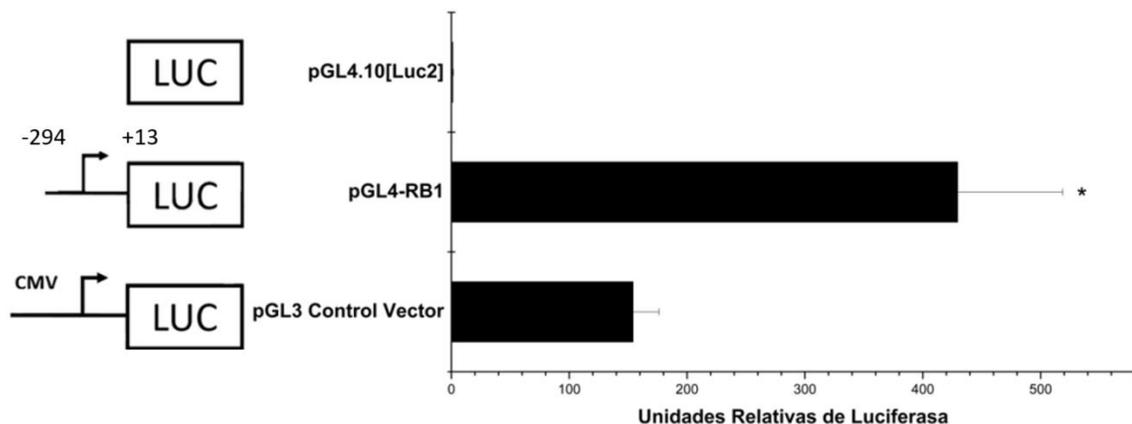


Figura 6. Actividad luciferasa del promotor *RB1* en la línea celular HepG2. La actividad de la luciferasa se midió 24 h después de la transfección. Se designaron valores arbitrarios como unidades relativas de luciferasa (URL) en relación con la actividad luciferasa presentada por pGL4.10 [Luc2] (Valor de 1).

Subsecuentemente se transfectaron las células con el plásmido pGL4-RB1, una vez transfectadas se expusieron durante 24 h en presencia de los fármacos moduladores de la epigenética isotretinoína y talidomida. Posterior al tiempo establecido de exposición se lisaron las células y se llevó a cabo el ensayo de actividad luciferasa. Se estableció como unidad arbitraria las lecturas de las células expuestas a DMSO (vehículo), otorgándoles el valor de 1. Se utilizó el fármaco 5-Aza-2'-Desoxicitidina como agente desmetilante control, obteniendo 0.987 URL. Se observó un incremento de 13.55% en la actividad luciferasa del promotor *RB1* en presencia del fármaco isotretinoína, y no hubo diferencia significativa en presencia del fármaco talidomida (**Figura 7**). Estos resultados sugieren un efecto positivo en la actividad del promotor *RB1* en presencia el fármaco isotretinoína, a las 24 h a la concentración de 10 μ M en la línea celular HepG2.

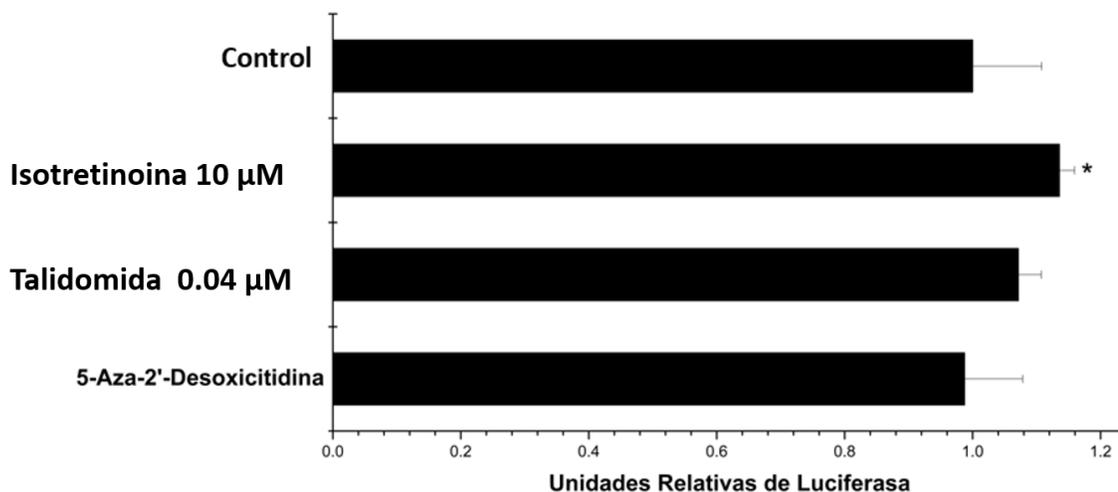


Figura 7. Actividad luciferasa del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 en presencia de fármacos epigenéticos a las 24 h. El fármaco 5-Aza-2'-desoxicitidina se consideró como agente desmetilante. Los valores arbitrarios se designaron como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por el control (DMSO). * P <0.05

Se expusieron células transfectadas con el vector pGL4-RB1 a dos rangos distintos de tiempo del control de desmetilación, designando tiempos de 24 y 48 h, observando un incremento de 50.7% en las células tratadas durante 48 h, con respecto a las células tratadas con DMSO (Figura 8). Las lecturas de luciferasa de este ensayo nos muestra un incremento en la actividad del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 cuando se extiende el tratamiento del fármaco 5-Aza-2'-Desoxicitidina a 48 h.

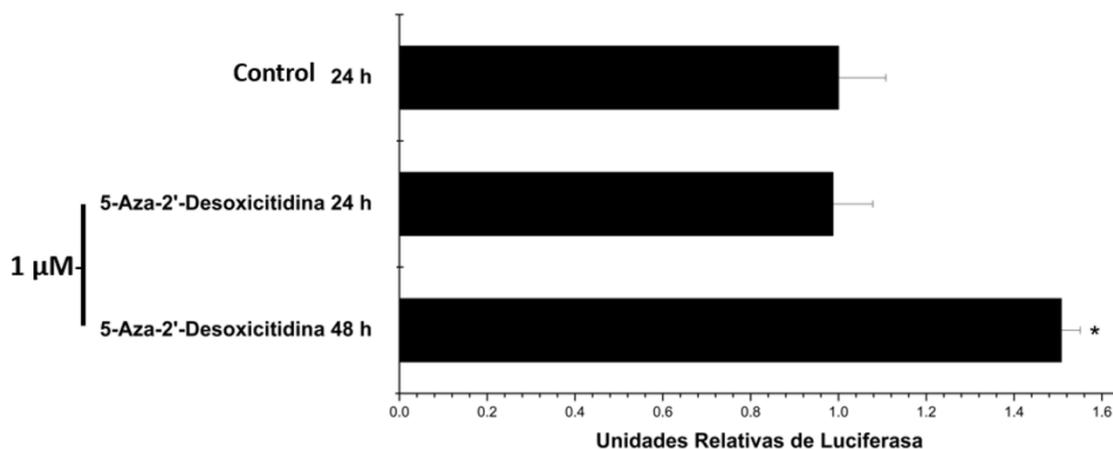


Figura 8. Actividad luciferasa del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 en presencia de 5-Aza-2'-desoxicitidina a 24h y 48h. Las unidades arbitrarias se designaron como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por el control (DMSO). * P <0.05

En un ensayo posterior se analizó la actividad del promotor *RB1* en presencia de los fármacos isotretinoína y talidomida durante 48 h. Se observó una disminución en la actividad del promotor *RB1* en presencia del fármaco isotretinoína del 39%, no hubo diferencia significativa en presencia del fármaco talidomida, con respecto a las células tratadas con DMSO (Figura 9). En conclusión, el fármaco isotretinoína a la concentración de 10 μM reprimió la actividad del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 a las 48 h, contrario a lo observado a las 24 h.

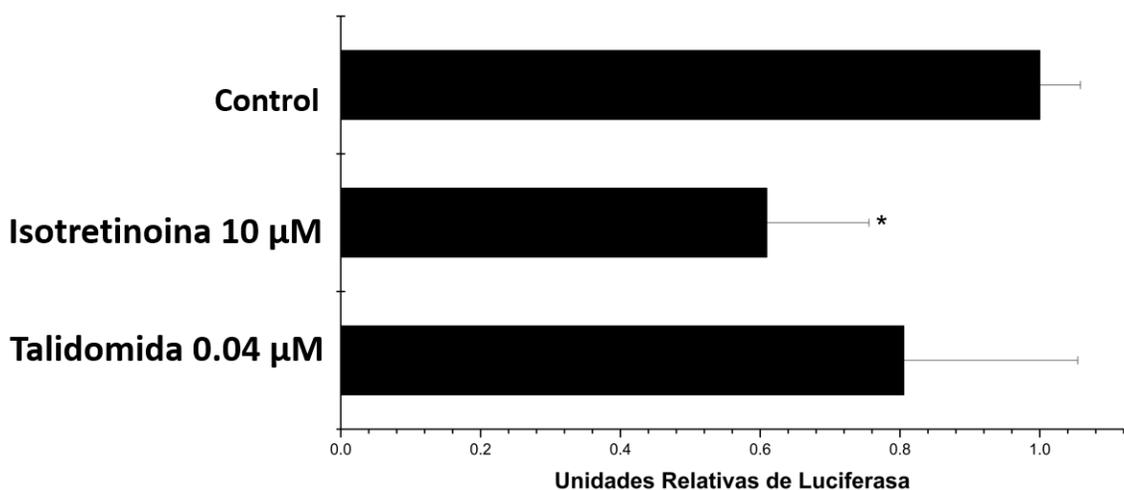


Figura 9. Actividad luciferasa del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 en presencia de fármacos epigenéticos a las 48 h. El fármaco 5-Aza-2'-desoxicitidina se consideró como agente desmetilante. Los valores arbitrarios se designaron como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por el control (DMSO). * $P < 0.05$

Se probó con el cultivo de las células transfectadas con el vector pGL4-RB1 a diferentes concentraciones del fármaco isotretinoína, seleccionando una dosis inferior y una superior a la dosis evaluada en los ensayos anteriores (5 μM , 10 μM , 20 μM). Se observó un incremento del 25% en la actividad promotora en presencia del fármaco isotretinoína a la concentración 5 μM , no hubo diferencia significativa en presencia de las otras dosis con respecto a las células tratadas con DMSO (Figura 10). Estos resultados nos sugieren que posiblemente el fármaco isotretinoína presente un efecto positivo en la actividad del promotor *RB1* en la línea celular HepG2 a concentraciones menores.

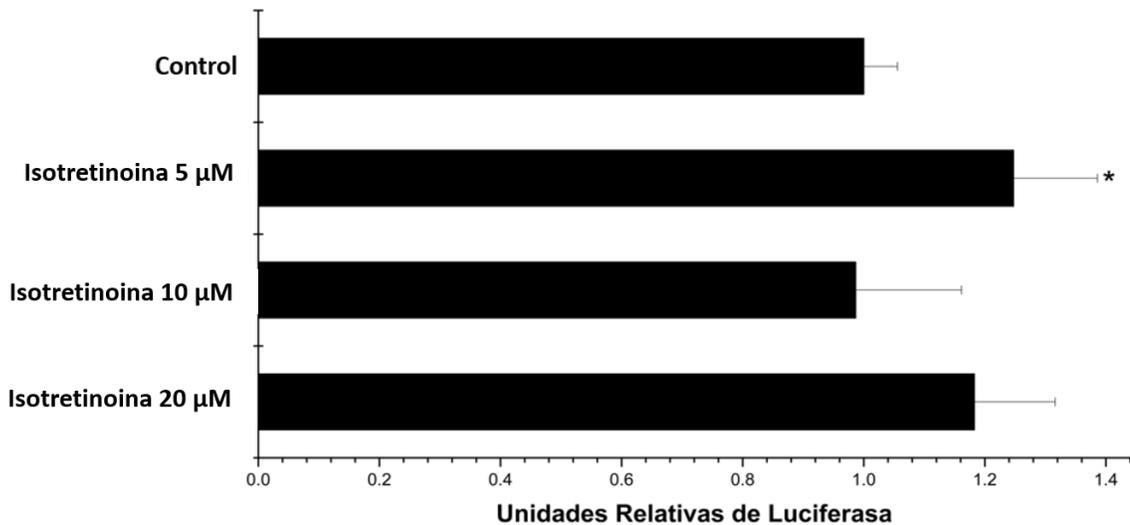


Figura 10. Actividad luciferasa del promotor *RBI* en la línea celular HepG2 en presencia del fármaco isotretinoína a diferentes concentraciones. Las unidades arbitrarias se designaron como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por el control (DMSO). * P < 0.05

7.4. Actividad promotora del gen *RBI* en la línea celular Huh-7

Se transfectaron células con el vector pGL4.10 [Luc2] (Control negativo) que fueron establecidas arbitrariamente con valor de 1. Con base en lo anterior, la actividad luciferasa mostrada por las células transfectadas con el vector pGL3 Control Vector (Control positivo) tuvo un valor de 1,380 URL, y las células transfectadas con el vector pGL4-RB1 presentaron un valor de 252 (Figura 11). Estas lecturas comprueban la correcta funcionalización del sistema de transfección en la línea celular Huh-7.

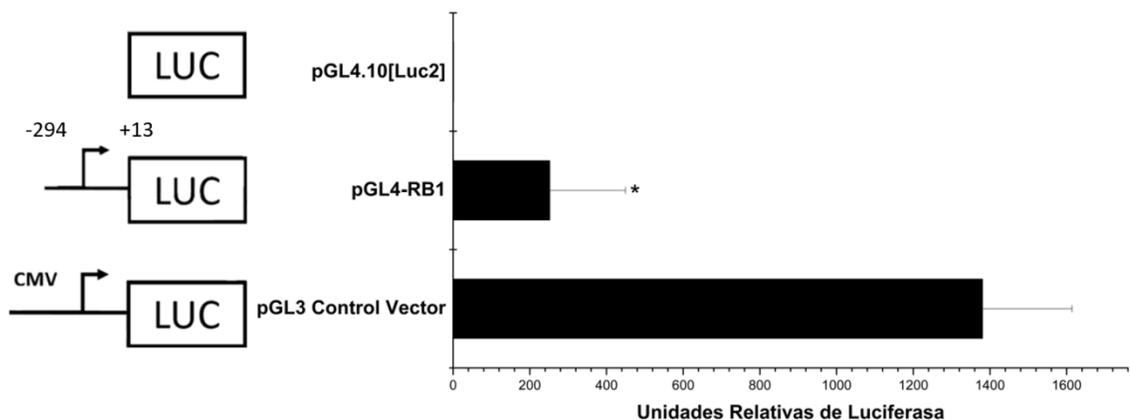


Figura 11. Actividad luciferasa del promotor *RBI* en la línea celular Huh-7. La actividad de la luciferasa se midió 24 h después de la transfección. Se designaron valores arbitrarios

como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por pGL4.10 [Luc2] (Valor de 1).

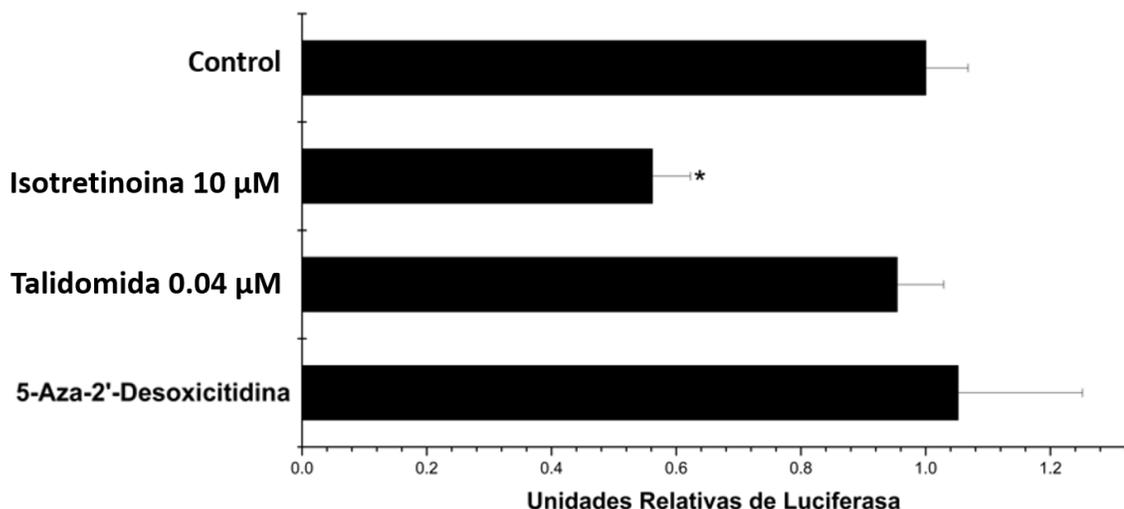


Figura 12. Actividad luciferasa del promotor *RB1* en la línea celular Huh-7 en presencia de fármacos epigenéticos a las 24 h. El fármaco 5-Aza-2'-desoxicitidina se consideró como agente desmetilante. Los valores arbitrarios se designaron como URL en relación con la actividad luciferasa presentada por el control (DMSO). * P <0.05

Posteriormente se analizó células Huh-7 transfectadas con el vector pGL4-RB1, utilizando como unidad arbitraria la lectura de las células transfectadas en presencia del vehículo, asignando el valor de 1, se registró una disminución de la actividad luciferasa en las células transfectadas en presencia del fármaco isotretinoína, presentando una disminución del 44%, no se presentó diferencia significativa en las células transfectadas en presencia del fármaco talidomida (Figura 12). Como conclusión el fármaco isotretinoína reprime la actividad del promotor RB1 a la concentración de 10 µM a las 24 h en la línea celular Huh-7, contrario a lo observado en las mismas condiciones en la línea HepG2.

7.5. Análisis de metilación de islas CpG en el promotor *RB1* en presencia de fármacos epigenéticos en la línea celular HepG2

Se analizó los patrones de metilación que presentaba el promotor *RB1* en la línea celular HepG2 cultivadas con: 5-aza-2'desoxicitidina a 1 µM por 48 h; isotretinoína a 5 µM por 24 h; como control DMSO 1% por 48 h. Los alelos de cada grupo fueron denominados numéricamente (Figura 13).

Se presentó un mayor número de sitios metilados en el control (5/305), presentando el alelo 1 y 2 la adición de grupos metilo; alelo 1: metilación en la isla CpG 48 (+96), en alelo 2 en las islas 2,3,40 y44 (-135, -133, +94, +125) obteniendo un valor de 1.6% de metilación. En los alelos del tratamiento con 5-aza-2´desoxicitidina se observó metilación: en el alelo 1 en la isla 42 (+112); en el alelo 3 en las islas 16 y 42 (-61, +112) localizándose la isla 16 en un sitio traslapado de unión de los factores de transcripción de p53 y SP1, obteniendo una relación de metilación de 1.2% (3/244). Ni la isla 16, ni la 42 fueron significativas (P=0.444 y P=0.1667, respectivamente). No se presentó diferencia significativa en el análisis de todas las secuencias de 5-Aza-2´Desoxicitidina contra las secuencias de DMSO (P= 0.8095).

En los alelos con los tratamientos de isotretinoína no se observó la presencia de islas CpG, presentando un 0% de metilación (0/305). No se presentó diferencia significativa en la presencia de metilación en ninguna isla CpG en comparación con el control (P=1.0). Tampoco se observó diferencia significativa analizando la totalidad de metilación del grupo de isotretinoína con el grupo control (P=0.444).

Durante el análisis de secuenciación se observaron mutaciones que se repetían en diferentes alelos. Se observó la sustitución G>A en la posición -16 y +187 (Alelos: DMSO 05, 5-Aza-2´Desoxicitidina 03; isotretinoína 03). También se observaron cambios A>G en la posición +14 (Alelos: DMSO 03, 5-aza-2´desoxicitidina 04 y 05 e isotretinoína 01,02,04,05); también en la posición +148 (Alelos; 5-aza-2´desoxictidina: 02,04 y 05; isotretinoína: 01,02 y 05).

Como conclusión los resultados del análisis de BSP sugiere la ausencia de metilación en la región designada del promotor *RBI* en la línea celular HepG2, al no observarse una conservación en las citosinas metiladas en las diferentes secuencias o la presencia de metilación en islas CpG continuas en una misma secuencia.

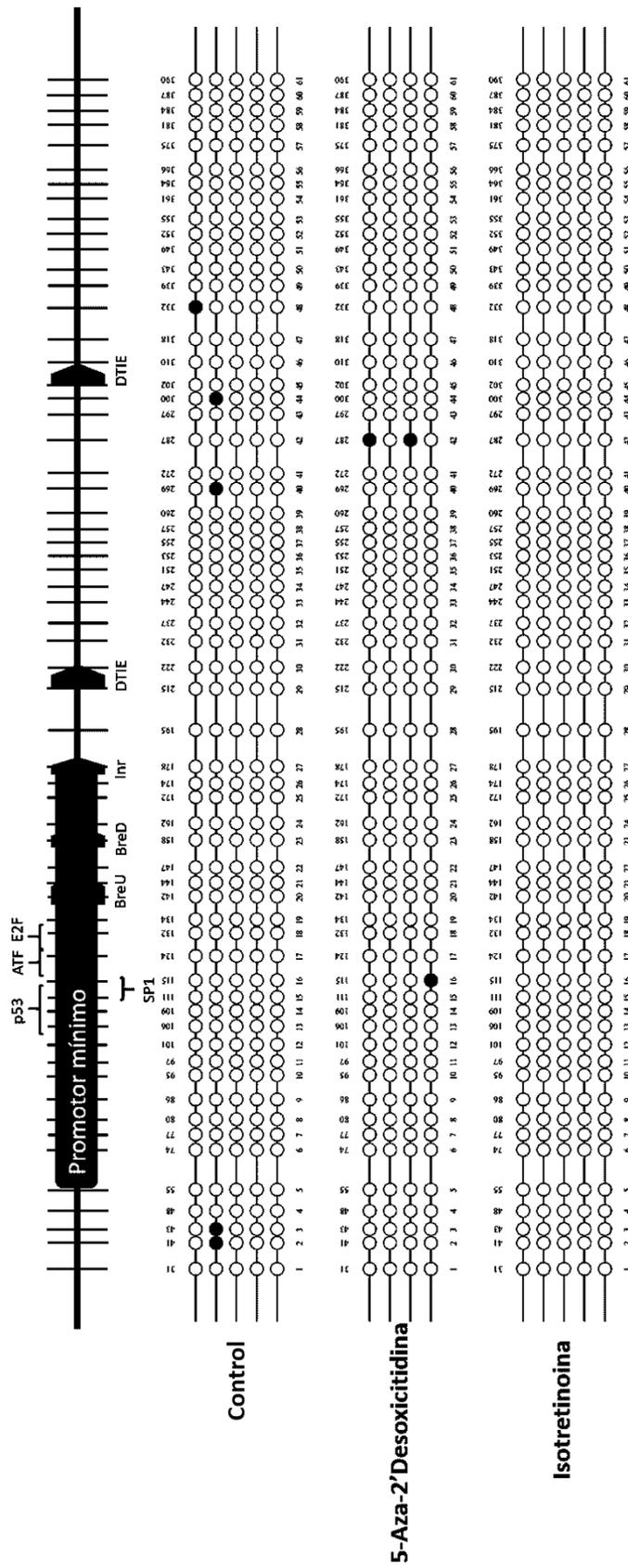


Figura 13 .- Análisis de metilación del promotor *RB1* en presencia de fármacos epigenéticos en la línea celular HepG2.- Representación de análisis de metilación de sitios CpG en el promotor *RB1* (-175 / +245) por secuenciación por bisulfito en la línea celular HepG2 en presencia de los fármacos epigenéticos 5-Aza-2' Desoxicitidina (1 μ M por 48 h) e isotretinoína (5 μ M por 24 h). Control =DMSO (1% por 48 h). Cada línea representa un alelo individual (molécula de DNA). El amplicón contiene 420pb, en el que se sitúan 61 islas CpG. Los círculos rellenos indican los sitios CpG metilados, los círculos abiertos los sitios CpG no metilados.

8. DISCUSIÓN

El gen *RBI* tiene diversas funciones celulares tales como regulador de diversas rutas metabólicas, ordenamiento de la cromatina, respiración mitocondrial y regulador del ciclo celular (Dyson 2016; Journals 2015). Debido a que juega un papel fundamental regulando el pase de la fase S a la G1 en ciclo celular, se ha observado que este proceso se realiza mediante la inhibición del promotor de la transcripción *E2F* al cual se une la proteína *RBI* en su forma hipofosforilada. Por esta razón es posible observar la senescencia celular (Chinnam & Goodrich 2011; Sathe *et al.* 2015). *RBI* se ha catalogado como un gen constitutivo, tienen un papel en distintos procesos dentro de la célula, por lo que el silenciamiento total de este promotor es improbable, siendo la ausencia total de *RBI* incompatible con la vida y su pérdida en etapa adulta está relacionada con el desarrollo de cáncer (Tarang *et al.* 2015). En el carcinoma hepatocelular se ha observado una disminución de *RBI*, principalmente siendo afectado en etapas avanzadas de la enfermedad (Azechi *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2008).

Se observó una diferencia en la actividad promotora de *RBI* en las líneas HepG2 y Huh-7, esto podría deberse a la diferencia que existe en su genoma, ya que a pesar de que ambas provienen de casos de cáncer hepático presentan un fondo genético diferente siendo afectada la regulación de distintas rutas. La línea celular HepG2 se reporta como un derivación de células madre hepáticas no diferenciadas (D. Adem, *et al.* 1979; López-Terrada & Knowles, 2009; Zhou *et al.*, 2019) por este motivo pueden mostrar un mayor potencial de diferenciación. Mientras que la línea celular Huh-7 fue aislada a partir de un caso bien diferenciado de carcinoma hepatocelular proveniente de un paciente adulto (H. Nakabayashi *et al.* 1984; Hsu *et al.* 1993). El promotor de *RBI* pudo presentar un mayor aumento de su actividad luciferasa con respecto a su control en la línea HepG2 debido a la presencia de diferentes factores de transcripción presentes en esta línea celular que pudieran estar interactuando con la región promotora de *RBI* (Gill *et al.* 1994; Hammel *et al.* 1992). Así mismo la expresión diferencial de proteínas que podrían estar mediando la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a la región promotora de *RBI* (Jain 2003; Mummaneni & Shord 2014).

La línea celular HepG2 fue cultivada en presencia de los fármacos isotretinoína (10 μM), talidomida (0.04 μM) y 5-aza-2'-desoxicitidina (1 μM) por 24 h después de la transfección con el vector pGL4-RB1, siendo solamente el tratamiento de isotretinoína el que presentó un aumento significativo con respecto al control. Esto contrastando con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio en el que se obtuvo un aumento en la expresión de *RB1* tanto en presencia de isotretinoína como talidomida. Esta diferencia en las células tratadas con talidomida podría deberse a que en realidad el aumento en la expresión de *RB1* podría estar relacionado con una mayor acumulación de mRNA de *RB1* y no con un aumento en la actividad transcripcional. Por otro lado, otro hecho que llamo la atención fue la baja actividad presentada por el fármaco 5-Aza-2'-desoxicitidina, ya que al existir reportes de la hipermetilación del promotor *RB1* se esperaba que al estar en presencia de un agente desmetilante se elevara la actividad promotora de *RB1*. Esto nos llevó a probar el fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina por un tiempo de 48h obteniendo un incremento significativo del 50.7%. Este fenómeno podría deberse al mecanismo del fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina, en el que se intercala de manera irreversible al DNA (Christman 2002), se ha reportado que basta con al menos 4 h en presencia del fármaco para presentar cambios en la presencia de metilación en regiones promotoras, sin embargo el efecto será notorio en un tiempo de 24-48h (G. Otterson 1995)

Al probarse los fármacos isotretinoína y talidomida por 48 h post transfección se obtuvo esta vez una disminución del 39% en presencia del fármaco isotretinoína. El fármaco isotretinoína ha sido reportado como un fármaco de efecto indirecto, es posible que afecte múltiples rutas que terminen involucrado una disminución en la actividad del promotor *RB1* (Csoka & Szyf 2009), presentando efecto como modificador de patrones de metilación (I. Faleiro et al. 2017; X. Tang 2010).

Al intentar observar el efecto de isotretinoína a las 24 h post transfección en distintas dosis (5, 10 y 20 μM) se observó un incremento significativo solamente en 5 μM , lo cual no implica un efecto dosis dependiente, ya que en la cuantificación de la actividad promotora de *RB1* no se observa una relación en la medición de esta respecto a las diferentes dosis presentadas (Campbell & Cohall 2017; G. Powis, 1983; D. Moffett et al. 2007; Short & Hannam 2000). Se ha observado que en la línea Hep3B y HepG2 en presencia de dosis

bajas de retinoides se puede inducir a apoptosis (F. Arce *et al.* 2005). Esto puede describir fenómenos saturables a dosis altas, característico de muchos productos que requieren bioactivación por metabolismo. El hígado es el principal sitio de almacenamiento y bioactivación de vitamina A. Se ha registrado fenómenos contradictorios que envuelven a los retinoides en procesos antiproliferativos y regenerativos del hígado. Estos conflictos están relacionados con diferencias en dosis, rutas de administración y modelos de prueba.

Paralelamente en los estudios de la línea celular Huh-7, las células tratadas con los fármacos isotretinoína y talidomida 24 h después de la transfección, se observó solo una disminución significativa en presencia del promotor *RBI* en presencia del fármaco isotretinoína. Es posible que a diferencia de la línea celular HepG2 este cambio sea distintivo del procesamiento de los fármacos por parte de la célula. Existe una gran diferencia como ya se ha mencionado previamente en relación al origen de la línea Huh-7 y HepG2, en estudios proteómicos se ha observado una gran diferencia entre las enzimas metabolizadoras de fármacos que expresan estas líneas (Gerets *et al.* 2012; Guo *et al.* 2011; J. Shi *et al.* 2018). Además, en relación a las enzimas metabolizadoras de fase I y fase II se ha catalogado a la línea Huh-7 como un modelo más cercano a los hepatocitos primarios (Lin *et al.* 2012). Se ha observado un efecto inductor en la capacidad de metabolizar fármacos, en células Huh-7 tratadas con DMSO 1%, causando un estado diferenciado. Este estado diferenciado presenta un incremento en las enzimas metabolizadoras y en factores de transcripción característicos de hígado (Choi *et al.* 2009), dado que se utilizó DMSO como vehículo de los fármacos es posible que la presencia de este agente causara una metabolización distinta en las líneas celulares. La expresión del gen *RBI* en presencia del fármaco talidomida pudiera deberse a eventos alternos a la región promotora designada en el presente trabajo, como pudiera ser la disminución de miRNAs que actúen sobre la estabilidad del gen *RBI* (Liu *et al.* 2016).

Mediante el ensayo de BSP se observó la ausencia de metilación en las islas CpG cercanas al promotor mínimo. En relación con los resultados obtenidos en el ensayo de luciferasa y los obtenidos en la secuenciación por bisulfito, se observó que tanto con 5-aza-2'-desoxicitidina 1 μ M a las 24 h y con isotretinoína 5 μ M a las 24 h había un aumento en la actividad del promotor, con base en la literatura se pensó que este efecto pudiera deberse

al mecanismo de estos fármacos de modificar los patrones de metilación (Becker et al., n.d.; Christman 2002; Dahl *et al.* 2000; Lötsch *et al.* 2013; Pandian & Dhanasekaran 2013). Sin embargo difícilmente podemos observar esto en el ensayo de secuenciación por bisulfito, ya que si bien se tiene una menor metilación con respecto al control, no podemos descartar que sean igualmente variantes biológicas por error (Hansmann *et al.* 2012). También es posible pensar que los fármacos si estén actuando al nivel de la regulación transcripcional, al igual que el evento de metilación en una región diferente al blanco. Es propio de promotores constitutivos tener una regulación dispersa, teniendo diferentes sitios de regulación (Juven-gershon & Kadonaga 2010).

También es cierto que para aumentar la fidelidad de la prueba sería necesario aumentar el número de alelos analizados (Hansmann *et al.* 2012). Diversos autores han presentado pruebas de la metilación de *RBI*, tanto en la línea HepG2 como en pacientes (Di Fiore *et al.* 2013; Edamoto *et al.* 2003; Parket *et al.* 2006; Yu *et al.* 2002)). Pudiera ser que la diferencia que se presenta con estos estudios se debiera a la región analizada, al tipo de estudio si es que es un estudio cuantitativo o cualitativo y al tamaño de la región analizada (Anwar *et al.* 2014).

También por la naturaleza técnica de la muestra pudiera ser que al ser clonado en un plásmido se le diera preferencia a las secuencias no metiladas, se ha observado que en la clonación se puede dar preferencia ya sea regiones metiladas o no metilada (Warnecke *et al.* 2006).

A pesar de que nuestro control presento una mayor cantidad de islas CpG (1.6% de metilación de las islas) no se puede afirmar que la región se encuentra sometida a metilación, esto debido a que difícilmente una isla metilada pudiera ejercer el efecto de silenciamiento. Se pudieran atribuir errores de falsos positivos en las secuencias, empero, diversas islas CpG fueron confirmadas con más de una lectura, por lo que pudiera ser un evento biológico estocástico (Hansmann *et al.* 2012). Sin embargo, la presencia de metilación pude ser catalogada como una marca de epimutación que pude al final actuar como una mutación en el modelo de Knudson en el cual al presentarse un evento o dos eventos de mutación se ve afectado el rol del gen en el sistema (Knudson 1971).

La técnica de BSP es una técnica de fácil interpretación, sin embargo, actualmente existen técnicas más robustas como es la implementación de la secuenciación de nueva generación

que nos permitirían analizar todos los alelos que estuvieran presente en una muestra y pudiendo ampliar nuestra región blanco incluyendo una mayor cantidad de la región 5'UTR. No obstante, a comparación de la técnica que se utilizó la secuenciación de nueva generación presenta dificultades al momento de interpretación de los datos, debido a los cambios de C>T que se presentan en la lectura hacen difícil el ensamble de la secuencia (S. Kurdyukov 2016). Con respecto a las mutaciones G>A y A<G se ha reportado estos cambios en secuencias que son blanco de las DNMT, por lo que esto nos podría indicar que en cierto momento la región si es sometida por los procesos de metilación (Hitchins *et al.* 2011).

En conclusión, los resultados de la presente tesis sugieren que el fármaco isotretinoína regula al promotor *RB1*, lo cual fue observable en los diferentes ensayos de luciferasa al reprimir o inducir la actividad del promotor, dependiendo de las condiciones del tratamiento y la línea celular. Presentando un incremento de la actividad del promotor *RB1* a las concentraciones de 5 μ M y 10 μ M a las 24 h en la línea celular HepG2. Sin embargo, no es posible relacionar esta regulación de la actividad promotora con la metilación de las islas CpG del promotor *RB1*, debido a la aparente ausencia de metilación en el promotor *RB1* aun si la exposición al tratamiento.

9. CONCLUSIONES

El fármaco isotretinoína incrementó la actividad del promotor de *RBI* a las concentraciones de 5 μM y 10 μM en la línea celular HepG2 a las 24 horas post-transfección.

El fármaco isotretinoína a la concentración 10 μM disminuyó la actividad del promotor *RBI* en la línea celular HepG2 a las 48 horas post-transfección.

El fármaco isotretinoína a la concentración de 10 μM disminuyó la actividad del promotor *RBI* en la línea celular Huh-7 a las 24 horas post-transfección.

El fármaco talidomida a la concentración 0.04 μM no modificó la actividad promotora el gen *RBI* en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.

El promotor de *RBI* no presentó la adición de grupos metilo en las islas CpG analizadas en la línea celular HepG2.

No hubo diferencia significativa en la presencia de metilación en las islas CpG del promotor *RBI* en presencia del tratamiento de isotretinoína a la concentración 5 μM por 24 h en las células HepG2.

10. PERSPECTIVAS

Analizar la expresión de *RB1* en presencia de los fármacos isotretinoína y talidomida en la línea celular Huh-7.

Analizar la expresión de *RB1* en presencia de los fármacos isotretinoína y talidomida con el fármaco 5-Aza'2-Desoxictidina en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.

Analizar la actividad luciferasa del promotor *RB1* en presencia de los fármacos isotretinoína y talidomida con el fármaco 5-Aza'2-Desoxictidina en la línea celular HepG2 y Huh-7.

Analizar la regulación por miRNAs del gen *RB1* en presencia de los fármacos talidomida e isotretinoína en línea celular HepG2.

Analizar la estabilidad del mRNA del gen *RB1* en presencia de los fármacos talidomida e isotretinoína en la línea celular HepG2

Analizar la regulación de otros genes involucrados en la vía de *RB1* en presencia de los fármacos isotretinoína y talidomida en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, N., Sharma, A. R., & Baylin, S. B. (2016). Epigenetic Therapeutics : A New Weapon in the War Against Cancer. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-111314-035900>
- Andersen G.B., Tost J. (2018) A Summary of the Biological Processes, Disease-Associated Changes, and Clinical Applications of DNA Methylation. In: Tost J. (eds) DNA Methylation Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1708. Humana Press, New York, NY
- Anestopoulos, I., Voulgaridou, G. P., Georgakilas, A. G., Franco, R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2015). Epigenetic therapy as a novel approach in hepatocellular carcinoma. *Pharmacology & Therapeutics*, 145, 103–119. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.005>
- Anwar, S. L., Krech, T., Hasemeier, B., Schipper, E., Schweitzer, N., Vogel, A., ... Lehmann, U. (2014b). Deregulation of RB1 expression by loss of imprinting in human hepatocellular carcinoma, (June), 392–401. <https://doi.org/10.1002/path.4376>
- Arce, F., Gätjens-Boniche, O., Vargas, E., Valverde, B., & Díaz, C. (2005). Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Letters*, 229(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.047>
- Azechi, H., Nishida, N., Fukuda, Y., Nishimura, T., Minata, M., Katsuma, H., ... Nakao, K. (2001). Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*, 60(4), 346–354. <https://doi.org/10.1159/000058531>
- Becker, E., Bengs, S., Aluri, S., Opitz, L., Atrott, K., Rost, F., ... Rogler, G. (n.d.). Large-Scale Integrative Analysis of Epigenetic Modifications Induced by Isotretinoin , Doxycycline and Metronidazole in Murine Colonic Intestinal Epithelial Cells. <https://doi.org/10.3390/epigenomes1030024>
- Bélanger, H., Beaulieu, P., Moreau, C., Labuda, D., Hudson, T. J., & Sinnett, D. (2005).

- Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes. *Human Molecular Genetics*, 14(18), 2641–2648. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi298>
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2017). Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
- Borja Aburto VH, Dávila Torres J, R.-P. R., González León M, Fernández Gárate JE, M. R. I., & González Izquierdo JJ, E. de los R. P. (2016). Cancer mortality in the Mexican social security institute, 1989-2013. *Salud Publica de Mexico*, 58(2), 153–161.
- Campbell, J. E., & Cohall, D. (2017). *Pharmacodynamics — A Pharmacognosy Perspective. Pharmacognosy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00026-3>
- Chinnam, M., & Goodrich, D. W. (2011). *RBI, Development, and Cancer. Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 94). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380916-2.00005-X>
- Choi, S., Sainz, B., Corcoran, P., Uprichard, S., & Jeong, H. (2009). Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO) -treated Huh7 hepatoma cells, 39(October 2008), 205–217. <https://doi.org/10.1080/00498250802613620>
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35 REV. ISS. 3), 5483–5495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699>
- Classon, M., & Dyson, N. (2001). P107 and P130: Versatile Proteins With Interesting Pockets. *Experimental Cell Research*, 264(1), 135–147. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5135>
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24(17), 2796–2809. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208619>
- Csoka, A. B., & Szyf, M. (2009). Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Medical Hypotheses*, 73(5),

770–780. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.10.039>

- D. Adem, A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, B. K. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Macmillan Journals Ltd.
- Dahl, A. R., Grossi, I. M., Houchens, D. P., Scovell, L. J., Placke, M. E., Imondi, A. R., ... Mulshine, J. L. (2000). Inhaled isotretinoin (13-cis retinoic acid) is an effective lung cancer chemopreventive agent in A/J mice at low doses: A pilot study. *Clinical Cancer Research*, 6(8), 3015–3024. <https://doi.org/00013644-200603000-00010> [pii]
- de Martel, C., Maucort-Boulch, D., Plummer, M., & Franceschi, S. (2015). World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 62(4), 1190–1200. <https://doi.org/10.1002/hep.27969>
- Dhanasekaran, R., Nault, J., Roberts, L. R., & Zucman-rossi, J. (2019). Genomic Medicine and Implications for Hepatocellular Carcinoma Prevention and Therapy. *Gastroenterology*, 1–18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.001>
- Di Fiore, R., D’Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1002/jcp.24329>
- Dyson, N. J. (2016). RB1 : a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes and Development*, 1492–1502. <https://doi.org/10.1101/gad.282145.116>.
- Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W., Terracciano, L., Cathomas, G., Riehle, H. M., ... Ohgaki, H. (2003). Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *International Journal of Cancer*, 106(3), 334–341. <https://doi.org/10.1002/ijc.11254>
- Faleiro, I., Leão, R., Binnie, A., Mello, R. A. De, Maia, A., & Castelo-branco, P. (2017). Epigenetic therapy in urologic cancers : an update on clinical trials. *Oncotarget*,

8(7), 12484–12500.

- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, *421*(January), 436–440.
<https://doi.org/doi:10.1038/nature01408>
- Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*, *28*(2), 69–87. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>
- Globocan, 2018. The Global Cancer Observatory. [En línea] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>
- Guo, L., Dial, S., Shi, L., Branham, W., Liu, J., Fang, J., ... Ning, B. (2011). Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes □, *39*(3), 528–538.
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.035873>.
- H. Nakabayashi, K. Taketa, T. Yamane, M. Miyazaki, K. Miyano, J. S. (1984). Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gan*, *75*, 151–158.
- Hanahan, D, & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.
<https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hanahan, Douglas, & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansmann, T., Pliushch, G., Leubner, M., Kroll, P., Endt, D., Gehrig, A., ... Haaf, T. (2012). Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer, *21*(21), 4669–4679. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc308>
- Helleday, T., Eshtad, S., & Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics*, *15*(9), 585–598.
<https://doi.org/10.1038/nrg3729>

- Hitchins, M. P., Rapkins, R. W., Kwok, C., Srivastava, S., Wong, J. J. L., Khachigian, L. M., ... Ward, R. L. (2011). Article Dominantly Inherited Constitutional Epigenetic Silencing of MLH1 in a Cancer-Affected Family Is Linked to a Single Nucleotide Variant within the 5' UTR. *Cancer Cell*, 20(2), 200–213.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.003>
- Hong, F. D., Huang, H. J., To, H., Young, L. J., Oro, A., Bookstein, R., ... Lee, W. H. (1989). Structure of the human retinoblastoma gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14), 5502–5506.
Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=297651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hsu, I. C., Tokiwa, T., Bennett, W., Metcalf, R. A., Welsh, J. A., Sun, T., & Harris, C. C. (1993). p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 14(5), 987–992.
- Jain, P. (2003). Epigenetics: The Role of Methylation in the Mechanism of Action of Tumor Suppressor Genes. *New York Academy of Sciences*, 983, 71–83.
- Jennen, D. G. J., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H. B., Herwijnen, M. H. M. Van, Kleinjans, J. C. S., & Delft, J. H. M. Van. (2010). Comparison of HepG2 and HepaRG by Whole-Genome Gene Expression Analysis for the Purpose of Chemical Hazard Identification, *115*(1), 66–79.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq026>
- Hayashi, N., Takashi, C. (2015). Pleiotropic Functions of RB Protein in Tumor Suppression. *IMedPub Journals*, 1–11.
- Juven-gershon, T., & Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer : Statistical Study of Retinoblastoma, 68(4), 820–823.

- Kohli, A. (2016). HCC in Focus The Relationship Between Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis. *Gatrpemterpñpgy & Hepatology*, *12*(2), 116–118.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*, *70*(10), 28–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
- Kunkel, T. A., Lindahl, T., Sancar, A., & Modrich, P. (2015). BenchMarks Celebrating DNA ' s Repair Crew. *Cell*, *163*(6), 1301–1303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.028>
- Lafaro, K. J., Demirjian, A. N., & Pawlik, T. M. (2015). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, *24*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.09.001>
- Lamber, E. P., Beuron, F., Morris, E. P., Svergun, D. I., & Mitnacht, S. (2013). Structural Insights into the Mechanism of Phosphoregulation of the Retinoblastoma Protein. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058463>
- Lee, C., Chang, J. H., Lee, H. S., & Cho, Y. (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes and Development*, *16*(24), 3199–3212. <https://doi.org/10.1101/gad.1046102>
- Li, Z., Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2015). DNA mismatch repair and the DNA damage response, 1–8.
- Lin, J., Schyschka, L., Mühl-Benninghaus, R., Neumann, J., Hao, L., Nussler, N., ... Ehnert, S. (2012). Comparative analysis of phase i and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Archives of Toxicology*, *86*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0733-y>
- Liu, C., Wang, C., Wang, J., & Huang, H. (2016). miR-1297 promotes cell proliferation by inhibiting RB1 in liver cancer. *Oncology Letters*, *12*(6), 5177–5182. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5326>
- López-terrada, D., & Knowles, B. B. (2009). Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line, (OCTOBER), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.003>

- Lötsch, J., Schneider, G., Reker, D., Parnham, M. J., Schneider, P., Geisslinger, G., & Doehring, A. (2013). Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(12), 742–753.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.08.006>
- M. Gill, P. Hamel, Z. Jiang, E. Zacksenhaus, B. Gallie, R. P. (1994). Characterization of the Human in Transcriptional of, *5*(May), 467–474.
- McGlynn, K. a., Petrick, J. L., & London, W. T. (2015). Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: An Emphasis on Demographic and Regional Variability. *Clinics in Liver Disease*, *19*(2), 223–238.
<https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.001>
- Mittnacht, S. (2005). The retinoblastoma protein--from bench to bedside. *European Journal of Cell Biology*, *84*(2–3), 97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.012>
- Moffett, D. B., El-masri, H. A., & Fowler, B. A. (2007). General Considerations of Dose-Effect and Dose-Response Relationships *, (1), 101–115.
- Mummaneni, P., & Shord, S. S. (2014). Epigenetics and Oncology.
<https://doi.org/10.1002/phar.1408>
- Nantasanti, S., Toussaint, M. J. M., Youssef, S. A., Tooten, P. C. J., & de Bruin, A. (2016). Rb and p53 Liver Functions Are Essential for Xenobiotic Metabolism and Tumor Suppression. *Plos One*, *11*(3), e0150064.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150064>
- NIH, 2019. National Institute of Health. [En línea] Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es/>
- OMIM, 2019. Online Mendelian Inheritance in Man ® [En línea] Disponible en: <https://www.omim.org/entry/614041#30>
- P. Hammel, M. Gill, R. Phillips, B. G. (1992). Transcriptional Repression of the E2-Containing Promoters EIIaE , c-myc , and RB1 by the Product of the RB1 Gene, *12*(8), 3431–3438.

- Pagliarini, R., Shao, W., & Sellers, W. R. (2015). Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Rep*, *16*(3), 280–296. <https://doi.org/10.15252/embr.201439949>
- Pandian, A., & Dhanasekaran, R. (2013). Torque ripple minimization in direct torque control of induction motor using fuzzy technique. *Life Science Journal*, *10*(SUPPL.1), 133–139. <https://doi.org/10.1128/MCB.01799-07>
- Park, H.-J., Yu, E., & Shim, Y.-H. (2006). DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, *233*(2), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.017>
- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W., & Clark, S. (2011). DNA Methylation : Bisulphite Modification and Analysis, (October), 1–9. <https://doi.org/10.3791/3170>
- Perri, F., Longo, F., Giuliano, M., Sabbatino, F., Favia, G., Ionna, F., ... Pisconti, S. (2017). Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *111*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.020>
- Pogribny, I. P., & Rusyn, I. (2014). Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, *342*(2), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.038>
- Powis, G. (1983). Dose-Dependent Metabolism , Therapeutic Effect , and Toxicity of Anticancer Drugs in. *Drug Metabolism Reviews*, *14*, 1145–1163.
- Qi, Y., Wang, D., Wang, D., Jin, T., Yang, L., Wu, H., ... Wang, R. (2016). HEDD: The human epigenetic drug database. *Database*, *2016*, 1–10. <https://doi.org/10.1093/database/baw159>
- Reis, A. H. O., Vargas, F. R., & Lemos, B. (2016). Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5278-5>
- Ryerson, A. B., Ehemann, C. R., Altekruse, S. F., Ward, J. W., Jemal, A., Sherman, R. L., ... Kohler, B. A. (2016). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer*, *122*(9),

1312–1337. <https://doi.org/10.1002/cncr.29936>

- S. Kurdyukov, M. B. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
- Sathe, A., Koshy, N., Schmid, S. C., Thalgott, M., Sarah, M., Krause, B. J., ... Nawroth, R. (2015). CDK4/6-inhibition controls proliferation of bladder cancer and transcription of RB1. *The Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.08.082>
- Shehzad, A., Shahzad, R., & Lee, Y. S. (2014). *Curcumin : A Potent Modulator of Multiple Enzymes in Multiple Cancers. Natural Products and Cancer Signaling: Isoprenoids Polyphenols and Flavonoids* (1st ed., Vol. 36). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802215-3.00008-2>
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2)
- Shi, J., Wang, X., Lyu, L., Jiang, H., & Zhu, H. (2018). Drug Metabolism and Pharmacokinetics Comparison of protein expressions between human livers and the hepatic cell lines HepG2 , Hep3B and Huh7 using SWATH and MRM-HR proteomics : Focusing on drug-metabolizing enzymes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, (March), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.03.003>
- Short, T. G., & Hannam, J. A. (2000). *6 - Pharmacodynamic Drug Interactions. Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00006-5>
- Singh, U., Malik, M. A., Goswami, S., Shukla, S., & Kaur, J. (2016). Epigenetic regulation of human retinoblastoma. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5308-3>
- Tang, X., Albert, M., Scognamiglio, T., & Gudas, L. J. (2010). A DNA methyltransferase inhibitor and all-trans retinoic acid reduce oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4- nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Prev Res*, 2(12), 1100–1110. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0136.A>

- Tarang, S., Doi, S. M. S. R., Gurumurthy, C. B., Harms, D., Quadros, R., & Rocha-sanchez, S. M. (2015). Generation of a Retinoblastoma (Rb) 1 -inducible dominant-negative (DN) mouse model, 9(February), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00052>
- Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K. (2017). Epigenetics in cancer stem cells, 1–20.
<https://doi.org/10.1186/s12943-017-0596-9>
- Uchida, C. (2016). Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *BioMed Research International*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/5959721>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. a, & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Lanscapes. *Science*, 339(6127), 1546–1558.
<https://doi.org/10.1126/science.1235122.Cancer>
- Warnecke, P. M., Mann, J. R., Frommer, M., & Clark, S. J. (2006). Bisulfite Sequencing in Preimplantation Embryos : DNA Methylation Profile of the Upstream Region of the Mouse Imprinted H19 Gene, 190(1998), 182–190.
- Yang, S., Chang, C., Wei, R., Shiue, Y., Wang, S., & Yeh, Y. (2014). Involvement of DNA Damage Response Pathways in Hepatocellular Carcinoma, 2014(Figure 1).
<https://doi.org/10.1155/2014/153867>
- Yoo, C. B., & Jones, P. a. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/nrd1930>
- Yu, J., Ni, M., Xu, J., Zhang, H., Gao, B., Gu, J., ... Zhu, J. (2002). Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis, 14, 1–14.
- Zhang, C., Guo, X., Jiang, G., Zhang, L., Yang, Y., & Shen, F. (2008). CpG island methylator phenotype association with upregulated telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 1004(June), 998–1004.
<https://doi.org/10.1002/ijc.23650>
- Zhou, B., Ho, S. S., Greer, S. U., Spies, N., Bell, J. M., Zhang, X., ... Urban, A. E.

(2019). Haplotype-resolved and integrated genome analysis of the cancer cell line HepG2, 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz169>

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jorge Eduardo Vargas Gómez
Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROMOTORA DEL GEN *RBI* HUMANO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HEPÁTICO EN PRESENCIA DE DOS FÁRMACOS MODULADORES DE LA EPIGÉNÉTICA

Campo de Estudio: Inmunobiología

Datos Personales: Nacido en Tampico, Tamaulipas el 15 de abril de 1993, hijo de Jorge Vargas Andrade y Agustina Gómez Hernández.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Licenciatura en Biotecnología Genómica.

1. Datos básicos

[Datos generales](#)

[Domicilio de residencia](#)

2. Formación académica

[Grados Académicos](#)

3. Trayectoria profesional

4. Producción científica, tecnológica y de innovación

4.1 Científica

4.2 Tecnológica y de innovación

5. Formación de capital humano

5.1 Docencia

5.2 Tesis dirigidas

5.3 Diplomados

6. Comunicación pública de la ciencia, tecnológica y de innovación

6.1 Difusión

6.3 Divulgación

[Participación en congresos](#)

7. Vinculación

8. Evaluaciones

9. Premios y distinciones

10. Lenguas e idiomas

CONACYT

Datos generales

CURP: VAGJ930415HTSRMR07	Fecha de nacimiento: 15/abr/1993	RFC: VAGJ930415A54
Nombre: JORGE EDUARDO	Primer apellido: VARGAS	Segundo apellido: GOMEZ
Sexo: Masculino	Estado conyugal: Soltero(a)	País de nacimiento: México
Entidad federativa: TAMAULIPAS		CVU: 817006
Contacto principal: jorgeed_93@msn.com		Nacionalidad: Mexicana

Identificadores de autor

ORC ID:
Researcher ID Thomson:
arXiv Author ID:
PubMed Author ID:
Open ID:

Medios de contacto

Medio de contacto	Categoría de contacto	Correo / Teléfono	Principal
Correo electrónico	Oficial	jorgeed_93@msn.com	SI

Domicilio de residencia

Estado o distrito federal: NUEVO LEÓN	Municipio o delegación: MONTERREY
Localidad: MONTERREY	Código postal: 64260
Asentamiento: Colonia - Hogares Ferrocarrileros	

Vialidad de domicilio

Nombre de vialidad: Manuel L. Barragán

Identificación del inmueble

Número exterior:	Parte numérica: 4908	Parte alfanumérica:	Número exterior anterior: 4908
Número interior:	Parte numérica: 1	Parte alfanumérica: C	

Entre que calles

Nombre de vialidad: y

Calle posterior

Nombre:
Descripción de la ubicación:

CONACYT

Grados académicos

Título: LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

Nivel de escolaridad: Licenciatura

Estatus: Créditos terminados

Opciones de titulación: Tesis

Título de tesis: Aislamiento y caracterización del promotor RB1 humano en una línea de carcinoma hepatocelular

Fecha de obtención: 18/jun/2016

País de obtención de grado: México

Grados académicos

Título: Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Nivel de escolaridad: Maestría

Estatus: Créditos terminados

Institución de obtención de grado: Universidad Autonoma de Nuevo Leon (UANL)

País de obtención de grado: México

Áreas de conocimiento

Área: Biología y química

Campo: Ciencias biomédicas

Disciplina: Genómica humana

Subdisciplina: Genómica humana

Participación en congresos

Nombre del congreso: XXXII Congreso Nacional de Bioquímica

Título del trabajo: Analysis of promoter activity of the human gene RB1 in hepatic cancer cell lines by two epigenetic drugs

Título de participación congreso: Póster

Fecha: 08/nov/2018

País: México

Palabra clave 1: Epigenetic drugs

Palabra clave 2: Hepatic cancer

Palabra clave 2: RB1

Colaboradores

Nombre: Alain Jesus Aguirre Vázquez

Sexo: Masculino

Nombre: Mario Abelardo Bermúdez De León

Sexo: Masculino

Nombre: Vianey González Villasana

Sexo: Femenino

Nombre: Paulina Janeth Barraza Reyna

Sexo: Femenino