



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO EPIGENÉTICO DEL PROMOTOR
DEL *microRNA-125b1* EN UN MODELO DE
CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

FERNANDA CISNEROS SOBERANIS

TUTORES

DR. ERNESTO SOTO-REYES SOLÍS
DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
CO-ASESOR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE	1
I. RESUMEN.....	4
II. ABSTRACT.....	6
III. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Cáncer	7
1.1 Definición de cáncer.....	7
1.2 Modelos propuestos para el desarrollo del cáncer.....	7
1.2.1 Hipótesis del fenotipo mutador y modelo de expansión clonal.....	8
1.2.2 Modelo del progenitor epigenético.....	8
1.3 Proceso de carcinogénesis.....	9
1.4 Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer.....	11
1.4.1 Factores ambientales.....	12
1.4.2 Factores genéticos.....	12
1.4.3 Factores epigenéticos.....	12
2. Epigenética	13
2.1 Definición de epigenética.....	13
2.2 Estructura de la cromatina.....	13
2.3 Niveles de compactación de la cromatina.....	14
2.4 Modificaciones post-traduccionales de las histonas y su mecanismo de acción.....	16
2.4.1 Acetilación de histonas.....	16
2.4.2 Metilación de histonas.....	17
2.5 Variantes de histonas.....	18
2.6 Metilación del DNA.....	19
2.6.1 Características de la metilación del DNA.....	19
2.6.2 Metilación del DNA de mantenimiento y <i>de novo</i>	20
2.6.3 Modelos de represión transcripcional.....	21
2.6.4 Papel de la metilación del DNA en cáncer: Modelo del fenotipo metilador.....	22
3. Las islas CpG	23
3.1 Definición e importancia de las islas CpG.....	23
3.2 Tipos de las islas CpG por su localización genómica.....	23
4. Regiones promotoras	24
4.1 Definición de un promotor.....	24
4.2 Identificación de un promotor a partir de elementos en <i>cis</i> -.....	25

4.3 Componentes epigenéticos asociados a regiones promotoras.....	26
4.4 Tipos de islas CpG y su asociación con promotores.....	27
5. Los miRNAs (miRNAs).....	28
5.1 Definición de miRNAs.....	28
5.2 Biogénesis de miRNAs.....	28
5.3 Clasificación de miRNAs.....	30
5.4 Niveles de expresión de miRNAs.....	31
5.5 miRNAs con actividad de oncogenes y genes supresores de tumores.....	31
6. El microRNA <i>miR-125b1</i>.....	32
6.1 Características del <i>miR-125b1</i>	32
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
V. HIPÓTESIS.....	35
VI. OBJETIVO GENERAL.....	35
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
VIII. RESULTADOS.....	36
1. Análisis <i>in silico</i> de los componentes genéticos y epigenéticos del locus del <i>miR-125b1</i>	36
2. Actividad promotora de la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del <i>miR-125b1</i>	38
3. Análisis del estado de metilación del promotor del <i>miR-125b1</i>	39
4. Expresión del <i>miR-125b1</i> en líneas celulares de cáncer de mama.....	41
IX. DISCUSIÓN.....	42
1. Análisis <i>in silico</i> de los componentes genéticos y epigenéticos del locus del <i>miR-125b1</i>	42
2. Actividad promotora de la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del <i>miR-125b1</i>	43
3. Análisis del estado de metilación del promotor del <i>miR-125b1</i>	43
4. Expresión del <i>miR-125b1</i> en líneas celulares de cáncer de mama.....	44
X. CONCLUSIONES.....	44
XI. PERSPECTIVAS.....	45
1. Análisis de las CpG necesarias para la represión transcripcional del <i>miR-125b1</i>	45
2. Análisis de las modificaciones post-traduccionales de histonas sobre el promotor del <i>miR-125b1</i>	46
3. Análisis de los blancos del <i>miR-125b1</i>	46
4. Modelo de regulación del <i>miR-125b1/let-7a-2/miR-100</i>	47

XII.MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. Análisis <i>in silico</i> del locus del <i>miR-125b1</i>	51
2. Líneas celulares.....	52
3. Ensayo de actividad promotora mediante un vector reportero de luciferasa con la región del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del <i>miR-125b1</i>	52
4. Análisis del estado de metilación del promotor del <i>miR-125b1</i>	58
5. Análisis de los niveles de expresión del <i>miR-125b1</i>	61
6. Análisis estadístico.....	65
XIII.REFERENCIAS.....	65
1. Artículos.....	65
2. Libros.....	71
3. Páginas web.....	72

RESUMEN

El principal sitio de regulación de la transcripción en organismos eucariontes es el promotor génico. Se ha demostrado que el 70% de los promotores se encuentran contenidos en regiones ricas en citosinas y guaninas, conocidas como “islas CpGs”. Los promotores que contienen islas CpGs pueden inactivarse transcripcionalmente, de manera anormal por componentes epigenéticos como la metilación del DNA. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos que regulan a los promotores de genes que transcriben RNAs no-codificantes como los miRNAs. Los genes de miRNAs transcriben a un RNA que se procesa hasta obtener fragmentos de 18 a 22 nucleótidos, estos se anclan a un complejo proteico conocido como RISC y son capaces de regular la expresión de múltiples genes blanco. Actualmente, se les ha asociado con actividad de oncogenes o genes supresores de tumores. Particularmente, el *miR-125b1*, se ha reportado desregulado en diferentes neoplasias como cáncer de mama. Recientemente, se ha asociado con actividad de gen supresor de tumores, ya que entre sus blancos se encuentran genes como ERBB2 y EST1. Por esta razón, sería relevante estudiar los mecanismos de regulación de éste gen.

Uno de los intereses de nuestro trabajo, fue caracterizar la región promotora del *miR-125b1*. Para ello, realizamos un análisis *in silico* de la región adyacente al gen del *miR-125b1* en la cual encontramos una isla CpG en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen. A nivel epigenético, encontramos, *in silico*, modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a regiones promotoras como un enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3), la incorporación de la variante H2A.Z y sitios de reclutamiento de la RNA polimerasa II. Para demostrar si esta región presenta actividad promotora, amplificamos por PCR un fragmento de 481 pb que se encuentra dentro de la isla CpG. Posteriormente, lo clonamos en dos orientaciones, 5' a 3' y 3' a 5' en relación al gen endógeno, dentro un vector que contiene al gen de la luciferasa como reportero. En estos ensayos, encontramos un incremento significativo en las unidades relativas de luciferasa con el vector que tenía al fragmento en orientación 5' a 3'. Mientras que el fragmento en orientación 3' a 5', no mostró ninguna actividad promotora en comparación con el vector vacío. Estos datos sugieren fuertemente que dicha región podría ser el promotor del *miR-125b1*. Posteriormente, determinamos si componentes epigenéticos como la metilación del DNA pueden asociarse con su silenciamiento en un modelo de cáncer de mama. Para lo cual, evaluamos el estado de metilación del DNA sobre la isla CpG del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de

mama, por medio de las técnicas de PCR metilo sensible y bisulfito-secuenciación. La isla CpG se encuentra metilada, principalmente, en líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con una línea celular de mama no transformada. Para determinar si la metilación del DNA afecta los niveles de expresión del *miR-125b1*, realizamos una RT-PCR en tiempo real y encontramos un decremento significativo en los niveles de expresión del *miR-125b1* en las líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea de mama no transformada. Estos datos sugieren que la metilación del DNA sobre la isla CpG con actividad promotora del *miR-125b1* está involucrada en una disminución en la expresión de este gen.

Como conclusión, estos resultados sugieren que la isla CpG localizada en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1* es un promotor funcional unidireccional. Al evaluar el estado de metilación de esta isla CpG, se encontró que en líneas celulares de cáncer de mama había una metilación aberrante y que esta metilación disminuye los niveles de expresión de gen *miR-125b1*.

ABSTRACT

In cancer cells, transcriptional gene silencing has been associated with genetic and epigenetic defects. The disruption of DNA methylation patterns and covalent histone marks has been associated with cancer development. Until recently, microRNA (miRNA) gene silencing was not well understood. In particular, *miR-125b1* has been suggested to be a miRNA with tumor suppressor activity, and it has been shown to be deregulated in various human cancers. In this study, we characterized the promoter of the *miR-125b1* and the DNA methylation associated with its silencing.

We studied *in silico* the *miR-125b1* locus to define its promoter region and then, we characterized the promoter activity by luciferase assay, cloning a fragment in the 5' extreme close to the transcriptional start site of the *miR-125b1* gene. We found that the sequence in the 5' extreme close to the transcriptional start site of the *miR-125b1* has promoter activity and it is unidirectional. Subsequently, we analyzed the DNA methylation in the CpG island promoter and found that in breast cancer cell lines, it was methylated compared to the same region in non-transformed breast cell line. To determine the effect of DNA methylation at the CpG island of *miR-125b1* on the expression of this gene, we performed a qRT-PCR assay. We observed a significant reduction on the expression of *miR-125b1* in cancer cells lines suggesting that DNA methylation at the CpG island might reduce *miR-125b1* expression.

Our data suggest that the fragment in the 5' extreme close to the transcriptional start site of the *miR-125b1* gene is a functional and unidirectional promoter. Also, the CpG island in this region is methylated in breast cancer cell lines and this methylation is associated with the silencing of the *miR-125b1* gene.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

Definición de cáncer

El cáncer es el conjunto de enfermedades de origen multifactorial que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada. Este padecimiento es la tercera causa de muerte a nivel mundial después de padecimientos cardiovasculares y enfermedades infecciosas (Global Burden of Disease, 2004). En el 2008, se le atribuyeron 7.6 millones de defunciones de las cuales el 70% ocurrieron en países de bajos y medianos ingresos (OMS, 2008). Los cánceres con mayor incidencia se encuentran en órganos como pulmón, próstata, colon, estómago y mama. Particularmente, el cáncer de mama es una de las enfermedades que más afecta a las mujeres en el mundo. Tiene el primer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad a nivel mundial (GLOBOCAN, 2008). Por esta razón, es importante esclarecer los mecanismos involucrados en el inicio y progresión de este padecimiento.

Modelos propuestos para el desarrollo del cáncer

En los años 70s, existían tres modelos que explicaban los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer. El primero de ellos, establecía que el cáncer era resultado de una diferenciación celular aberrante donde existen alteraciones en el fenotipo celular sin que se lleven a cabo cambios en el genoma (Mendelsohn *et al*, 2008). El segundo de ellos, fue desarrollado por virólogos. Ellos propusieron que los virus eran capaces de estimular la formación de tumores a través de la invasión y transformación de la célula hospedera. El ejemplo clásico de este modelo, es el sarcoma de Rous. En 1911, Peyton Rous reportó la inducción de sarcoma en un modelo de pollo cuando era infectado con un “agente carcinógeno”, el cual años después se descubrió que era un virus (Rous, 1911). Este descubrimiento, fue clave en el estudio del cáncer, ya que, posteriormente, sirvió para el descubrimiento del primer oncogen, *Src* (Stehelin *et al*, 1976). Por otro lado, el último modelo, establece que la formación de tumores está dada por la exposición a agentes carcinógenos y mutágenos. Estos agentes tienen la capacidad de dañar el DNA a partir de la inducción de mutaciones, propiciando la idea de que el fenotipo transformado era consecuencia de mutaciones en múltiples genes. La primera evidencia de este

modelo, lo desarrolló Percivall Pott en 1775, en un estudio epidemiológico donde identificó al hollín como la causa del cáncer de escroto en deshollinadores ingleses (Pott, 1775). Sin embargo, fue el grupo de Katsusaburo Yamagiwa quienes encontraron evidencia experimental del estudio epidemiológico de Percivall Pott. Este grupo realizó estudios en conejos expuestos a agentes carcinógenos como el hollín y encontraron que en las zonas más expuestas, los conejos desarrollaron carcinoma de células escamosas (Yamagiwa *et al*, 1918). Actualmente, este modelo, es uno de los más aceptados. Incluso, se han planteado hipótesis y modelos sobre los cambios que favorecen la alteración de un fenotipo normal y transformarlo en uno con características tumorales. Entre ellos se encuentran el modelo del progenitor epigenético, la hipótesis del fenotipo mutador y el modelo de expansión clonal.

Hipótesis del fenotipo mutador y el modelo de expansión clonal

En una célula normal, el genoma se encuentra en un equilibrio dinámico entre los procesos que generan cambios genéticos y los procesos de reparación de la secuencia del DNA. En los años 90s, el grupo de Lawrence Loeb propuso que el fenotipo de una célula tumoral era resultado de múltiples alteraciones en genes asociados con el mantenimiento de la integridad genómica. Este grupo, describió un cambio inicial en el genoma, el cual denominó como mutación mutadora. Posterior a este proceso inicial, comienza una cascada de cambios genéticos los cuales pueden llevarse tanto en genes relacionados con el mantenimiento en la estabilidad del genoma como otros independientes a esta función. Estos eventos tienen como consecuencia, un incremento en la tasa de mutaciones de la célula, a la cual se le conoce como inestabilidad genómica (Loeb *et al*, 2003). En la mayoría de los casos, se ha demostrado que estas mutaciones comprometen la viabilidad celular. Sin embargo, otras generan ventajas selectivas a las células afectadas sobre otras que se encuentren en su entorno, favoreciendo una expansión clonal y la herencia de esta cualidad (Bielas *et al*, 2006; Merlo *et al*, 2006) (Figura 1A).

Modelo del progenitor epigenético

Otra propuesta innovadora en el estudio del cáncer, fue la que desarrolló el grupo de Andrew Feinberg. El modelo del progenitor epigenético propone que el desarrollo del cáncer se lleva a cabo en tres etapas. En la primera etapa, existen alteraciones

epigenéticas en las células progenitoras de un tejido, lo cual conlleva a una desregulación aberrante en la expresión de genes involucrados en el ciclo celular (Feinberg *et al*, 2006). En una segunda etapa, los cambios epigenéticos derivan en cambios genéticos como mutaciones en genes de reparación del DNA y control del ciclo celular. Esto tiene como consecuencia, un incremento en inestabilidad genómica, que conlleva al desarrollo del tumor. Finalmente, la tercera etapa consiste en la expansión clonal de aquellas células que hayan obtenido ventajas selectivas que favorecen una división celular descontrolada (Merlo *et al*, 2006) (Figura 1B).

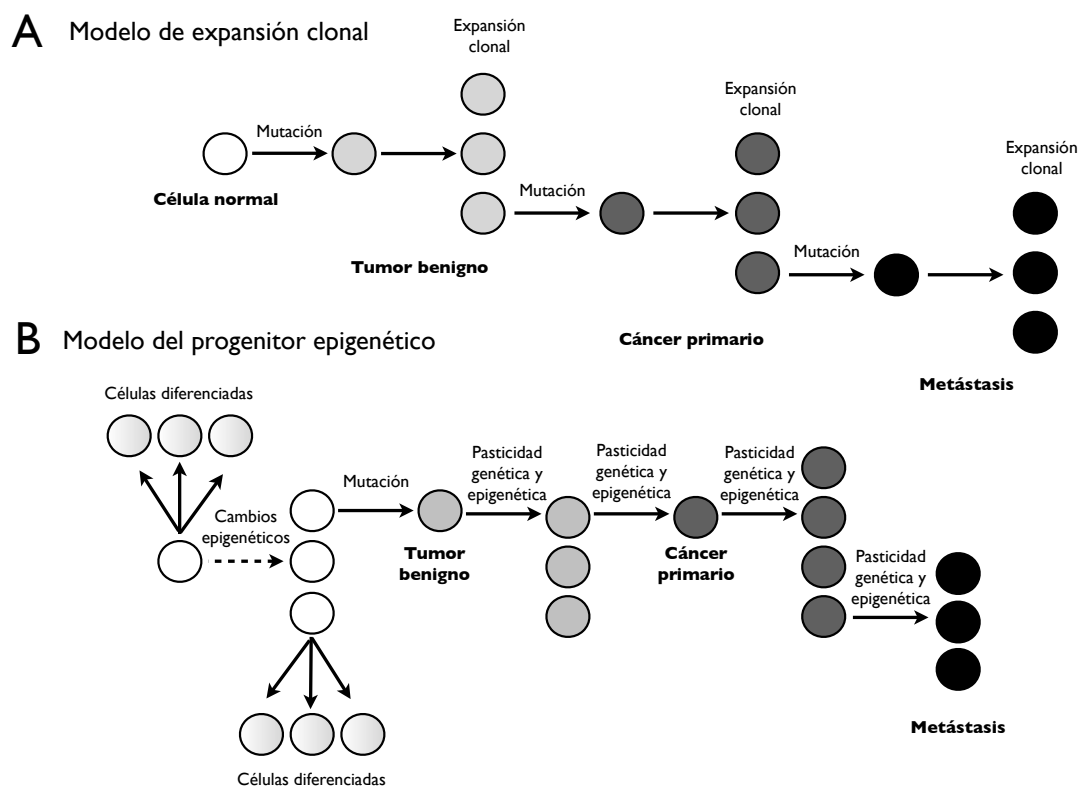


Figura 1. **Modelos propuestos para el desarrollo del cáncer.** (A) El modelo de expansión clonal propone que existe una mutación iniciadora y, a partir de ésta, incrementará la tasa de inestabilidad genética. Las células cuyas mutaciones les proporcione ventajas selectivas generarán progeñie con diferentes mutaciones hasta formar un tumor heterogéneo. (B) El modelo del progenitor epigenético es muy similar al modelo de expansión clonal. Sin embargo, este considera que existe un primer cambio que ocurre a nivel epigenético en células progenitoras y este genera la mutación iniciadora (Modificada de Feinberg *et al*, 2006).

Proceso de carcinogénesis

Avances en el área de la biología molecular ha incrementado la sensibilidad en las herramientas que se utilizan para hacer investigación en el área biomédica. Particularmente, en cáncer, se han vinculado una gran cantidad de alteraciones en el

genoma, involucrados en la iniciación y el desarrollo de esta enfermedad. Entre los cambios más comunes, se encuentran las mutaciones que alteran el funcionamiento de ciertos genes relevantes en la homeostasis celular, oncogenes y genes supresores de tumores, donde se ve una ganancia y pérdida en la función de un gen, respectivamente (Hanahan *et al*, 2000).

El proceso de carcinogénesis, en seres humanos, requiere que se den una gran cantidad de pasos antes de la formación de un tumor. Estos se reflejan en las alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a un proceso de transformación progresiva de células humanas normales a células tumorales (Figura 2) (Hanahan *et al*, 2011). Durante el proceso de carcinogénesis, es necesario que se lleven dos pasos fundamentales: iniciación y progresión (Vogelstein *et al*, 1993). En la iniciación, se da un estímulo a la célula el cual puede ser de origen genético (Loeb, 1991) o epigenético (Feinberg *et al*, 2006). Este estímulo, incrementa la tasa de inestabilidad genómica teniendo como consecuencia la generación de más mutaciones (Nowak *et al*, 2002). La progresión consiste en el establecimiento de los cambios que permiten la viabilidad celular y su expansión clonal. El mantenimiento de estos cambios es relevante, ya que estos ofrecen ventajas selectivas sobre otras células que se encuentren en el entorno (Kufe *et al*, 2003).

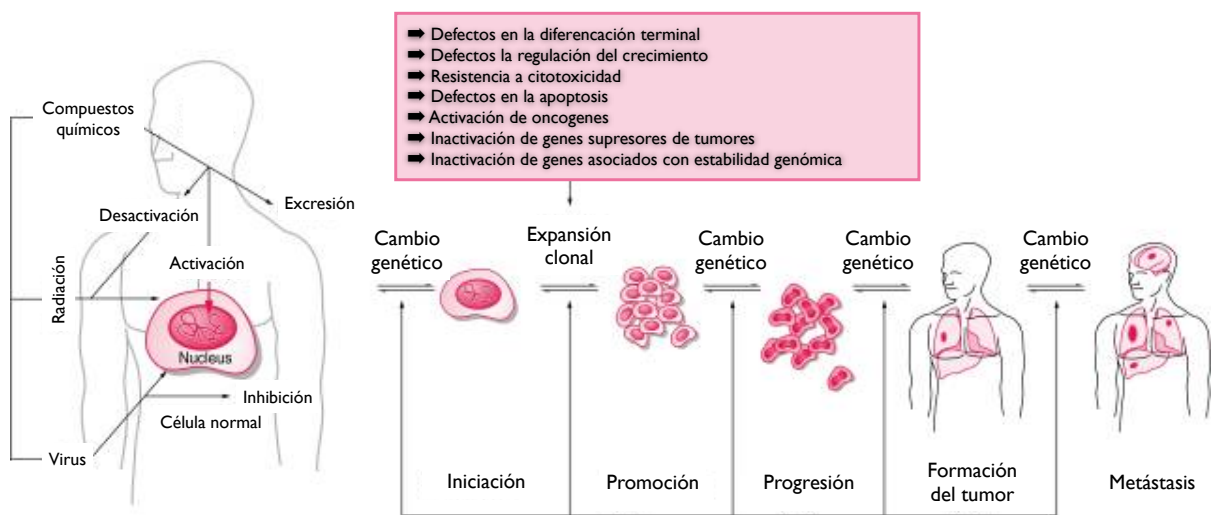


Figura 2. **Proceso de carcinogénesis.** Esquema desglosado de los pasos para que se lleve a cabo un proceso de carcinogénesis: iniciación, progresión, transformación, formación de tumor y metástasis (Modificado de Kufe *et al*, 2003).

Sin embargo, poco se sabe sobre el tipo de modificaciones que lleva a la célula a la carcinogénesis. Las células cancerosas presentan seis adaptaciones fisiológicas que

permite que se de el proceso de transformación celular: producción de señales proliferativas, insensibilidad a señales antiproliferativas, resistencia a la muerte celular, incremento en la habilidad replicativa, angiogénesis, invasión y metástasis (Hanahan *et al*, 2000). Estas adaptaciones son conocidas como los marcadores del cáncer. Actualmente, se han propuesto dos nuevos marcadores como la evasión por destrucción inmune y la desregulación energética a nivel celular, y dos características que facilitan la adquisición de los marcadores: promoción del tumor por inflamación, inestabilidad genómica y mutaciones (Figura 3; Hanahan *et al*, 2011).

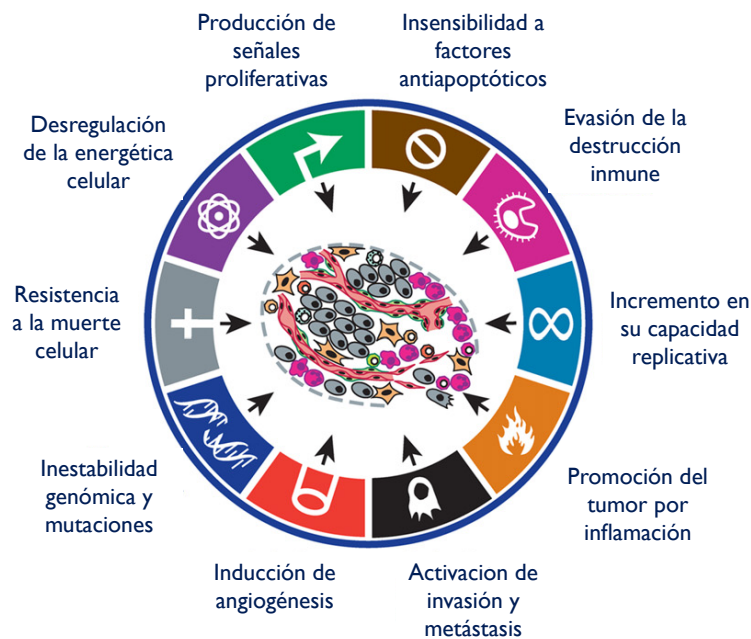


Figura 3. “**Hallmarks del cancer**”. Esquema de los *hallmarks* del cáncer de Hanahah y Weinberg (2011). Procesos fisiológicos que la célula tiene que llevar a cabo para el proceso de carcinogénesis.

Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer

El inicio y desarrollo del cáncer se han asociado a diferentes factores de riesgo, tanto ambientales como genéticos. Los factores de riesgo ambientales tienen otras subclasificaciones: químicos, físicos y biológicos. Mientras que, los factores de riesgo genéticos, se han asociado con predisposición al cáncer en algunos individuos y en otros, la acumulación de mutaciones coincide directamente con el inicio y progresión de esa enfermedad (Balmain *et al*, 2003).

Factores ambientales

Los factores ambientales son capaces de inducir daño en el DNA a través de diferentes mecanismos como rupturas del DNA, desaminación del DNA, formación de dímeros de pirimidinas, alquilación de bases y formación de aductos, entre otros (Lodish *et al*, 2004). Entre la exposición a compuestos químicos más comunes, se encuentra la exposición a humo de tabaco, plaguicidas y bebidas alcohólicas. Los principales factores físicos a los cuales nos encontramos expuestos son los rayos UV y el radón (Irigaray *et al*, 2007). Mientras que, los factores biológicos más relevantes son las infecciones por virus como el virus del papiloma humano, el cual es la causa del 99% de los cánceres cérvico-uterinos a nivel mundial. Otros virus relevantes son el virus del herpes y el virus de la hepatitis C, los cuales son responsables del desarrollo de sarcoma de Kaposi y cáncer de hígado, respectivamente (Herrera *et al*, 2005).

Factores genéticos

Los factores de riesgo genéticos, se han visto involucrados tanto en predisposición al cáncer como con su inicio y progresión (Irigaray *et al*, 2007). El ejemplo más común de predisposición al cáncer es el caso de cáncer de mama familiar. Las pacientes con cáncer de mama familiar constituyen únicamente del 5-10% del total de las pacientes. Un ejemplo particular de genes inactivados en este padecimiento, son *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales se encuentran mutados en un 15-20% de los casos. Estudios en gemelos homocigotos con esta enfermedad demuestran que los factores genéticos predominan sobre los factores ambientales (Balmain *et al*, 2003). Por otro lado, factores genéticos asociados con inicio y progresión del cáncer se refiere a la acumulación de cambios genéticos que le confieren ventajas a una célula a partir de una selección clonal, como se postuló en la hipótesis del fenotipo mutador y la expansión clonal (Bielas *et al*, 2006; Merlo *et al*, 2006).

Factores epigenéticos

Actualmente, también se han asociado factores epigenéticos con el desarrollo del cáncer. Los ejemplos más comunes son la alteración en el estado de metilación del genoma como la hipometilación global y hipermetilación local (Issa, 2004) y cambios en el patrón de las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Esteller, 2011).

Epigenética

Definición de epigenética

En el cuerpo humano, existen aproximadamente 60 trillones de células, cada una contiene 2 metros de DNA genómico contenido dentro del núcleo. ¿Cómo organiza la célula su material genético en el núcleo? ¿Cómo lleva a cabo una correcta regulación en la expresión génica? En 1880, Walter Flemming, observó una sustancia dentro del núcleo que era claramente visible usando las técnicas clásicas de microscopía. Esta sustancia la denominó cromatina (Flemming *et al*, 1965). Años más tarde, se descubrió que esta sustancia era el DNA, la molécula que almacena la información genética de las células. El DNA es un polímero de nucleótidos unidos a un armazón de ribosa-fosfato por enlaces fosfodiéster, a los cuales se le debe su carga negativa (Nelson *et al*, 2008). Por su carga, se sugiere que es necesaria la participación de otras moléculas que ayuden al empacamiento y a la correcta organización del material genético dentro del núcleo. Su adecuado empacamiento es muy relevante, ya que permite una correcta expresión de los genes en un tiempo y espacio definido (Shahbazian *et al*, 2007). Dada su importancia, existe una disciplina que se ha encargado de estudiar su organización y regulación en el núcleo, la epigenética. La epigenética se define como el estudio de los patrones de herencia de actividad de DNA y RNA que no depende en la secuencia desnuda ácidos nucleicos (Esteller, 2011).

Estructura de la cromatina

La cromatina es el conjunto de ácidos nucleicos, DNA y RNA, proteínas de tipo histona y no histona. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por un octámero de histonas denominado núcleo de histonas, el cual pesa 240 kDa (Luger, 2006). Este *core* está formado por dos dímeros de las histonas H2A-H2B y un tetrámero de las histonas H3-H4 (Mellor, 2006). Aproximadamente, 147 pb del DNA se enrollan en el *core* de histonas dando 1.65 vueltas de forma toroidal (Figura 4; Jiang *et al*, 2009).

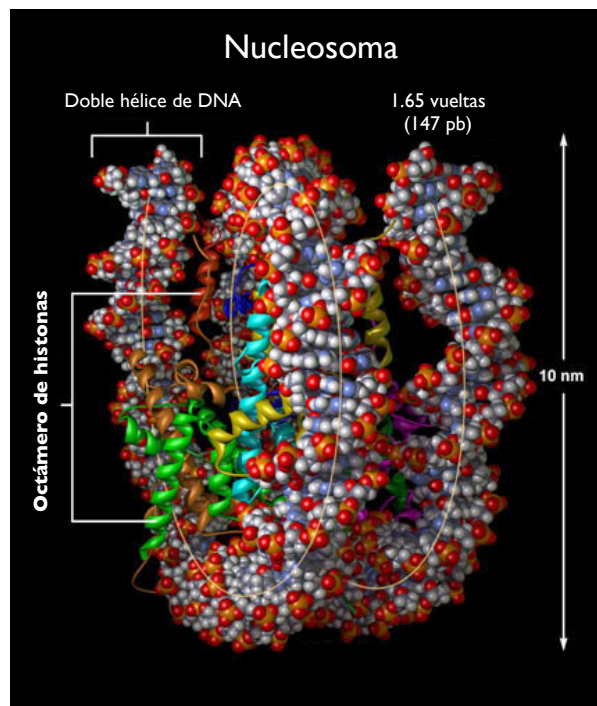


Figura 4. **Estructura del nucleosoma.** La unidad mínima funcional de la cromatina es el nucleosoma. Esta estructura está formada por un octámero de histonas: H2A, H2B, H3 Y H4. Sobre esta estructura se enrollan 147 pb del DNA dando 1.65 vueltas en forma toroidal (Modificado del Linger *et al*, 1997).

Niveles de compactación de la cromatina

Existen diferentes niveles de compactación de la cromatina, lo cual le permite una correcta compactación en el núcleo y un remodelamiento adecuado dependiendo del contexto celular (Li *et al*, 2007). El primer nivel es la estructura de “collar de perlas”, el cual resulta en una compactación de la longitud del DNA de 5 a 10 veces (Felsenfeld *et al*, 2003). Esta estructura se caracteriza por un continuo enrollamiento del DNA a los nucleosomas y una alta accesibilidad de factores transcripcionales y remodeladores de la cromatina, entre otros. Este polinucleótido se compacta en una fibra conocida como solenoide o fibra de 30 nm. Esta estructura se estabiliza con ayuda de una quinta histona, la H1, la cual se une a cada nucleosoma (Felsenfeld *et al*, 2003). En esta estructura, la cromatina se vuelve mucho más compacta, reduciendo su tamaño 50 veces. A este nivel, no hay accesibilidad a factores transcripcionales ni remodeladores de la cromatina. Estos niveles de compactación son muy importantes, ya que llevan a cabo la apertura y cierre de la cromatina relevantes para la regulación transcripcional. Otros niveles de compactación, son la formación de asas cromosómicas relevantes para el estudio de territorios cromosómicos y regulación de la transcripción a nivel de territorios nucleares.

Finalmente, la estructura más compacta es el cromosoma metafásico, cuya grado de compactación es importante al momento de la segregación del material genético (Figura 5; Felsenfeld *et al*, 2003). Sin embargo, para que la cromatina se remodele de esa forma, es necesario que se lleven a cabo modificaciones en la cromatina como cambios post-traduccionales de las histonas, la metilación del DNA, la incorporación de variantes de histonas, el reclutamiento de complejos de remodelamiento de la cromatina (Polycomb y Trithorax) y remodeladores dependientes de ATP (SWI/SNF), entre otros (Allis *et al*, 2006).

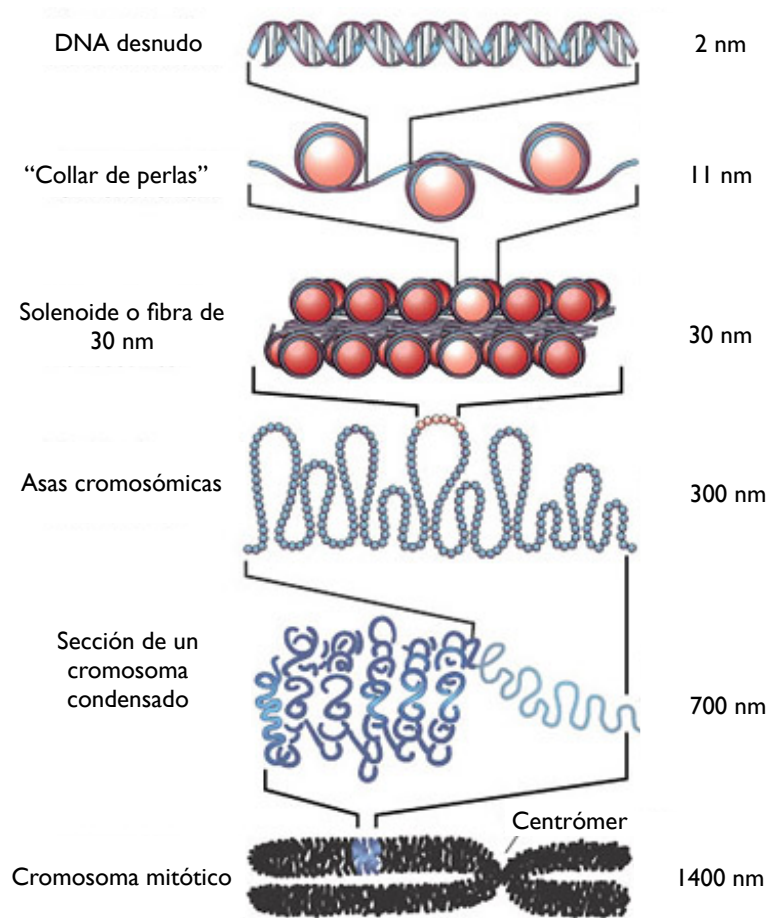


Figura 5. **Niveles de compactación de la cromatina.** La cromatina tiene diferentes estructuras dependiendo de su grado de compactación. El nivel más laxo es el DNA desnudo posteriormente, se encuentra el DNA unido al octámero de histonas formando un nucleosoma, a esta estructura se le conoce como “collar de perlas”. A continuación se encuentra al solenoide o fibra de 30 nm a la cual se le considera una cromatina más compacta conocida como heterocromatina. Así sucesivamente hasta llegar al cromosoma mitótico, el cual es una estructura altamente compacta (Felsenfeld *et al*, 2003).

Modificaciones post-traduccionales de las histonas y su mecanismo de acción

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas se llevan a cabo, principalmente, en el dominio amino terminal (N-ter). Se han descrito diferentes modificaciones en residuos de histonas, entre los cuales destacan acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación y biotilación, entre otras. Los principales residuos que resultan transformados son las lisinas, argininas, serinas y treoninas (Allis *et al*, 2006). Estas marcas pueden encontrarse en combinatoria con otras marcas de histonas sugiriendo la hipótesis del código de histonas. Este código, propone que diferentes modificaciones en los dominios N-ter de las histonas puede inducir interacción con proteínas asociadas a cromatina provocando un cambio biológicamente significativo para la célula. Además, modificaciones en el mismo u otro dominio N-ter puede ser interdependiente y generar varias combinatorias en un mismo nucleosoma. En la tabla 1, se presentan algunas modificaciones de histonas y su participación en la transcripción:

Modificación	Papel en la transcripción	Sitios de modificación
Acetilación	Activación	H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8, K12, K16) H2A H2B (K6, K7, K16, K17)
Metilación	Activación	H3 (K4me2, K4me3, K36me3, K79me2)
	Represión	H3 (K9me3, K27me3) H4 (K20me3)
Fosforilación	Activación	H3 (S10)

Tabla 1. Modificaciones post-traduccionales de las histonas y su papel en la transcripción.

Acetilación de histonas

La acetilación de histonas es una modificación de histonas asociada a activación transcripcional (Allis *et al*, 2006). En esta modificación, se incorpora un grupo acetilo (-COCH₃) en los dominios N-ter de las histonas. De esta forma, se reduce la carga positiva de las histonas, provocando una menor interacción con el DNA y una disminución en el grado de compactación de la cromatina (Figura 3; Shahbazian *et al*, 2007).

Particularmente, la acetilación de la histona H4 tiene un papel determinante en el plegamiento de la cromatina *in vitro*. La estructura cristalográfica del nucleosoma reveló que el dominio N-ter de esta histona tiene una gran cantidad de residuos básicos (residuos 16-25). Por lo cual, su acetilación es suficiente para provocar un perfil de desnaturalización del nucleosoma (Figura 6A) convirtiendo la cromatina accesible a factores y a la maquinaria transcripcional (Bell *et al*, 2011).

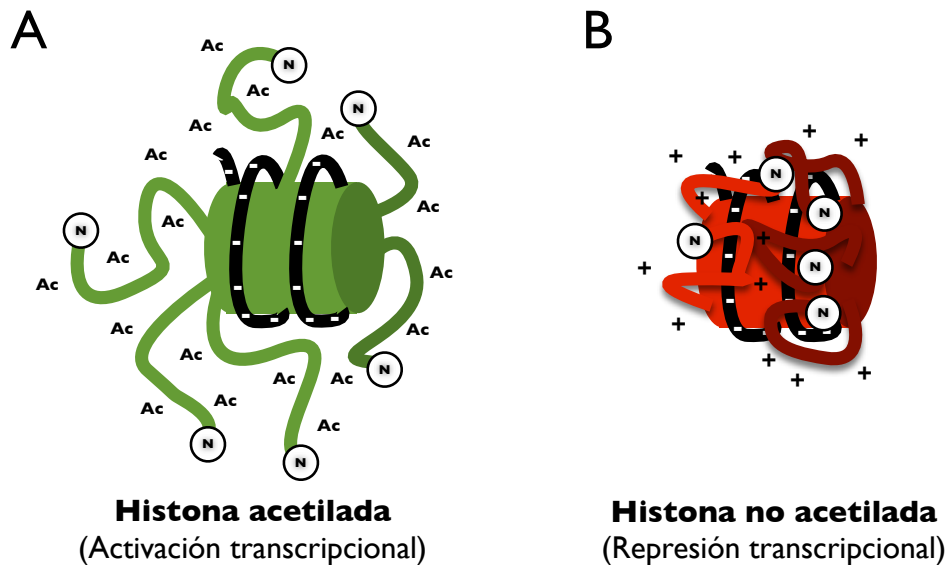


Figura 6. **La acetilación de histonas.** Interacción de los dominios N-ter (N) con el DNA en histonas acetiladas (A) e histonas no acetiladas (B). En A, se observa que los dominios N-ter tienen una menor interacción con el DNA (líneas negras) en comparación con B, donde las cargas positivas a las histonas son atraídas por las cargas negativas del DNA.

Metilación de histonas

La metilación de las histonas está asociada con múltiples procesos, entre ellos la activación y represión transcripcional, dependiendo del aminoácido que sea modificado. Esta modificación ocurre en residuos de lisinas y argininas. Además, pueden sufrir múltiples metilaciones en un mismo residuo, dificultado su análisis. Las lisinas pueden mono- (me1), di- (me2) y tri- (me3) metilarse, mientras que las argininas pueden mono- (me1) y di- (me2) metilarse (Allis *et al*, 2006).

Los residuos metilados de histonas asociados con apertura de la cromatina son la H3K4, H3K36 y H3K79. Sin embargo, la metilación de estos residuos se han relacionado con funciones específicas. La H3K4, se ha asociado a regiones promotoras cuando se

encuentra trimetilada (H3K4me3). Mientras que, la monometilación de la H3K4 se asocia con *enhancers*. La dimetilación de la H3K36 (H3K36me2) se ha relacionado con la elongación de la RNA polimerasa II durante la transcripción (Li *et al*, 2007). Mientras que, la dimetilación de la H3K79 (H3K79me2), se encuentra enriquecida en regiones promotoras y se ha asociado con el mantenimiento de una cromatina permisiva a la transcripción local (Jacinto *et al*, 2009).

Por el contrario, las metilaciones de histonas asociadas a represión transcripcional se llevan a cabo, principalmente, en la H3K9 y H3K27. La H3K9me3 está asociada con regiones de heterocromatina constitutiva como las regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas. Mientras que la H3K27me3, se encuentra en regiones de heterocromatina facultativa, esta marca es capaz de reclutar al complejo de Polycomb y cambiar la estructura de la cromatina a un estado más compacto (Baylin *et al*, 2011).

Histona	Residuo	Función
H3	K4	Apertura de la cromatina en regiones promotoras y enhancers.
	K9	Silenciamiento de regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas.
	K27	Represión transcripcional por el reclutamiento del complejo Polycomb.
	K36	Apertura de la cromatina durante la elongación de la transcripción.
	K79	Apertura de la cromatina en regiones promotoras y reparación del DNA.
H4	K20	Represión transcripcional por el reclutamiento del complejo Polycomb, heterocromatina pericentromérica e inactivación del cromosoma X en mamíferos.

Tabla 1. **La metilación de histonas en residuos de lisinas.** Modificaciones post-traduccionales de la histonas asociadas con apertura y cierre de la cromatina

Variantes de histonas

Variantes de las histonas H2A y H3 han sido conocidas desde hace varias décadas. Sin embargo, recientemente, se ha acumulado evidencia de que estas se asocian directamente con algunos niveles de compactación de la cromatina (Henikoff *et al*, 2004). Entre ellas, se encuentra la H2A.Z. Esta proteína se localiza en regiones de activación transcripcional, principalmente, en regiones promotoras. Esta histona es de gran

importancia, debido a que tiene una estructura menos estable que la H2A canónica, permitiendo la formación de una cromatina con un bajo grado de compactación (Draker *et al*, 2009). Otra variante de histona asociada a regiones promotoras, es la H3.3. Esta variante al igual que la H2A.Z, se encuentra enriquecida en regiones promotoras. Estas dos variantes de histonas se encuentran generalmente juntas en un nucleosomas en promotores génicos (Jin *et al*, 2009).

Variantes de histonas	Estructura	Localización	Función	Referencia
H2A.Z	Estructura menos estable a la histona H2A canónica.	Regiones promotoras	Activación transcripcional	Jin <i>et al</i> , 2007
MacroH2A	El dominio C-ter es diferente al de la histona H2A canónica.	Cromosoma X	Inactivación del cromosoma X	Gamble <i>et al</i> , 2010
H2A-Bbd	Presenta el 48% de identidad con la H2A canónica.	Deficiente en el cromosoma X	Activación transcripcional	Chadwich <i>et al</i> , 2001
CENP-A	Mantiene la cromatina en un estado más compacto que la H3 canónica.	Regiones centroméricas	Mantiene la estructura del centrómero más compacta y sirve para el reconocimiento de la región centromérica.	Tachiwana <i>et al</i> , 2011
H3.3	Cuatro aminoácidos diferentes a la H3 canónica	Regiones asociadas a transcripción	Activación transcripcional	Jin <i>et al</i> , 2007

Tabla 2. **Variantes de histonas.** Comparación en la estructura, la localización y la función de algunas variantes de histonas.

Metilación del DNA

Características de la metilación del DNA

En mamíferos, la metilación del DNA es la unión covalente de grupos metilo en las citosinas que se encuentran en contexto de dinucleótido 5'-CpG-3' (Figura 7A; Klose *et al*, 2006). La adición de grupos metilo sobresale del surco mayor y cuando el DNA se

encuentra simétricamente metilado, los grupos metilo se encaran ocasionando cambios en la conformación en la estructura del DNA. La principal consecuencia de esta modificación es alterar el reconocimiento de algunas secuencias por parte de factores transcripcionales (Prokhortchouk *et al*, 2008).

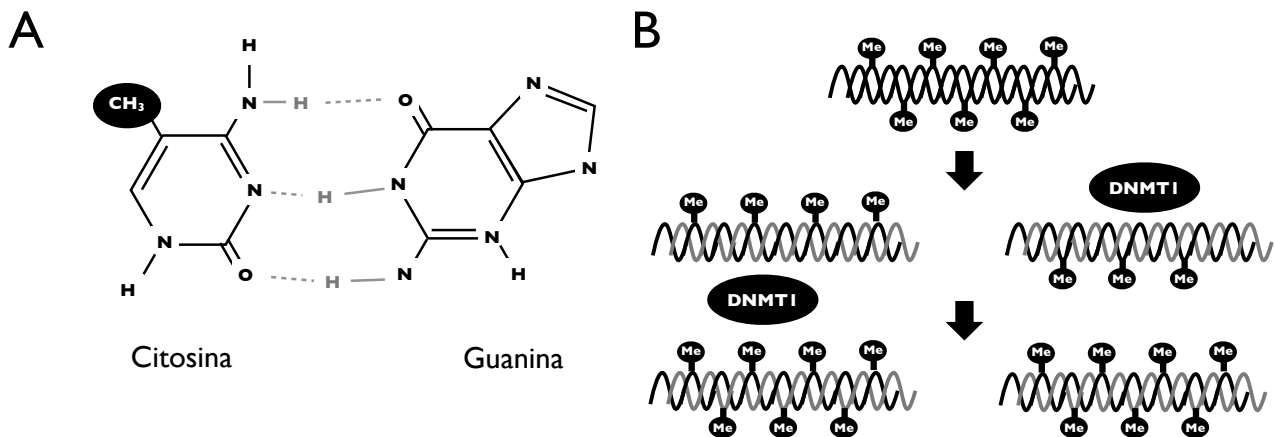


Figura 7. **Metilación del DNA.** (A) Se observa el sitio de metilación en el carbono 5 de la citosina, esto en contexto de dinucleótido 5'-CpG-3'. (B) Se muestra cómo se lleva a cabo el mantenimiento de la metilación por la DNMT1 cuando se replica el DNA.

Metilación del DNA de mantenimiento y *de novo*

La metilación del DNA genera patrones que se establecen durante el desarrollo embrionario y se mantienen por un mecanismo de copiado cuando se replica el DNA (Figura 7B). Estos patrones de metilación cambian a lo largo del tiempo, principalmente debido a múltiples factores ambientales como la dieta y la exposición a compuestos químicos (Fraga *et al*, 2005). El mecanismo de metilación del DNA, lo llevan a cabo las DNA metiltransferasas (DNMTs). Existen dos grupos de DNMTs dependiendo del sustrato de DNA: las de mantenimiento y las *de novo*. La DNMT de mantenimiento es la DNMT1, esta adiciona grupos metilo a patrones de metilación pre-existentes en una nueva hebra de DNA durante la replicación (Figura 7B; Jeltsch, 2006). Las DNMT's *de novo*, son la DNMT3a y DNMT3b, estas son responsables de la adición de grupos metilo a las citosinas que no habían sido previamente metiladas (Goll *et al*, 2005). Existen otras dos DNMT, la DNMT2, la cual *in vitro* muestra una actividad de DNA metil transferasa débil y su delección no muestra efectos significativos en la metilación global de células progenitoras embrionarias (Jeltsch *et al*, 2006). Por otro lado, la DNMT3L es una DNMT

que no presenta actividad de DNA metil transferasa, pero se asocia físicamente con la DNMT3a y DNMT3b, modulando su actividad catalítica (Prokhortchouk *et al*, 2008).

Modelos de represión transcripcional

Una de las principales consecuencias de la metilación del DNA es la represión transcripcional. Sin embargo, no se conoce a profundidad el mecanismo de acción de la metilación del DNA sobre la maquinaria transcripcional (Weber *et al*, 2007). Se han propuesto varios modelos, entre ellos se encuentran los siguientes:

- Bloqueo de factores transcripcionales: los cambios en la estructura del DNA no permiten que factores transcripcionales reconozcan su secuencia de unión y de esta forma se inhiba la transcripción (Figura 8A)
- Reclutamiento de co-represores por las MBP: el DNA metilado es reconocido por proteínas con dominio de unión a DNA metilado y estas reclutan represores de la transcripción (Figura 8B).
- DNMTs y reclutamiento de remodeladores de la cromatina: las proteínas que metilan el DNA vienen asociadas de otros complejos remodeladores de la cromatina que convierten ese sitio inaccesible a la maquinaria transcripcional (Figura 8C).
- Interrupción de la elongación de la transcripción: la RNA polimerasa inhibe la transcripción porque existen proteínas reclutadas por el DNA metilado en el cuerpo del gen que no permiten que la RNA polimerasa II se elongue (Figura 8D).

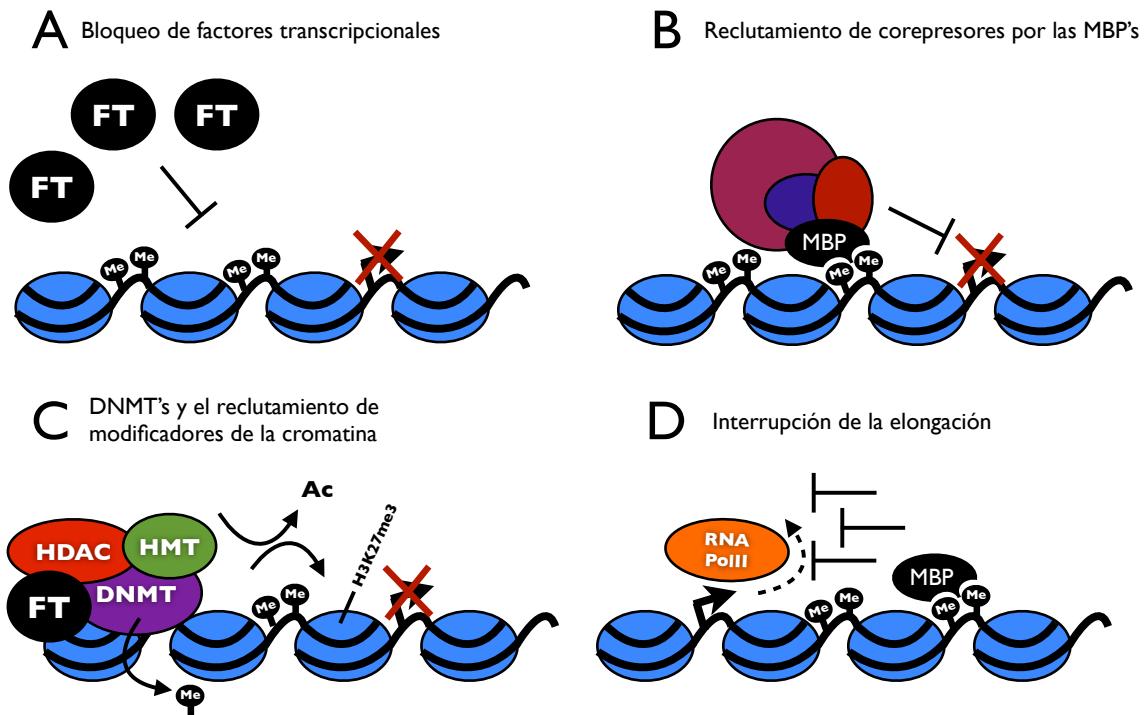


Figura 8. **Modelos de represión transcripcional mediados por metilación del DNA.** Modelos propuestos de cómo la metilación del DNA afecta la transcripción génica: (A) La metilación ocasiona un cambio conformacional en la estructura del DNA lo cual provoca que factores de transcripción no reconozcan su secuencia de unión. (B) Proteínas con dominio de reconocimiento de los grupos metilo (MBP) reclutan a otros remodeladores de la cromatina que reprimen la transcripción. (C) Las DNMTs encargadas de la adición de los grupos metilo vienen acompañadas de otros complejos reguladores de la cromatina como HMTs y HDACs, los cuales remodelan la cromatina haciéndola inaccesible a factores de transcripción. (D) Las citosinas metiladas en el cuerpo del gen interrumpen la elongación de la transcripción.

Papel de la metilación del DNA en cáncer: Modelo del fenotipo metilador

Una de las principales características del cáncer, es que existe una alteración en la metilación global del genoma. A nivel local, existe una hipermetilación de promotores y de islas CpG específicas (Issa JP, 2004). Sin embargo, en cáncer de colon, existe evidencia de que el fenotipo mutador afecta directamente en la metilación del DNA. El grupo de Jean Pierre Issa, analizó los patrones de metilación en diferentes clones de cáncer de colon y encontraron lo que actualmente conocemos como el fenotipo metilador. Este fenotipo, se encontró asociado con la inactivación de múltiples genes supresores de tumores como *p16* y la inducción en la deficiencia de la maquinaria de reparación de desapareamiento de bases, a través de la inactivación de hMLH1. Esta alteración en el estado de metilación resultó ser tejido específica y se encontró principalmente en tumores de origen espontáneo (Toyota *et al*, 1999).

Las isla CpG

Definición e importancia de las islas CpGs

En el genoma humano, se han encontrado secuencias de DNA no metilado, conocidas como islas CpG. Las islas CpG fueron descubiertas en los años 80s por el grupo de Adrian Bird, cuando digirieron DNA genómico de ratón usando enzimas sensibles a la metilación y sus isoesquizómeros no sensibles. A partir de esto, se encontró que una pequeña parte del genoma estaba altamente fragmentada, lo cual sugirió que había regiones ricas en CpG y que no se encontraban metiladas (Bird *et al*, 1985; Illingworth *et al*, 2009). Las islas CpG se caracterizaron por tener una longitud de al menos 200 pb con un contenido de C+G del 50% y una frecuencia de CpGs (observado/esperado) de 0.6 (Illingworth *et al*, 2009). Además, se ha demostrado que del 60 al 70% de los promotores se encuentran embebidos en estas regiones (Weber *et al*, 2007). Las islas CpG colocalizan con la maquinaria de los promotores de genes que se expresan constitutivamente y aproximadamente en el 40% de los genes que tienen una expresión tejido específica (Illingworth *et al*, 2009).

Tipos de las islas CpGs por su localización genómica

Existen diferentes tipos de islas CpG de acuerdo a su localización en el genoma: las islas CpG localizadas en regiones asociadas con el sitio de inicio de la transcripción (TSS), regiones intragénicas o cuerpos del gen y regiones intergénicas (Figura 9). Aproximadamente, el 50% de las islas CpG se ha asociado TSS ya descritos, este tipo de islas es relevante porque una de sus principales funciones es la regulación en la expresión del gen cercano (Illingworth *et al*, 2010). Recientemente, las islas CpG localizadas en regiones intragénicas, se han asociado con la regulación del proceso de corte y empalme del RNA conocido como “*splicing*” (Anastasiadou *et al*, 2011). Mientras que, las islas CpG localizadas en regiones intergénicas no se conoce su función hasta el momento, se cree que tienen funciones estructurales, pero no hay evidencia sólida.

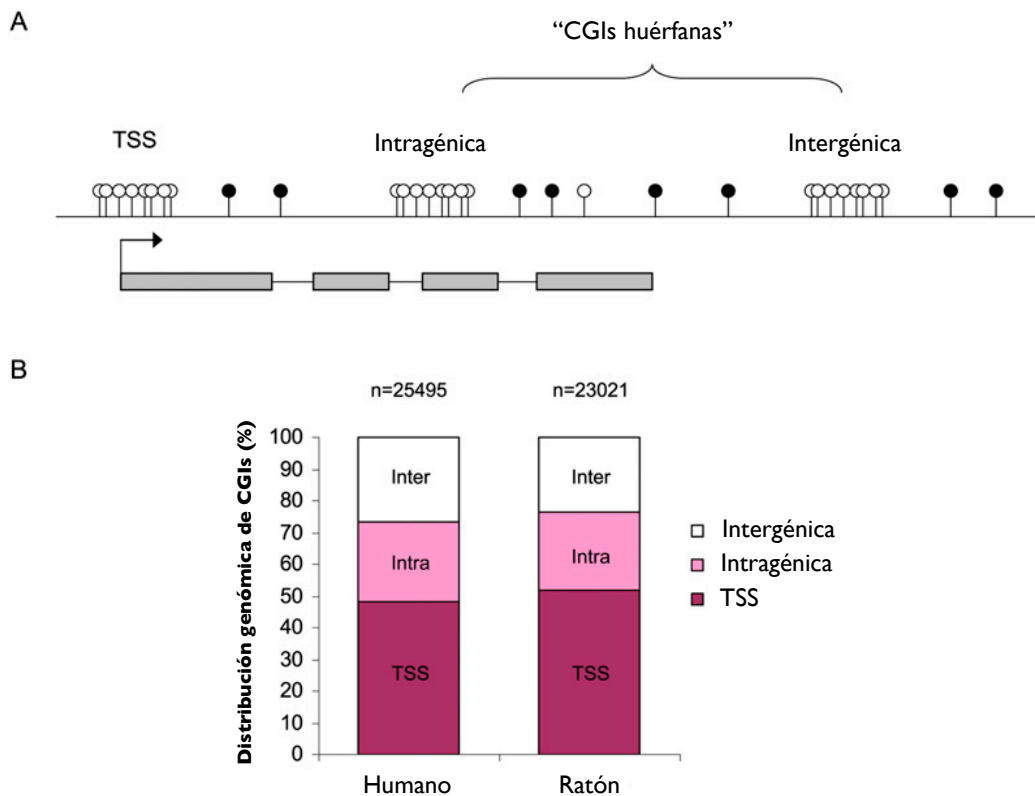


Figura 9. **Distribución genómica de islas CpG.** (A) Las islas CpG pueden localizarse en sitios de inicio de la transcripción, cuerpos génicos y regiones intergénicas donde no se conoce su función. Se muestran las citosinas metiladas (círculos rellenos) y no metiladas (círculos vacíos) en condiciones normales. (B) Distribución genómica en humano y ratón muestran la conservación en porcentajes de los tipos de islas CpGs (Illingworth *et al*, 2010).

Regiones promotoras

Definición de un promotor

La correcta ejecución de procesos biológicos como el desarrollo, la proliferación y la apoptosis requiere una precisa y cuidadosa regulación espacio-temporal de la expresión génica. En organismos eucariontes, la transcripción es regulada a diferentes niveles. Siendo la iniciación uno de los pasos cruciales donde hay una mayor regulación (Maston *et al*, 2006). Los genes que codifican para proteínas y microRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II), estos genes, generalmente, contienen dos elementos reguladores de la transcripción que actúan en *cis*:- el promotor y elementos reguladores distales.

El promotor está compuesto por dos secciones: el núcleo y la región proximal. El núcleo del promotor es la secuencia mínima necesaria para que el complejo preiniciador

de la transcripción (PIC) sea reclutado (Butler *et al*, 2002). Esta secuencia abarca el sitio de inicio de la transcripción y se extiende ~35 nucleótidos río arriba y río abajo. Por otro lado, el promotor proximal se encuentra inmediatamente cercano al sitio de inicio de la transcripción (entre -250 a +250 nucleótidos con relación al TSS). En este sitio, se reclutan factores de transcripción específicos, activadores y represores. Existen otros reguladores distales de la transcripción como los silenciadores, enhancer, insulators y las regiones de control del locus (LCR) (Figura 10; Maston *et al*, 2006).

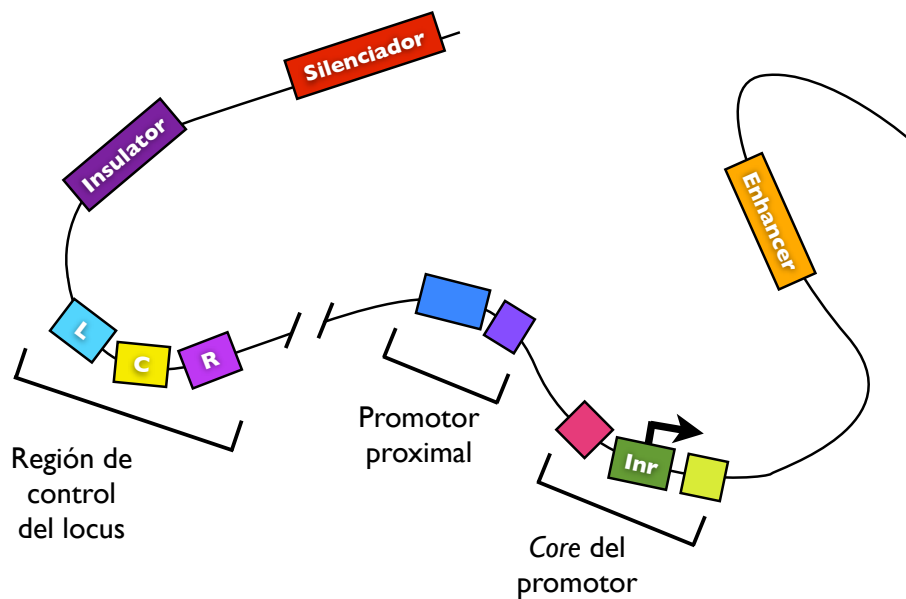


Figura 10. **Elementos reguladores de la transcripción.** Los principales elementos reguladores de la transcripción son el *core* del promotor, lugar donde se recluta a la maquinaria transcripcional y el promotor proximal, sitio de reclutamiento de factores transcripcionales. Existen otros reguladores que se encuentran lejos al sitio de inicio de la transcripción, como los silenciadores, enhancers, insulators y las regiones de control del locus (LCR).

Identificación de un promotor a partir de elementos en *cis*-

El núcleo del promotor es la secuencia que sirve como andamiaje para que se ancle la polimerasa e inicie la transcripción. Para que la RNA Pol II, reconozca este sitio, existen elementos en *cis*- que ayudan al reclutamiento de los factores transcripcionales generales y al resto de la maquinaria transcripcional (Maston *et al*, 2006). Entre los elementos que destacan, se encuentra la secuencia iniciadora (Inr), la caja TATA, el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE) y el elemento regulador río abajo del promotor (DPE) (Figura 11) (Suzuki *et al*, 2001).

El motivo Inr, es donde se encuentra embebido el TSS. Ensayos funcionales, determinaron que en seres humanos, la secuencia consenso es YYANWYY, siendo A el nucleótido +1 (Juven-Gershon *et al*, 2008). Las cajas TATA fueron el primer motivos descubierto que poseían los promotores eucariontes. La secuencia consenso de este motivo es TATAAA. En humanos, se encontró que el 32% de 1031 promotores analizados contienen una caja TATA (Suzuki *et al*, 2001). El elemento BRE, en un principio se identificó como la secuencia próxima a la caja TATA donde se une el factor de transcripción TFIIB (Juven-Gershon *et al*, 2008). Mientras que, el elemento DPE se localiza río abajo del TSS (+28 a +30), se ha encontrado en el 50.6% de los promotores (Yang *et al*, 2008).

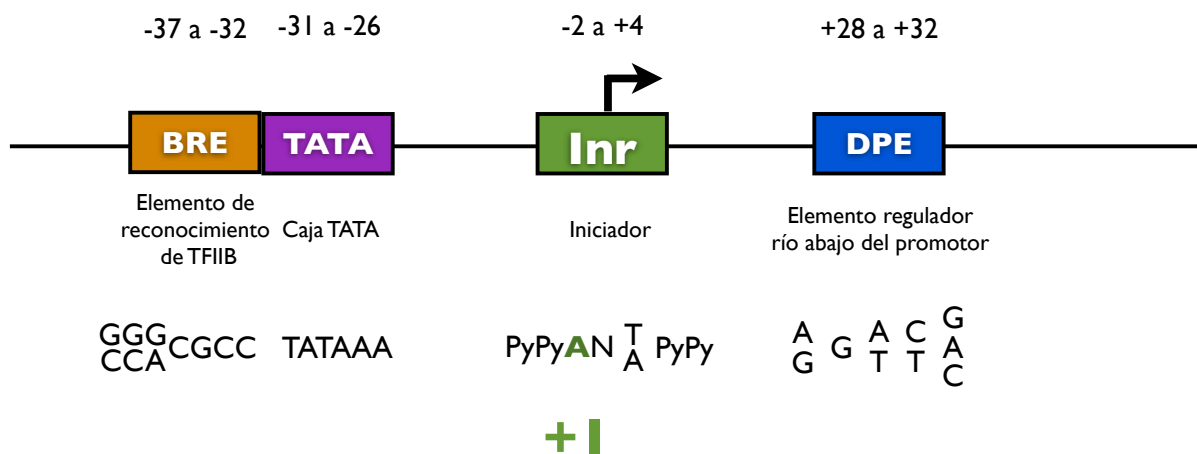


Figura 11. **Elementos del core del promotor.** Elementos en *cis*- relevantes para el reconocimiento de los sitios de anclaje de la RNA polimerasa II. Elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE) (naranja), caja TATA (morado), secuencia iniciadora (Inr) (verde) y elemento regulador río abajo del promotor (DPE) (azul).

Componentes epigenéticos asociados a regiones promotoras

La arquitectura de la cromatina en regiones promotoras se caracteriza por tener regiones libres de nucleosomas flanqueada por las variantes de histonas H3.3 y H2A.Z (Hartley *et al*, 2009). Estas variantes de histonas presentan poca estabilidad en comparación con la H3 y H2A.Z canónicas (Jin *et al*, 2007). Esta estructura particular, facilita la accesibilidad de la RNA Polimerasa II para que inicie la transcripción.

Otros elementos epigenéticos que se han asociado con apertura de la cromatina y activación transcripcional son algunas modificaciones post-traduccionales de las histonas

como la acetilación de histonas y la H3K4me3 (Li *et al*, 2007). Otro elemento característico, mas no fundamental, es la presencia de una isla CpG (Figura 12; Weber *et al*, 2007).

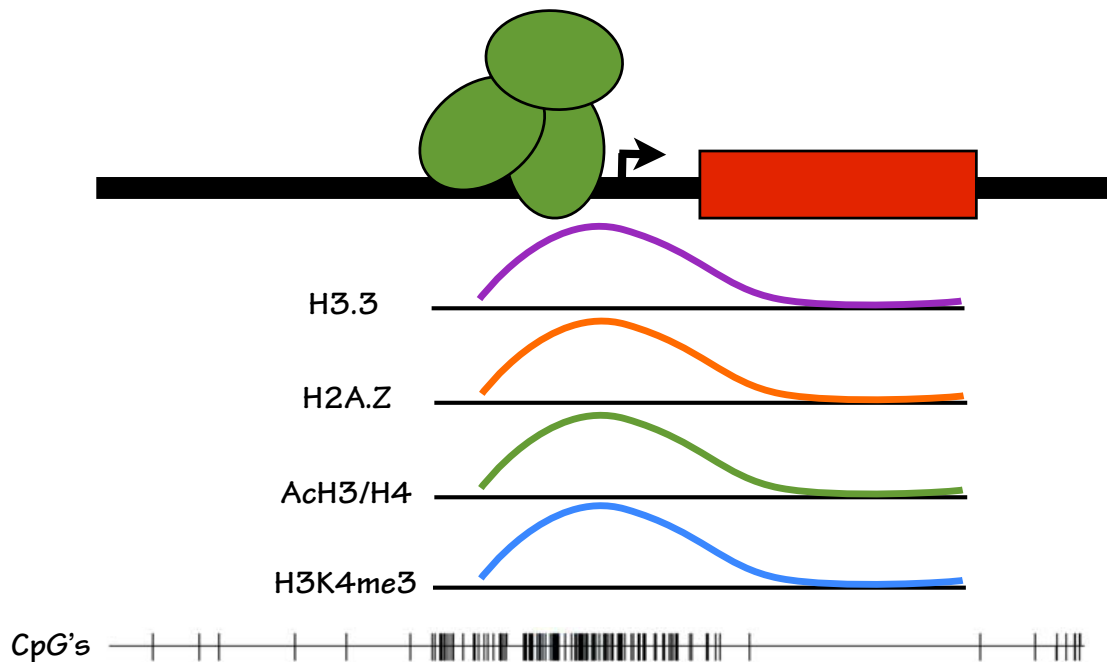


Figura 12. **Elementos epigenéticos del promotor.** En la parte superior, se representa al promotor y al sitio de inicio de la transcripción de un gen. Mientras que, en la parte inferior, se observa la incorporación de las variantes de histonas H3.3 y H2A.Z en el TSS, además de un enriquecimiento en la acetilación de H3/H4 y la H3K4me3. La localización de este TSS, también coincide con una isla CpG.

Tipos islas CpG y su asociación con promotores

Los promotores se pueden caracterizar dependiendo de la densidad de la isla CpG en la que se encuentren embebidos: alta, intermedia y baja densidad. Los promotores de alta densidad se encuentran representados en el 65% de los promotores totales. Se caracterizan por no encontrarse metilados en condiciones normales y su represión se da, principalmente, por metilación del DNA. Los promotores de baja densidad, por el contrario, representan el 23% de los promotores totales y, generalmente, se encuentran hipermetilados. Sin embargo, esta metilación no afecta sus niveles de expresión, la represión génica en este caso, la llevan a cabo las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Por último, los promotores de intermedia densidad representan el menor porcentaje de los promotores totales, el 12%. Estos promotores han sido muy poco caracterizados. La represión transcripcional de estos genes, es responsable tanto de la

metilación del DNA como de las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Figura 13; Weber et al, 2007).

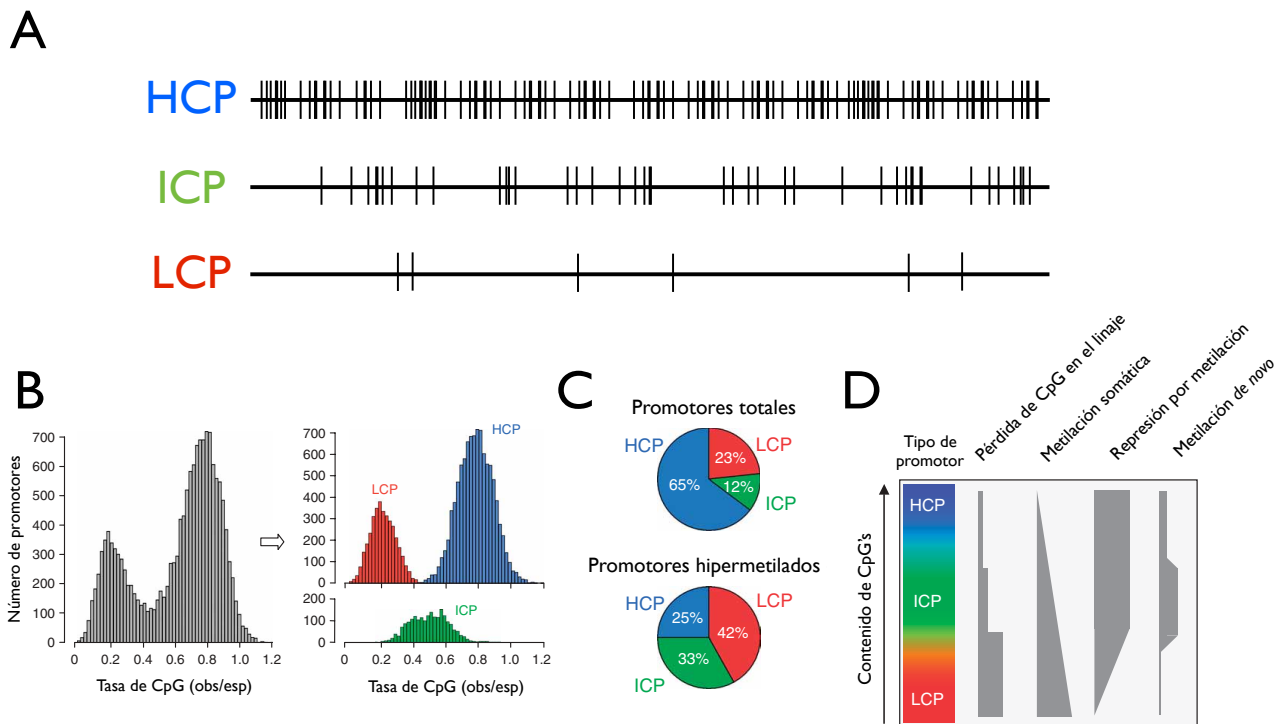


Figura 13. **Clasificación de promotores asociados a islas CpG.** (A) Los promotores asociados a islas CpG se pueden clasificar, dependiendo en su densidad de CpGs, en tres: altas (HCP) (letras azules), intermedias (ICP) (letras verdes) y bajas (LCP) (letras rojas). Las líneas horizontales representan una secuencia y las verticales un dinucleótido CpG. (B) Número de promotores en relación a la tasa de CpGs en humanos sanos. En la figura de la izquierda (barras grises) se muestra el total, mientras que, en la figura de la derecha se muestran clasificadas su densidad de CpGs. (C) Porcentaje de promotores totales y promotores hipermetilados en relación con su tasa de CpGs en condiciones normales. (D) Características funcionales de los promotores asociados a islas CpG en condiciones normales.

Los microRNAs (miRNAs)

Definición de miRNAs

Los miRNAs son transcritos endógenos de 18-22 nucleótidos de RNA no codificante capaces de regular la expresión génica en organismos eucariontes (Meister *et al*, 2004). Particularmente, estas secuencias se encuentran presentes en el genoma a diferencia de otros RNAs pequeños (Shabalina *et al*, 2008). Estos miRNAs se aparean en el extremo 3' del RNA mensajero (mRNA) blanco e inducen inhibición en la traducción y su degradación (Lujambio *et al*, 2007). Se han descrito más de 500 miRNAs en mamíferos de los cuales se sabe que cada uno podría regular a más de 100 mRNAs blanco. Esto sugiere que una gran parte del transcriptoma (50% en humanos) podría estar regulado por miRNAs

(Huntzinger *et al*, 2011). Por tal motivo, los miRNAs juegan un papel importante en diversos procesos biológicos como desarrollo, proliferación celular, diferenciación y apoptosis, entre otros (Slezak-Prochazka *et al*, 2010).

Biogénesis de los miRNAs

Los genes de miRNAs se regulan de manera específica. Se derivan de una enorme unidad transcripcional (>0.5 kb), denominada pri-miRNA. Estos se transcriben por la RNA Pol II y sufren modificaciones post-transcripcionales como *capping* y poliadenilación del extremo 3' (Cai *et al*, 2004). Sin embargo, existen algunos casos en los que los pri-miRNAs son transcritos por la RNA Pol III (Borchert *et al*, 2006).

Una vez transcritos, los pri-miRNAs son procesados por un complejo Microprocesador compuesto por las proteínas DGCR8/Pasha (proteína de unión a RNA de doble cadena) y DROSHA (RNAsa tipo III) para formar un tallo-asa de 60-70 nucleótidos dejando 2 nucleótidos extra en el extremo 3', a esto se conoce como pre-miRNA. Posteriormente, son exportados al citoplasma por la exportina 5 (XPO5), un transportador dependiente de Ran-GTP (Gesteland *et al*, 2006).

En el citoplasma, DICER reconoce al pre-miRNA por los 2 nucleótidos extra del extremo 3' y corta en las regiones cercanas al asa dejando un dúplex de RNA. Una de estas cadenas se ensambla al complejo RISC, mientras que la otra cadena. Al complejo del RNA con el complejo RISC se le conoce como microRNA maduro (Gesteland *et al*, 2006) (Figura 14).

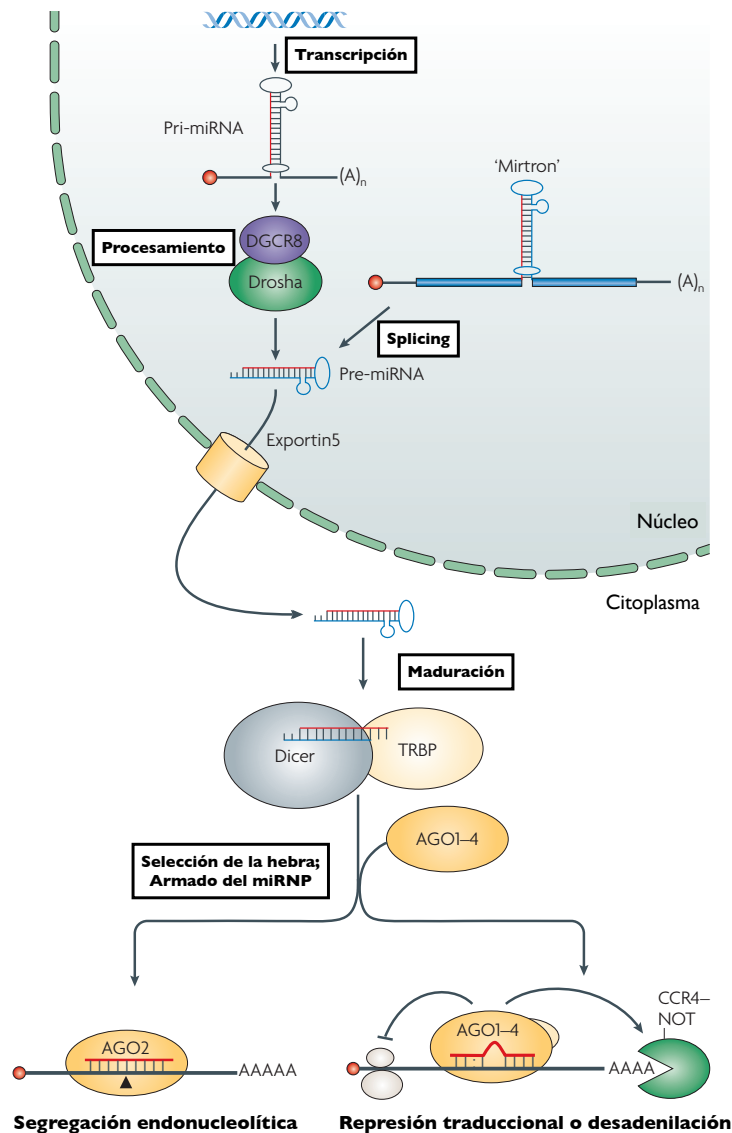


Figura 14. **Biogénesis de los miRNAs.** El procesamiento de los miRNAs se da a partir de la transcripción de una región muy amplia de DNA, a este transcrito se le conoce como pri-miRNA. Posteriormente, es procesado por una RNAsa tipo III conocida como DROSHA dejando un fragmento de RNA de aproximadamente 70 nucleótidos, a este fragmento se le conoce como pre-miRNA. A continuación es exportado al citoplasma por la exportina 5 (Exportin5) y procesado por otra RNAsa tipo III conocida como DICER1 dejando un fragmento de 18-22 nucleótidos, aquí es cuando se le conoce como miRNA. Finalmente, este fragmento de RNA se acopla a un complejo proteico conocido como RISC el cual puede afectar la expresión de otros genes a partir de la inhibición de la traducción o la segregación de mRNAs. (Modificado de Filipowicz *et al*, 2008)

Clasificación de miRNAs

Existen diferentes miRNAs dependiendo de su localización en el genoma, los que se encuentran en regiones intrónicas, los genes localizados en grupos y los genes autónomos (Liang *et al*, 2007).

Los genes de miRNAs localizados en regiones intrónicas representan el 80% del total de los miRNAs (Kim *et al*, 2007). Estos muestran una expresión coordinada con los genes en los que se encuentran hospedados (Rodríguez *et al*, 2004). Los genes localizados en grupos se encuentran a una distancia aproximada de 50 kb de si mismos y, generalmente, se encuentra co-expresándose. Se han encontrado 175 miRNAs en 24 tejidos diferentes con estas características (Baskerville *et al*, 2005). Siendo el grupo *miR-196b/miR-10a/miR-196a-2/miR10b* localizado en el conjunto de genes Hox, uno de los más representativos (Mansfield *et al*, 2004). Por último, los genes de miRNAs que se encuentran de forma autónoma, generalmente, se encuentran en sitios frágiles del genoma como sitios de pérdida de heterocigocidad, regiones de amplificación o puntos de rompimiento (Cain *et al*, 2004). La transcripción de este tipo de genes ha sido poco caracterizada, por tal motivo, es necesario ahondar más en sus mecanismo de regulación.

Niveles de expresión de los miRNAs

La mayoría de los miRNAs presentan un perfil de expresión tiempo y tejido específico. Sin embargo, se han reportado 15 miRNAs que se expresan de forma constitutiva en diferentes tejidos. Dado a su expresión, se sospecha que estos miRNAs están relacionados con funciones básicas como el metabolismo (Liang *et al*, 2007). Se ha encontrado que la transcripción de genes localizados en regiones intrónicas, correlaciona con la expresión del gen en el que se encuentran hospedados (Liang *et al*, 2007). Por otro lado, los genes que se encuentran formando grupos y los que se encuentran de forma autónoma, no han sido completamente caracterizados. Estudios recientes, demuestran que miRNAs que presentan actividad de gen supresor de tumores cercanos a islas CpG, pueden reprimirse por la metilación de la misma, similar a lo que sucede con genes que codifican para proteínas (Lujambio *et al*, 2007),

miRNAs con actividad de oncogenes y genes supresores de tumores

Los miRNAs son capaces de regular diferentes genes blanco y se ha demostrado que su desregulación es un evento primordial para el desarrollo del cáncer (Hanahan *et al*, 2011). Actualmente, son de gran relevancia, ya que se les ha asociado con actividad de oncogenes y genes supresores de tumores dependiendo del blanco que regulen (Li *et al*, 2010). De forma interesante, se ha encontrado que algunos miRNAs, pueden tener

ambas funciones, dependiendo del contexto en el que se encuentren (Shenouda *et al*, 2009).

El microRNA *miR-125b1*

Características del *miR-125b1*

El gen del *miR-125b1*, por su localización en el genoma, es un gen que se encuentra como gen autónomo. Se localiza en el cromosoma 11q24.1 y entre sus principales funciones está la regulación de genes involucrados en el ciclo celular (Le *et al*, 2009), apoptosis (Xia *et al*, 2009) y proliferación celular (Bueno *et al*, 2011). Este miRNA tiene como blancos reportados a genes como *p53* (Le *et al*, 2009), *BAK1* (Zhou *et al*, 2010), *ERBB2* y *ERBB3* (Scott *et al*, 2007) y factores transcripcionales como *EST1* (Zhang *et al*, 2011) y *Myc* (Bueno *et al*, 2011), entre otros.

El *miR-125b1*, a diferencia de otros miRNAs, muestra altos niveles de expresión en diferentes tejidos a diferencia de genes de la familia de *let-7*, los cuales tienen niveles bajos de expresión y únicamente se sobreexpresan en patologías como el cáncer (Shell *et al*, 2007). Se ha demostrado que existe un decremento significativo en los niveles de expresión del *miR-125b1* en diferentes tipos de cáncer como mama, ovario, vejiga, glioma y osteosarcoma, entre otros (Hannafon *et al*, 2011; Guan *et al*, 2011; Huang *et al*, 2011; Xia *et al*, 2009; Liu *et al*, 2011). Por otro lado, también se ha visto un incremento significativo en otros tipos de cáncer como próstata (Shi *et al*, 2007), tiroides (Vriens *et al*, 2011) e hígado (Liang *et al*, 2010) (Figura 15). A su vez, se ha descrito que tiene como blanco a oncogenes y genes supresores de tumores.

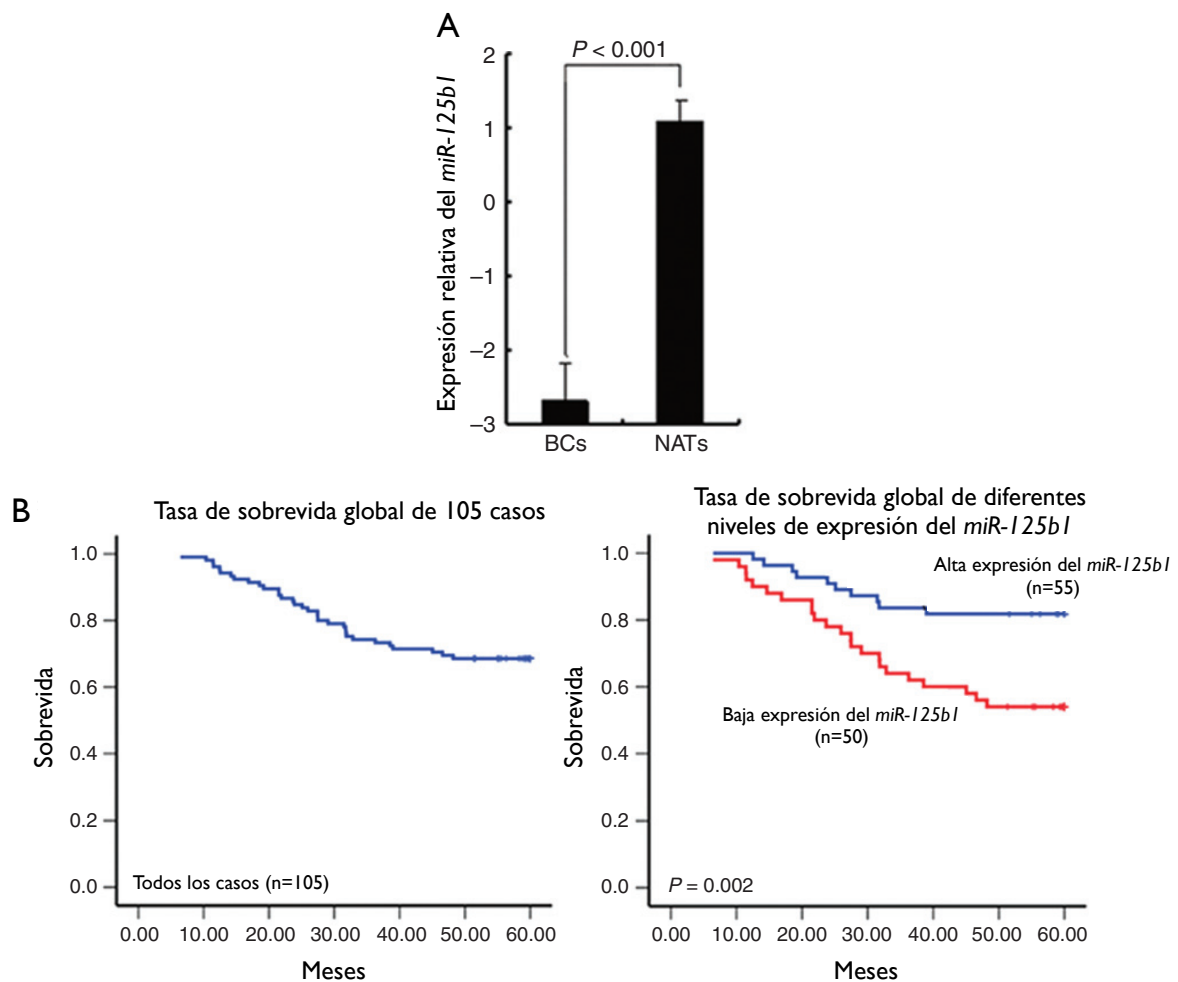


Figura 16. **Relación entre el decremento en los niveles de expresión del *miR-125b1* y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama.** (A) Existe un decremento significativo en los niveles de expresión del *miR-125b1* en cáncer de mama (BCs) en comparación con tejido normal adyacente (NATs). (B) Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global. Bajos niveles de expresión de este miRNA, repercute directamente en una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama que presentan esta característica (Datos de Zhang *et al*, 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es una de las enfermedades que más afecta a las mujeres en el mundo. Tiene el primer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad a nivel mundial (GLOBOCAN, 2008). Las causas del inicio y la progresión de esta patología se han asociado tanto con factores genéticos como ambientales. También, se ha descubierto que la epigenética juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer, dado que se han descrito cambios en los patrones de expresión de algunos genes sin que se altere la secuencia del DNA.

Se ha encontrado que, durante la progresión del cáncer, existe una desregulación en los niveles de expresión de diversos genes, entre los que destacan los que transcriben miRNAs. Estas secuencias de RNA, pueden regular post-transcripcionalmente a una amplia variedad de genes que codifican para proteína. Por tal motivo, se ha propuesto que algunos miRNAs tienen actividad de oncogenes y genes supresores de tumores, dependiendo de sus blancos regulados. Sin embargo, poco se ha descrito sobre los mecanismos que regulan la expresión de los miRNAs. A nivel epigenético, existen dos componentes capaces de modular la expresión génica: la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Particularmente, el *miR-125b1*, se le ha asociado con actividad de gen supresor de tumor. Este miRNA, se encuentra disminuido en diversos tipos de cáncer como ovario, riñón, vejiga, próstata y principalmente, mama (Iorio *et al*, 2005). Un análisis en *in silico*, mostró que en la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción existe una isla CpG, lo cual sugiere que en esta región podría localizarse al promotor del gen. Por esta razón, nos interesa caracterizar la región promotora del *miR-125b1* y evaluar cómo la metilación del DNA afecta la expresión de este gen.

HIPÓTESIS

Modificaciones en la metilación del DNA sobre el promotor del *miR-125b1*, la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción, disminuye la expresión de este gen en cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad promotora del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1* y evaluar el efecto de la metilación del DNA de esta región sobre la transcripción del gen en líneas celulares de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar *in silico* e *in vitro* a la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1*.
2. Evaluar el estado de metilación de la isla CpG localizada en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama.
3. Evaluar la expresión del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama.

RESULTADOS

Análisis *in silico* de los componentes genéticos y epigenéticos del locus del *miR-125b1*

Para conocer el contexto genómico del *miR-125b1*, se analizó *in silico* una región de 60 kb la cual incluía dicho gen. El análisis se realizó usando la base de datos de la Universidad de California campus Santa Cruz (UCSC), mientras que para el análisis epigenético se usó una base de datos basado en un estudio masivo de ChIP-Seq contra diferentes modificaciones y variantes de histonas en linfocitos T CD4+ de un individuo sano (Barski *et al*, 2007).

El análisis genético nos indicó que el *miR-125b1*, es un gen antisentido y además, dentro de la región que analizamos, existe un grupo de dos miRNAs, el *miR-100* y *let-7a-2*, localizado en sentido 5' a una distancia aproximada de 45 kb del *miR-125b1* (Figura 17). En la región del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1*, encontramos una isla CpG (análisis detallado en materiales y métodos). Este dato nos sugirió que en esta región se podría encontrar al promotor del gen. Por lo cual, realizamos un análisis de los componentes epigenéticos asociados a regiones promotoras como modificaciones post-traduccionales de las histonas (en este caso las H3K4me3) y la incorporación de variantes de histonas como la H2A.Z.

En el análisis de los componentes epigenéticos, se encontró un enriquecimiento de la H3K4me3 y H2A.Z en la región cercana a la isla CpG, esto favoreció nuestra hipótesis de que en esta región podrá encontrarse el promotor del *miR-125b1*. En este estudio, también incluimos al enriquecimiento de la RNA pol II y encontramos altos niveles de ésta en la región de la isla CpG. Estos resultados sugieren que esta isla CpG podría tener actividad promotora (Figura 17).

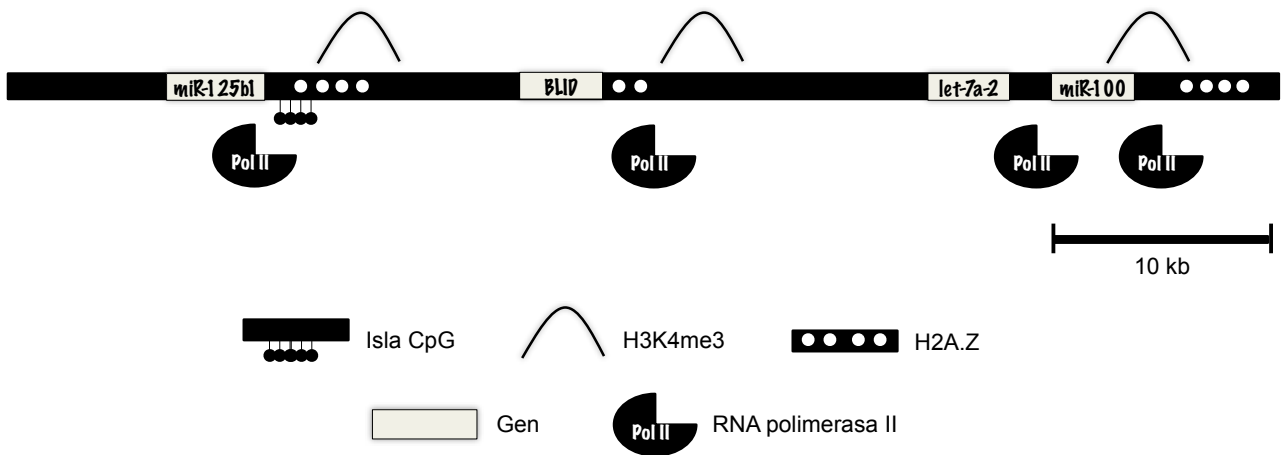


Figura 17. Análisis *in silico* de los componentes genéticos y epigenéticos del locus del *miR-125b1*. En la parte superior, se muestra un mapa genético del locus del *miR-125b1* con algunos componentes epigenéticos asociados a regulación de la transcripción. Mientras que en la parte inferior, se muestra el significado de los símbolos utilizados. Obtenido de las bases de datos de UCSC y NIH.

También nos interesó conocer las características de la isla CpG, para lo cual analizamos la tasa de CpGs de la isla en la que se podría localizar la región promotora del gen *miR-125b1*. Esta isla está embebida en una región de 875 pb y presenta 33 CpGs (Figura 18). Al hacer el análisis que propone el grupo de Weber (2007), el cual consiste en analizar la densidad de la isla CpG para conocer sus características funcionales. Se encontró que su tasa de CpGs es de 0.6047, lo cual indica que es una isla CpG de tipo intermedia. Este tipo de islas se caracteriza por silenciarse tanto por metilación de DNA como por modificaciones post-traduccionales de las histonas. Por lo cual, una pregunta que nos interesó abordar es si la metilación del DNA en la isla CpG localizada en el extremo 5' del TSS podría reprimir la expresión del gen *miR-125b1*.

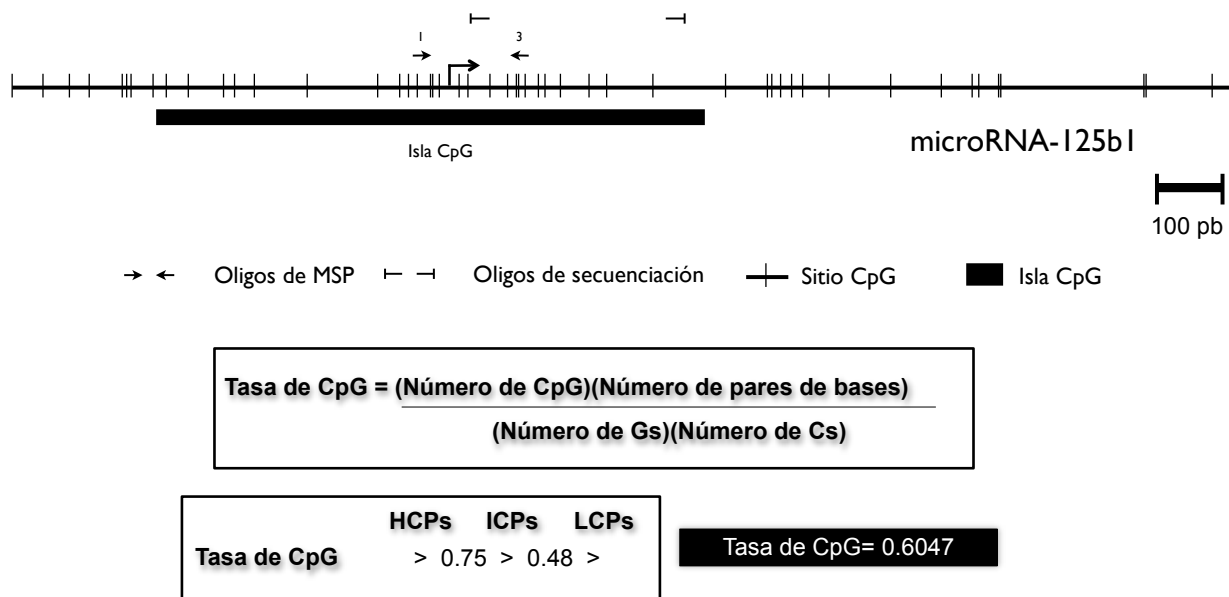


Figura 18. **Análisis de la isla CpG localizada en la región 5' del *miR-125b1*.** En la parte superior se muestra un esquema de la isla CpG y el gen *miR-125b1*. La isla CpG se encuentra embebida en una región de 875 pb y presenta 33 CpGs. Mientras que, en la inferior se muestra el análisis de las islas CpG de acuerdo con los criterios que describió el grupo de Weber. Este análisis mostró que la isla CpG que estamos analizando tiene una tasa CpG de 0.6047n indicando que es una isla CpG de tipo intermedia (Weber *et al*, 2007).

Actividad promotora de la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1*

Con el fin de determinar si la región en el extremo 5' del *miR-125b1* es un promotor, realizamos un ensayo *in vitro* de la actividad promotora mediante un reportero de luciferasa. Este ensayo consiste en clonar un fragmento de DNA correspondiente a la isla CpG en un vector que contiene a la luciferasa como gen reportero. Posteriormente, se realizó una doble transfección transitoria de este vector cotransfectándolo con otro que contiene un promotor viral acoplado a la luciferasa de *Renilla* como gen reportero y control del ensayo. Se evalúa un incremento en las actividades de luciferasa y *Renilla* usando un luminómetro y se normalizan los datos.

En este caso, amplificamos y clonamos un fragmento de 481 pb que se encontraba embebido en la isla CpG localizada en la región 5' del *miR-125b1*. Este fragmento fue clonado en dos orientaciones: 5' a 3' y 3' a 5'. A continuación, se transfectó con lipofectamina en células HeLa, debido a que esta línea celular presenta niveles altos de expresión del gen *miR-125b1*. Encontramos un incremento significativo en las unidades relativas de luciferasa (URL), cuando se transfectó el plásmido en orientación 5' a 3' en

relación con el gen endógeno. Mientras que, la construcción que contiene al fragmento en orientación 3' a 5' no muestra diferencias significativas en comparación con el vector vacío (Figura 19). Como control positivo del ensayo empleamos al promotor del gen *p53* humano previamente caracterizado (Soto-Reyes *et al*, 2009). Estos resultados sugieren que la región localizada en el extremo 5' del *miR-125b1* tiene actividad promotora unidireccional.

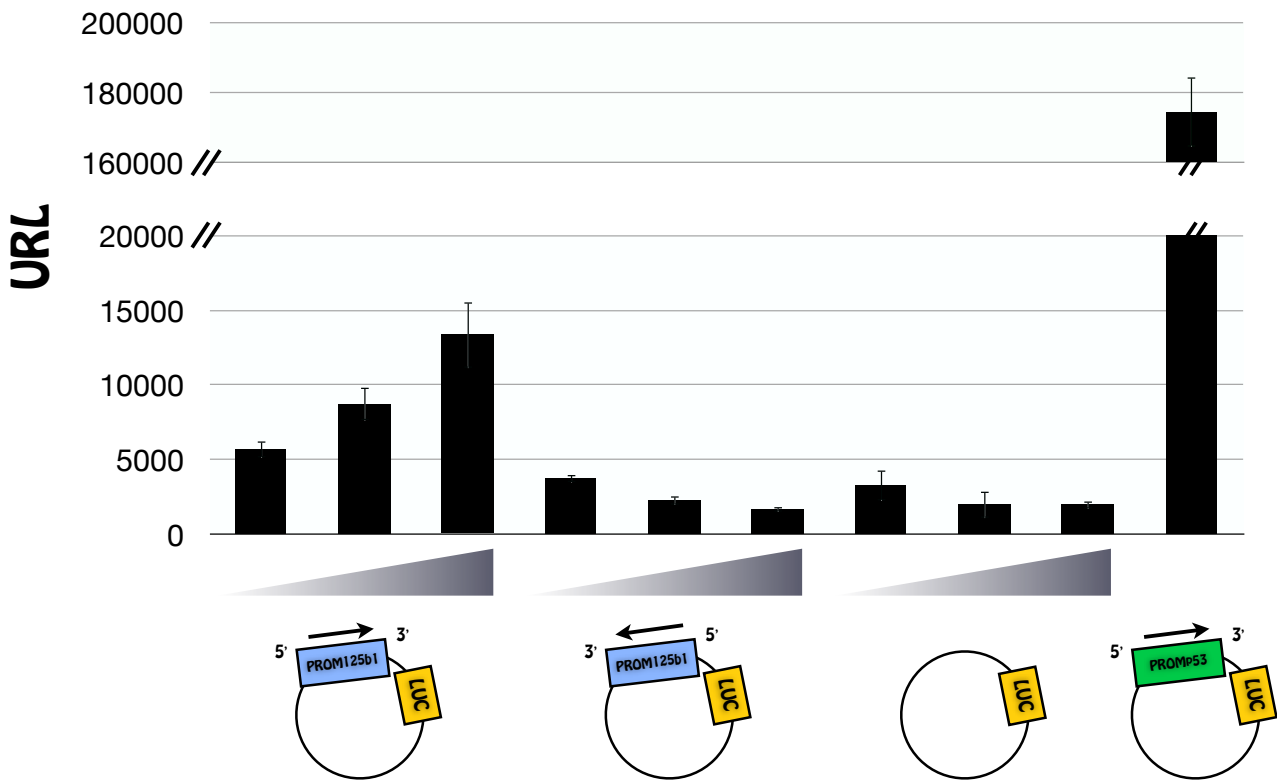


Figura 19. **Caracterización funcional del promotor del *miR-125b1***. Se realizó un ensayo de luciferasa con el fragmento localizado en el extremo 5' del *miR-125b1*. Se encontró un incremento significativo en las unidades relativas de luciferasa (URL) con el vector que contiene al fragmento en orientación 5' a 3', con respecto al vector vacío y al fragmento en orientación 3' a 5'. [LUC= luciferasa]

Análisis del estado de metilación del promotor del *miR-125b1*

A continuación, nos preguntamos cuál era el estado de metilación de la isla CpG localizada en la región 5' del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama. Este modelo tiene gran relevancia, ya que se ha demostrado que en esta patología, existe un decremento significativo de los niveles de expresión de este miRNA y, además, correlaciona con una menor supervivencia para las pacientes. Para lo cual, se convirtió el DNA usando la reacción de bisulfito de sodio y posteriormente, se analizó por PCR metilo sensible (MS-PCR) y secuenciación.

Por medio de la técnica de MS-PCR, se determinó el estado de la metilación del DNA en las líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, MDA-MB-231 y SK-BR-3. En este análisis, se observó que dos de las líneas celulares de cáncer de mama, MCF7 y MDA-MB-231, se encuentran metiladas, mientras que en SK-BR-3, no se encuentra metilada. Como control del ensayo, se compararon los datos con una línea celular no transformada, MCF 10A, la cual no presentó metilación. Como control positivo del ensayo, se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD) (Figura 20A).

Posteriormente, realizamos la secuenciación de una región de 271 pb perteneciente a la región de la isla CpG. Encontramos que dos de las líneas celulares, MCF7 y MDA-MB-231 se encuentran metiladas en 6 y 10 de las CpGs, respectivamente. Por otro lado, la otra línea celular de cáncer de mama, SK-BR-3, y la línea de mama no transformada, MCF 10A, no se encuentran metiladas (Figura 20B). Estos resultados nos sugieren que en células provenientes de cáncer de mama existe una metilación aberrante de la isla CpG del promotor del *miR-125b1* a diferencia de una línea celular de mama no transformada.

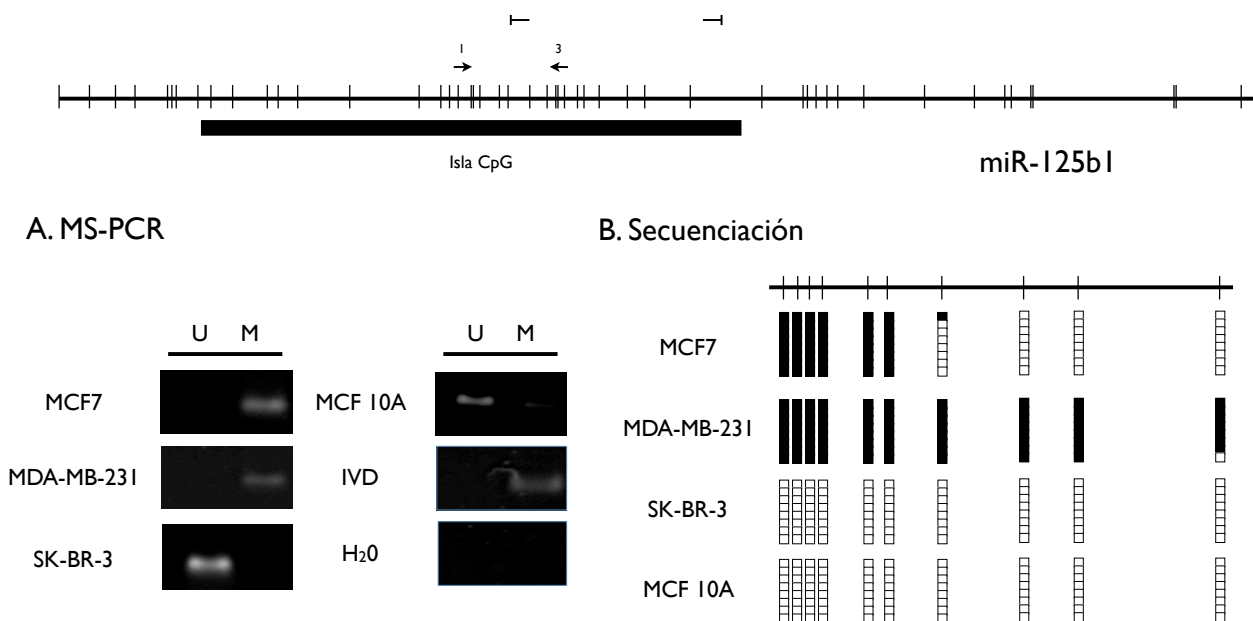


Figura 20. **Análisis del estado de metilación del promotor del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama.** Análisis la metilación de la isla CpG (barra negra) del promotor del *miR-125b1* (barra gris) por MS-PCR y secuenciación. En la parte superior, se muestran los sitios de reconocimiento de los oligos para MSP y secuenciación, flechas (→) y flechas de inhibición (←), respectivamente. En la parte inferior, en A, se observa el resultado del MSP (U-no metilado; M-metilado) mientras que en B, la secuenciación (n=8). [IVD= DNA metildo *in vitro*]

Expresión del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama

Para determinar cómo afecta la metilación del DNA sobre la región promotora del *miR-125b1* en la expresión del gen, realizamos un RT-PCR cuantitativo. Este ensayo nos sirve para evaluar la cantidad de transcrito del *miR-125b1* en las líneas celulares de cáncer de mama. Para el análisis de nuestros resultados, usamos el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método consiste en normalizar los resultados del transcrito de interés con el transcrito de un gen de expresión constitutiva y posteriormente, comparar estos datos con otro control que en nuestro caso es la línea celular de mama no transformada (Livak *et al*, 2001).

Encontramos un decremento significativo en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 que corresponde a un 28% y 5%, respectivamente. Como control positivo, usamos una línea celular de mama no transformada (MCF-10A) que por estudios previos (análisis de metilación por MS-PCR y secuenciación), se sabe que no se encuentra metilada (Figura 21). Estos resultados sugieren que la metilación del DNA sobre el promotor del *miR-125b1*, puede disminuir la expresión del gen de forma significativa.

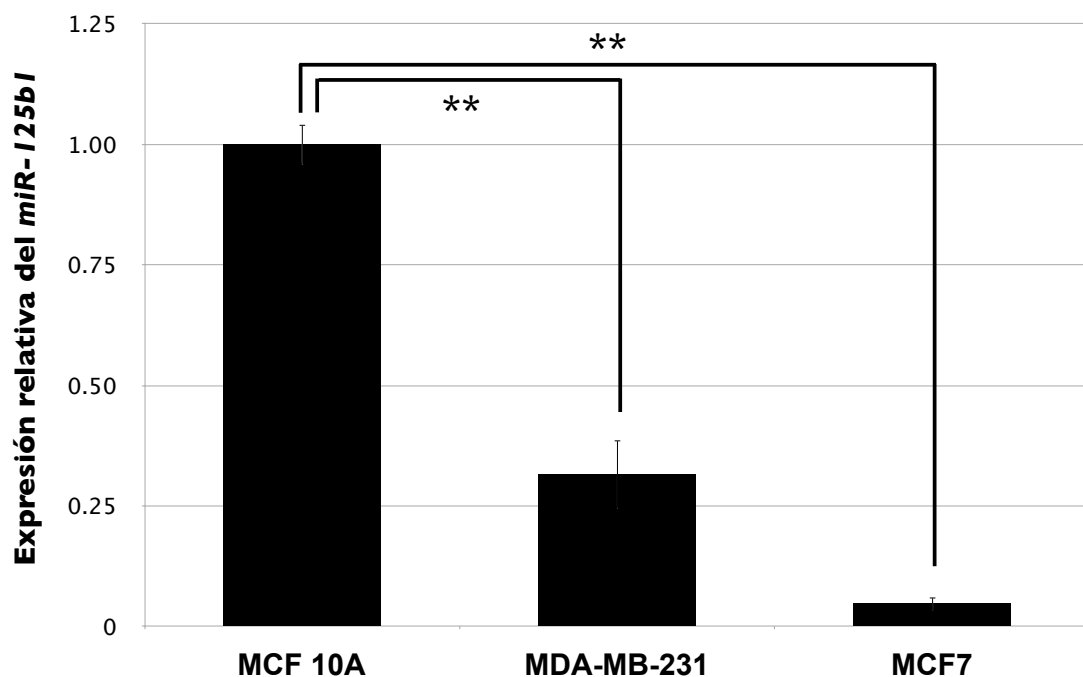


Figura 21. **Expresión del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama.** RT-PCR cuantitativo con plataforma TaqMan para evaluar los niveles de expresión del *miR-125b1*. Los resultados fueron analizados por el método del $\Delta\Delta Ct$ y se obtuvo que las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 había una disminución significativa en comparación con la línea celular no transformada, MCF 10A. Se realizó una prueba t-Student y los resultados significativos se muestran con doble asterisco (**) con su respectiva desviación estándar (n=4) ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Análisis *in silico* de las regiones que flanquean al *miR-125b1*

El análisis *in silico* de las modificaciones post-traduccionales de las histonas se obtuvo de la base de datos del grupo de Barski (<http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lmi/epigenomes/hgtcell.aspx>) donde se realizó un estudio masivo usando ChIP-seq contra diferentes modificaciones pos-traduccionales de las histonas en linfocitos T CD4+. Este análisis, sirvió para localizar regiones con características de una cromatina permisiva a la transcripción. Particularmente, se localizaron modificaciones como la H3K4me3 y la incorporación de la H2A.Z, las cuales se han asociado directamente regiones de eucromatina y activación transcripcional. Esta base de datos, también contiene información sobre sitios de reclutamiento de la RNA polimerasa II, lo cual nos sirvió para localizar a la región promotora del *miR-125b1*, *in silico*. A su vez, se localizaron varios sitios en los que la proteína CTCF se encontraba unida *in vivo* (Figura 22), lo cual sugiere que podría existir una regulación del locus a partir de la formación de asas de cromatina.

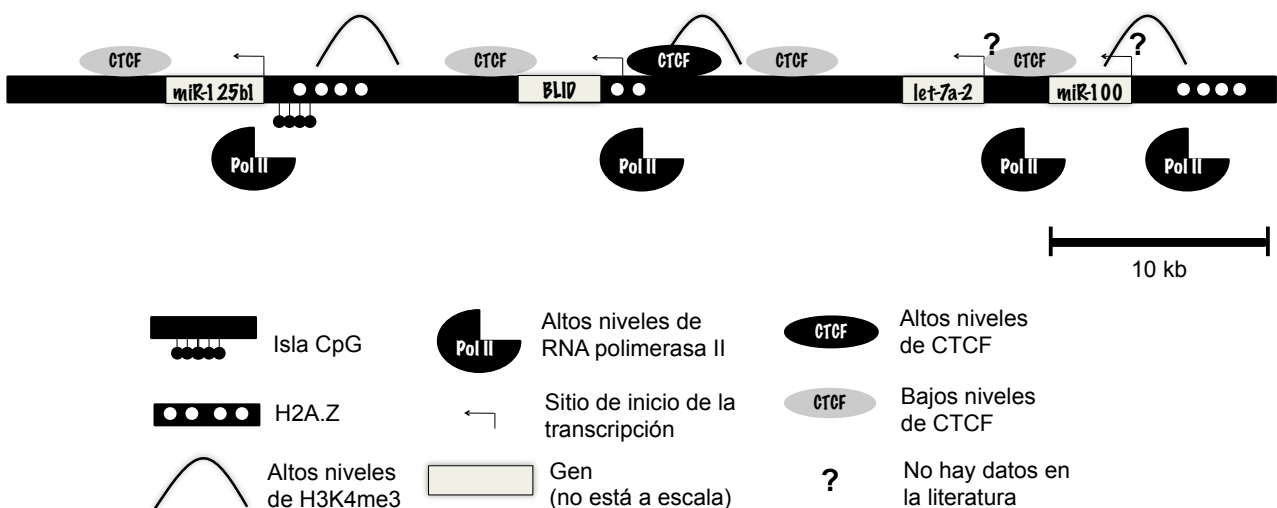


Figura 22. **Sitios de reclutamiento *in vivo* de CTCF en el locus del *miR-125b1*.** En la parte superior, se muestra el locus del *miR-125b1* donde se observan los sitios de unión *in vivo* de la proteína CTCF. Mientras que en la parte inferior, se muestra el significado de los símbolos utilizados en la superior. Obtenido de las bases de datos de UCSC y NIH.

El resultado del análisis *in silico* mostró que cerca del gen *miR-125b1*, en el extremo 5', se encuentra una isla CpG de tipo intermedia (analizada de acuerdo a su densidad de CpGs. Ver Figura 18). Este tipo de islas se caracterizan por contener promotores cuya regulación está dada tanto por la metilación del DNA como por las modificaciones post-traduccionales de las histonas. El análisis experimental de este promotor por ambos componentes epigenéticos ampliaría el panorama sobre como se lleva a cabo la

regulación en promotores autónomos cuando se encuentran en una isla CpG de tipo intermedias, las cuales no han sido caracterizadas.

Actividad promotora de la región en el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1*

En el estudio *in vitro* que se realizó para demostrar la funcionalidad del promotor del *miR-125b1*, se observó un incremento en la actividad de luciferasa, lo cual sugiere que la región localizada en el extremo 5' del *miR-125b1* tiene actividad promotora. Sin embargo, este incremento fue menor al que mostró el promotor del gen *p53*, el cual codifica para una proteína. Por lo cual, es importante comparar la actividad de este promotor con otro de características similares como el promotor del *miR-132*, previamente descrito (Zhang *et al*, 2011). Dado a los datos reportados en este análisis, sería relevante estudiar elementos distales al *core* de la isla CpG para lo cual se podrían analizar sitios lejanos a la misma.

Análisis del estado de metilación del promotor del *miR-125b1*

Se analizó el estado de metilación de la isla CpG localizada en el extremo 5' del *miR-125b1* de las siguientes líneas celulares: MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 y MCF-10A. De las cuales, se encontró que las líneas MCF7 y MDA-MB-231 estaban metiladas, mientras que, SK-BR-3 y MCF-10A, la línea de mama no transformada, no estaban metiladas.

En este estudio, únicamente, se evaluó la metilación de 10 de las 33 CpG contenidas en la isla CpG localizada en el extremo 5' del *miR-125b1*. De acuerdo con el grupo de Feinberg (2011), existe una mayor variabilidad en la metilación del DNA en las orillas de la isla CpG entre diferentes tumores (Hansen *et al*, 2011). Por tal motivo, sería relevante para nuestro análisis, ampliar el número de CpG que estamos evaluando. De esta forma, se podría demostrar que existe variabilidad en la metilación del DNA en diferentes grados de malignidad del cáncer de mama y que esta variabilidad afecta en la expresión del *miR-125b1*. A su vez, sería interesante incrementar el número de líneas celulares en las que estamos analizando la metilación de esta región, con el fin de evaluar diferentes grados de malignidad del cáncer.

Expresión del *miR-125b1* en líneas celulares de cáncer de mama

Al evaluar los niveles de expresión del *miR-125b1* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, se encontró que ambas líneas mostraban un decremento significativo en comparación con la línea no transformada, MCF-10A. Sin embargo, este decremento no correlaciona directamente con el estado de metilación de ambas líneas, lo cual sugiere que existen otros componentes epigenéticos involucrados en la represión transcripcional del *miR-125b1*. Por tal motivo, sería interesante evaluar modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a represión transcripcional, como la H3K27me3 y H3K9me3, en el modelo que se estudió. Recientemente, en el laboratorio, se evaluó el enriquecimiento de la H3K27me3 en la región promotora en tumor de mama y se observó que era un evento primordial para la represión del gen *miR-125b1* (Soto-Reyes *et al*, 2012). Por otro lado, evaluar los niveles de expresión de la líneas SK-BR-3, serviría para conocer que componente epigenético es relevante en el silenciamiento de este gen, por ejemplo la metilación del DNA, las modificaciones post-traduccionales de las histonas o ambas.

CONCLUSIONES

Actualmente, el estudio de los miRNAs ha cobrado una gran relevancia para el estudio del cáncer. Esto, debido a su capacidad de regular diferentes genes blanco. Por esta característica, se les ha asociado actividad de oncogenes y genes supresores de tumores dependiendo de sus genes blanco (Shenouda *et al*, 2009). Particularmente, un miRNA interesante es el *miR-125b1*, el cual se ha asociado con actividad de gen supresor de tumores. Además, se ha visto que en cáncer de mama hay un decremento en su expresión y esto se ha asociado con una menor sobrevivida para las pacientes con esta enfermedad. Sin embargo, poco se conoce sobre sus mecanismos de regulación en la expresión génica. Por tal motivo, es de gran relevancia caracterizar la región promotora del *miR-125b1* y evaluar cómo la metilación de DNA afecta la expresión del gen.

En este estudio, se localizó y caracterizó la región promotora de un miRNA. De forma interesante, se encontró que el promotor estaba embebido en una isla CpG de tipo intermedia. Estas islas se encuentran en menor frecuencia en el genoma humano y pueden ser inactivadas tanto por la metilación del DNA como las modificaciones de histonas. Posteriormente, se evaluó el estado de metilación del DNA sobre la isla CpG en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, por dos técnicas: PCR metilo sensible (MS-PCR) y bisulfito-secuenciación (Bis-Seq). Se encontró que, en cáncer de mama, esta

isla CpG se encuentra metilada en comparación con una línea celular de mama no transformada. Además, se evaluaron los niveles de expresión de este miRNA y se encontró un decremento significativo en el transcrito del *miR-125b1* en las líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea no transformada. Lo cual sugiere que en cáncer existe una metilación del DNA aberrante y ésta es capaz de alterar los niveles de expresión del *miR-125b1*.

PERSPECTIVAS

Análisis de las CpG necesarias para la represión transcripcional del *miR-125b1*

En este estudio, se analizó el estado de metilación en una región de la isla CpG en la que se encuentra el promotor del *miR-125b1*. Cuando se evaluaron los niveles de expresión, se observó una represión del gen en las líneas celulares en las que la región se encontraba metilada. Sin embargo, esta observación no corresponde directamente con nuestros resultados, debido a que en la línea celular MDA-MB-231, que se encuentra totalmente metilada, presenta mayores niveles de expresión que la línea MCF7, la cual se encuentra parcialmente metilada (Figura 20). Estos datos sugieren que existen otros componentes epigenéticos o CpGs relevantes para la represión transcripcional que no han sido analizados. Por tal motivo, sería relevante ampliar en análisis de la metilación de la isla CpG y delimitar donde se encuentran las CpGs relevantes para que se lleve a cabo la represión transcripcional que estamos observando. Para resolver esta pregunta, se podría ampliar la región de la isla CpG que se está analizando en modelos *in vivo*, ya que se ha demostrado que los sitios donde hay mayor variabilidad en la metilación de tumores son las orillas de las islas CpGs (Hansen *et al*, 2011). Mientras que, para delimitar la CpG's relevantes, se podría utilizar un modelo *in vitro*. En este modelo, se realizarían ensayos funcionales con vectores que contengan a la luciferasa como gen reportero, para determinar la actividad promotora con diferentes grados de metilación del plásmido y diferentes tamaños de la región promotora. Este estudio sería exploratorio y ayudaría a conocer las CpG cuya metilación es relevante para la represión transcripcional en un promotor de un miRNA.

Análisis de las modificaciones post-traduccionales de las histonas sobre el promotor del *miR-125b1*

Este estudio, se centró principalmente en la metilación del DNA. Sin embargo, dado que, el promotor del *miR-125b1* se encuentra embebido en una isla CpG de densidad intermedia, es importante considerar las modificaciones post-traduccionales de las histonas. Particularmente, la H3K27me3 y H3K9me3 las cuales se asocian directamente con represión transcripcional. En estudios recientes en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la H3K27me3 en tumores de mama tiene un papel fundamental en la represión del *miR-125b1*, incluso se propone que esta modificación es primordial para el silenciamiento del gen (Soto-Reyes *et al*, 2012). Por lo tanto, al analizar el enriquecimiento de la H3K27me3, esperaríamos un incremento de la H3K27me3 en la línea celular MDA-MB-231 a diferencia de MCF7. Con esto demostraríamos que la represión transcripcional del *miR-125b1*, está mediada principalmente por modificaciones post-traduccionales de las histonas, mientras que, la metilación del DNA es un evento consecuente a este proceso.

Análisis de los blancos del *miR-125b1*

Se han caracterizado ciertos blancos del *miR-125b1*. Entre ellos se encuentran genes involucrados en el ciclo celular (*p53*) (Shi *et al*, 2007), apoptosis (*BAK1*, *PUMA*, *BCL3*, *Bmf*) (Shi *et al*, 2007; Xia *et al*, 2009; Guan *et al*, 2011) y diferenciación celular (*ETS1*, *E2F3*) (Huang *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2011). Sin embargo, un análisis usando cuatro algoritmos diferentes para la búsqueda de blancos de miRNAs (TargetScan, PicTar-Vert, EMBL-EBI y miRanda) mostró que el *miR-125b1* tiene como blancos teóricos a genes involucrados en la remodelación de la cromatina (*SUV39H1*, *DOT1L*, *HIC1*, *HDAC8* y *CBX7*) y genes involucrados en la biogénesis de los miRNAs (*DICER1*) (Figura 23). Como perspectiva del proyecto, sería de gran interés demostrar si estos genes son blanco del *miR-125b1*, porque probaría que este miRNA, desempeña un papel importante en la remodelación de la estructura de la cromatina. Con esto, fortalecería la idea que su correcta regulación es importante para la homeostasis de la célula y alguna alteración en ésta podría tener grandes consecuencias, entre ellas, el inicio o desarrollo del cáncer.

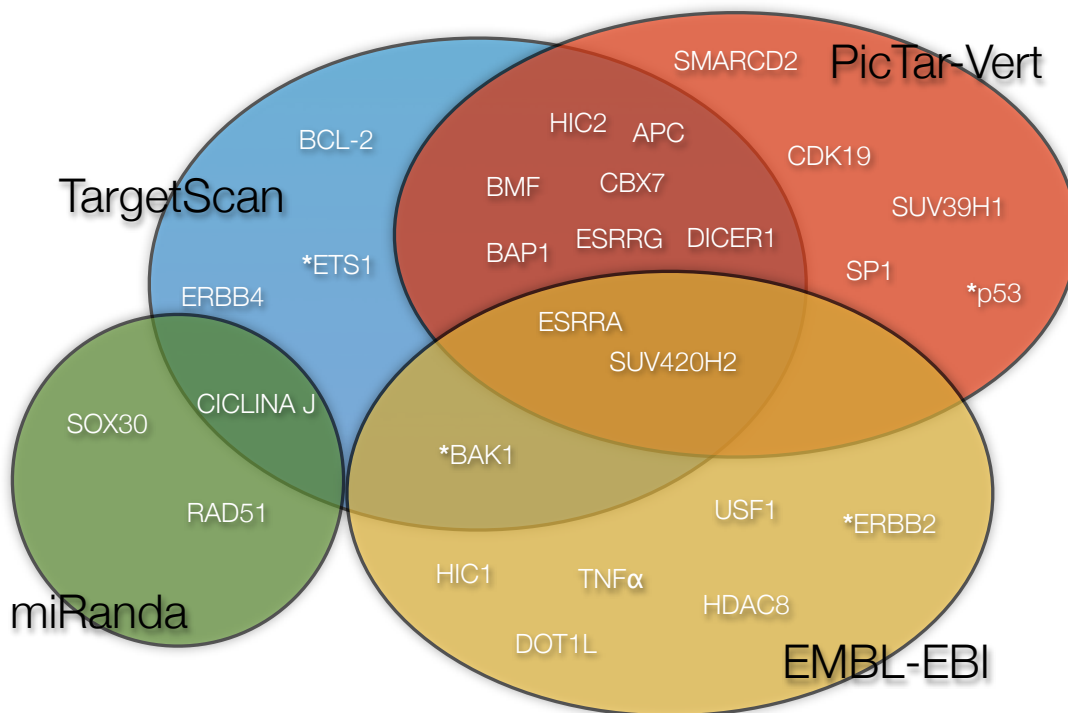


Figura 23. **Blancos teóricos del *miR-125b1***. Para conocer algunos blancos teóricos, se analizaron cuatro diferentes bases de datos: TargetScan, PicTar-Vert, miRanda y EMBL-EBI. Se encontró una gran cantidad de genes asociados con regulación epigenética y genes involucrados en ciclo celular y apoptosis.

Modelo de regulación del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*

El locus del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100* se encuentra altamente conservado organismos eucariontes (Chistodoulou *et al*, 2010). Entre sus principales funciones, se ha asociado con la regulación de la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular (Pang *et al*, 2010), por lo cual, una adecuada regulación es fundamental para el organismo. En un análisis, encontramos que dentro del locus del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*, existen 5 sitios de reclutamiento *in vivo* de la proteína CTCF (Figura 24). Esta proteína tiene función de *insulator* en organismos vertebrados, es decir, sirve como barrera para delimitar las regiones de eucromatina de las regiones de heterocromatina (Handoko *et al*, 2011). Por tal motivo, esta proteína podría ser fundamental en la regulación del locus *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*.

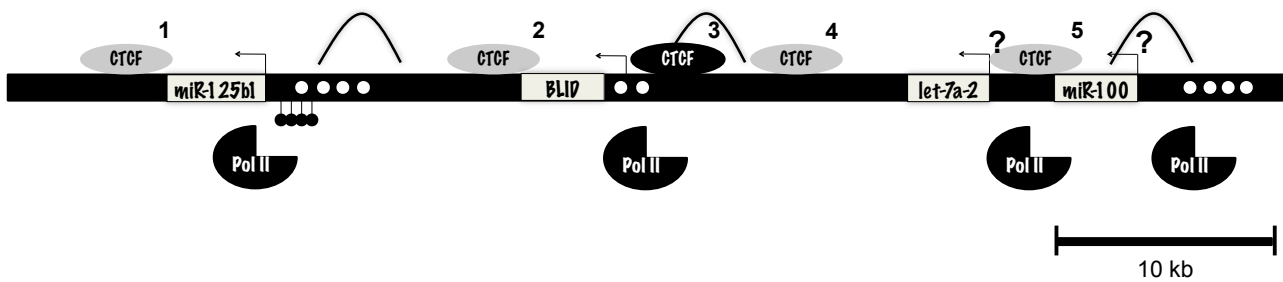
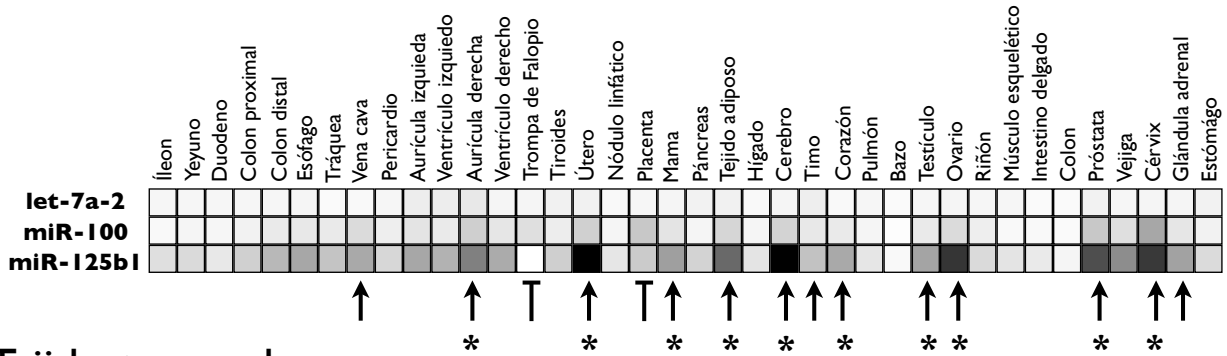


Figura 24. Sitios *in vivo* del reclutamiento de CTCF en el locus del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*. En la parte superior, se muestra un mapa genético del locus del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100* con algunos componentes epigenéticos asociados a regulación de la transcripción. Obtenido de las bases de datos de UCSC y NIH.

Estudios recientes, analizan los niveles de expresión del *miR-125b1*, *let-7a-2* y *miR-100* en tejido sano. En estos, encuentran que el *miR-125b1* muestra mayores niveles de expresión en varios tejidos como útero, cerebro, ovario, cérvix y próstata, entre otros, en comparación con *let-7a-2* y *miR-100*. Por el contrario, *let-7a-2* presenta bajos niveles de expresión en la mayoría de los tejidos analizados (Liang *et al*, 2007).

Los niveles de expresión de cada miRNA de este locus tiene una tendencia particular en los diferentes tejidos estudiados, con excepción de placenta y trompa de Falopio (Figura 25). Esta tendencia consiste en altos niveles de expresión del *miR-125b1*, menores niveles de expresión del *miR-100* y, en último lugar, con una expresión casi nula, *let-7a-2*. Por otro lado, en tejido tumoral, se ve una desregulación en esta tendencia. Siendo *let-7a-2*, el miRNA que presenta los niveles de expresión más altos del locus o, por lo menos, cercanos al *miR-125b1*. La adecuada regulación del *miR-100* y *let-7a-2*, es importante para la homeostasis celular. Recientemente, se ha demostrado que alteraciones en los niveles de expresión del *miR-100* tiene un papel fundamental en el inicio y la progresión de cáncer de hígado, ovario, mama y cérvix (Petrelli *et al*, 2012; Li *et al*, 2011; Lobert *et al*, 2011; Nagaraja *et al*, 2010), principalmente. Además, se han reportado blancos como *PLK1* (cinasa de serina/treonina involucrada en la regulación de la maduración de centrosomas y ensamblaje del huso mitótico), *β -tubulina* (unidad estructural de los microtúbulos) y *ATM* (cinasa de serina/treonina que se recluta y activa por rompimiento de doble cadena del DNA) (Petrelli *et al*, 2012; Lobert *et al*, 2011; Ng *et al*, 2010;). Mientras que, *let-7a-2*, se encuentra involucrado en cáncer de hígado y pulmón (Cairo *et al*, 2010; Yanaihada *et al*, 2006), teniendo como único blanco reportado a *Myc* (Cairo *et al*, 2010).

Tejido sano



Tejido tumoral

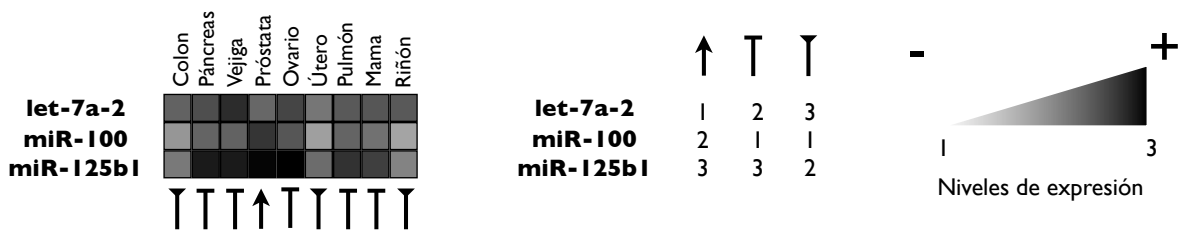
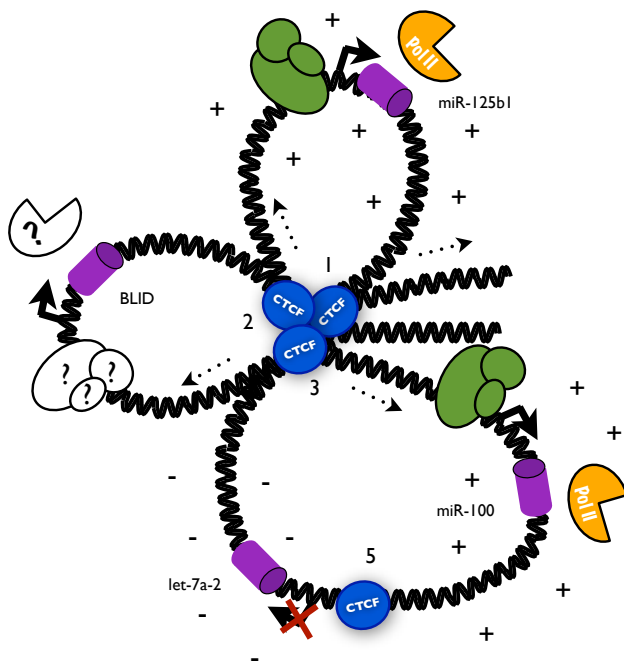


Figura 25. Niveles de expresión del grupo del *miR-125b1/let-7a-2/miR100*. En la parte superior, se observan los niveles de expresión de cada miRNA del grupo del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100* en diferentes tejidos sanos (datos obtenidos de Lu *et al*, 2005). En la parte inferior, se muestran los niveles de expresión del mismo grupo en diferentes muestras de tumor (datos obtenidos de Liang *et al*, 2007). [Escala de colores gradual. El color negro representa altos niveles de expresión; mientras que, el color blanco, no presenta expresión]. En general, existen altos niveles de expresión del *miR-125b1* en comparación con el *let-7a-2* y el *miR-100* en tejido sano (↑), siendo las que presentan el asterisco (*) las muestras con tendencia más repetitiva. Mientras que, en tejido tumoral, los niveles de expresión del *miR-125b1* y *let-7a-2* son muy similares (T y Y).

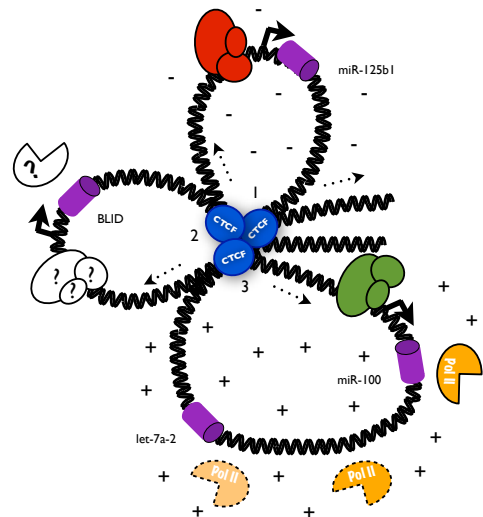
Dado los datos de las tendencias de expresión que tiene el locus del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100* y la importancia de estos miRNAs para la homeostasis celular, sería relevante conocer cómo se lleva a cabo la regulación en la expresión génica de la región. Para lo cual, propongo dos modelos teóricos de los rearrreglos que podría estar sufriendo la cromatina en condiciones normales y en cáncer. En condiciones normales, los promotores del *miR-125b1* y *let-7a-2/miR-100*, podrían estar activos, presentando un mayor reclutamiento de la RNA Pol II el promotor del *miR-125b1*, por ser un promotor más fuerte. Sin embargo, existe un sitio de reclutamiento de CTCF entre *let-7a-2* y *miR-100* que interrumpe la elongación de la RNA Pol II causando que no se transcriba *let-7a-2* (Figura 26A). En cáncer, el primer modelo sugiere que en la región promotora del *miR-125b1*, hay un incremento en la H3K27me3, reclutando al complejo de Polycomb y remodeladores de la cromatina que incrementen el grado de compactación de ésta, volviéndose inaccesible a factores transcripcionales y a la maquinaria transcripcional. Por otro lado, el sitio de CTCF que se encuentra entre *let-7a-2* y *miR-100* se pierde,

permitiendo la transcripción de *let-7a-2* (Figura 26B). Finalmente, otro modelo propuesto en condiciones tumorales, sugiere que el *miR-125b1* y *miR-100* se encuentran silenciados, esto debido a que se encuentran cercanos a una región de heterocromatina. Mientras que, *let-7a-2* podría estarse transcribiendo en bajos niveles, por la presencia de un promotor débil que se encuentra en sitios de eucromatina (Figura 26C). En estudios recientes en nuestro laboratorio, se ha demostrado que en tejido de mama normal, la proteína CTCF se encuentra en los primeros 4 sitios observados en la figura 24; mientras que, en condiciones tumorales, hay una pérdida parcial de esta proteína. Además, la pérdida de CTCF altera los niveles de expresión del *miR-125b1*, sugiriendo que en la regulación en la expresión del locus podría estar mediado por la proteína CTCF (Soto-Reyes *et al*, 2012).

(A) En tejido normal (\uparrow)



(B) En tejido tumoral 1 (T)



(C) En tejido tumoral 2 (Υ)

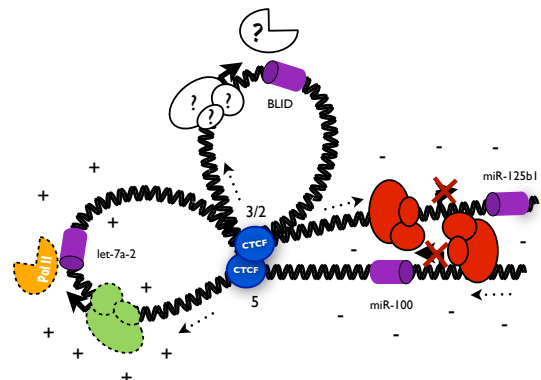


Figura 26. **Modelo de regulación del *miR-125b1/let-7a-2/miR-100*.** *miR-125b1* y *miR-100* (cilindros morados) se encuentran cercanos por la interacción de dos CTCF (esferas azules), su silenciamiento se debe al reclutamiento de maquinaria asociada a represión transcripcional (óvalos rojos). Sin embargo, el *let-7a-2*, se encuentra expresándose ya que se encuentra aislado a esta región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico* del locus del *miR-125b1*

Para conocer los componentes genéticos y epigenéticos del locus del *miR-125b1*, se usó la base de datos de la UCSC y se le incorporó la base de datos de un análisis masivo que realizó el grupo de Barski (Barski *et al*, 2007). Este análisis fue realizado en linfocitos de sangre periférica CD4+. En este estudio, se localizan sitios específicos del genoma donde hay modificaciones de post-traduccionales de histonas y reclutamiento de proteínas relevantes para la regulación de la transcripción, a partir de las técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación masiva. Los componentes tomados de este análisis fueron la H3K4me3, sitios de incorporación de la H2A.Z, sitios de reclutamiento de la RNA Pol II y sitios de reconocimiento de la proteína CTCF (mostrado únicamente en discusiones) (Figura). Los resultados de este análisis se esquematizaron usando el programa Keynote.

La isla CpG localizada en el extremo 5' del *miR-125b1* fue caracterizada tomando en cuenta las siguientes condiciones:

Tamaño mínimo de la isla: 300pb
Tamaño máximo de la isla: 2000pb
C+Gs / Total de las bases: 50%
CpG observado / CpG esperado: 0.6

Posteriormente, se caracterizó el tipo de isla CpG en relación a su densidad, usando los criterios de Weber (2007):

$$\text{Tasa de CpG} = \frac{(\text{Número de CpG})(\text{Número de pares de bases})}{(\text{Número de Gs})(\text{Número de Cs})}$$

	HCP's	ICP's	LCP's
Tasa de CpG	> 0.75	> 0.48	>

Se localizó el TSS, a través de un análisis informático usando el programa Promoter 2.0 Prediction. Este programa muestra tres tipos de predicciones de TSS de la RNA Pol II: marginalmente probable (0.5-0.8), parcialmente probable (0.8-1.0) y altamente probable (1.0). Cada una de éstas resulta ser certera en un 65%, 80% y 95%, respectivamente (Knudsen, 1999). El único TSS encontrado en la isla CpG, mostró las siguientes características:

Puntuación	Probabilidad
0.587	Predicción marginal

Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de mama y una línea no transformada: MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 y MCF-10A, respectivamente. Las primeras tres líneas fueron cultivadas con medio RPMI (GIBCO) adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC) y 1X de Antibiótico/Antimicótico (GIBCO). Mientras que, la línea celular MCF-10A fue cultivada con medio DMEM/F12 (3:1) (GIBCO) adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC), 2 mM de glutamina (GIBCO), 1X de Antibiótico/Antimicótico (GIBCO), 10 ng/mL de EGFrh (Invitrogen), 120 mU/mL de insulina recombinante humana y 1µg/mL de hidrocortizona (Sigma). Todas las líneas mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂. Para el ensayo de luciferasa, se cultivaron células HeLa usando medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (ATCC) y 1X de Antibiótico/Antimicótico (GIBCO). Al igual que las líneas celulares de mama, se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

Ensayo de actividad promotora mediante un vector reportero de luciferasa con la región del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del *miR-125b1*

Región promotora del *miR-125b1* (*PROM125b1*)

FW - GGCAAAGTGCACGCTAAAG

RV - GGCAAGTATGCCGCATGC

Producto: 481 pb

Secuencia de la región promotora

5'CGTTGAGGCCTCTCCAGTGTCCCTCCTGGCTGTGGCTGCTTTGTCATTCTCTTTGACT
AGCCAGCCATCTACCTTGCTCAGGCCTGGAATAAAAGAAGAACAAGAAGAAGAAAGAA
ATGAAATGAAAACAGAAAGAAAAGGAGAAGAAACATTTGTAAAAGGGTCATCTTCC
CATCTGCCTCCCCTCCTTTTCCTTTTCATTTTTGGTGGCGGCACAGGAAAGCCCCACTT
CCAGTCTGATGAGGAAAGCGACAATCTATCAGGTACAGAACCAGGGGCTGTCTGCGA
AGATGGAGGGGAATTATGCTTCGGATTCTCTGAAATATTGGCCAAAGGCTTCAAAGA
ATCCGCAGCGGGAGGTGCGGGGGGAATGTCTCTCCCAGCCCGCACCCAGCCCTTC
CCACTTCGTGTCTACCAAATGACAGCCTGGTGTCTCGCTCTTGGTGATTTGGCCTTGAC
TTCAGCCAAGCAGCTGATGCAGACGAAGCCTCCGTTTGCAGGACT**GGCAAAGTGCA**
CGCTAAAGAAAGAAGGAAGAAATTTTTCAAAAAGCAGCTCTGGGGAGGTTTCATACTC
CCCCCCCCCCCCCGCCTTTTTTAATTTTTAAGTGAATATTTCCAAATTTGATCAGTTC
CAGCCCCTCCCTCCACTCCCACCCAAGTCCCTTTTTTCTCTCGTCAAAGCATAAGCT
ACAGAGTTACAGTCTCGAGATTTGGTGTATCGCTTCCTGCCCCCGCCTCCCCTCCC
GCCCCGTTCTCCGTCCTCTATTGAAACACCTCGCCAGCCTAGCGCACTGAGAGCT
CTCATTTTTCCCCCCTTGCTCGGGATGGTGCCACAGGAGGCTGTGCGGGCCCCGCTC
CGCTTCGAATGGGTGAGTTCAGAACGCTATTCGTCTTTACACTTCTATAGCCTCCGAAT
CCTACTTCTTGGTCTTCTCCTTTGAAAACCCGATTTCTATGATTTTT**GCATGCGGCATAC**
TTGCCCTGGGGAAAGAGATGCCTCCTATTTCTCTTCAGTCATTTGTGCTAGTCGTAA
ATTAAGCTTTGAAAAGACACTAAATCCTTATTGTAGACTATGGTTTTAAAACTTGGGC

ATTTCTGAGTCTGTGCATATTATTTCCGTTTTAGTGAACATTTTGCCCAAATCTTGAAA
 GAGTTTTCTCTGATGTACTIONCGTGATCGTATGTGTATGTGCGTGATTGTATATGCGCCCC
 CAGATACTGCGTATGTGTGTATATATGTATTAGGCTTAAACGGAATCTCAATTTTGTGAA
 GGAAAGGAGCTTAGAGAAGAAATACCATAACCACTGTTTGTTCATCTTAGTTATGAAC
 CTCGAACAGAAATTGCCTGTCATTCTTGTTTTGCTTTGCTTTGTCTCAAGAAAGAAAAC
ATTGTTGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGATGTTTACCGTTTAAATC
CACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCTGCGAGTCGTGCTTTTGCATCCTGGAAATTTGGTG
 GAATTTTATTCTTTAAAGCAAAAACAAAAGAAAAGAAAGTTTGTCTGAGGTGATTGAGTA
 TACCTCTGAGGTTTTTATTGTTAGATGGGATCAGGTGACCAGAGAGTGGCAGCTCCTG
 GATTTCTGTAAAGTAGGTATATATTTTGTCTTAATAGCGTGTTGGCTGCTATGTGTATGT
 ATGCATGTTATTGATGCCTGAGGCTTGTGGAACCTCATCTGCCTGGTCTATTCTTGAGA
 GCAACACGCAGTAGTATACGAGCGTA3'

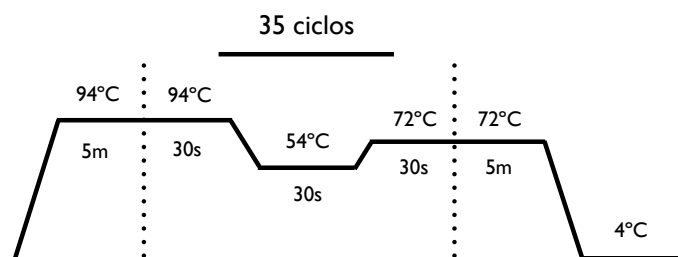
microRNA-125b1 - En negritas

Oligonucleótidos sintéticos diseñados sobre el promotor - En negritas y subrayado

Condiciones del PCR para amplificar la región promotora

Se usó DNA genómico extraído de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano.

Reactivo	1RX
dNTPs [10 mM]	0.5µL
MgCl ₂ [50 mM]	1µL
Buffer para PCR 10X	2.5µL
Primer FW [10 µM]	0.5µL
Primer RV [10 µM]	0.5µL
Taq DNA Pol Platinum [5 U/µL]	0.1µL
DNA [=50ng]	1µL
H ₂ O	18.9µL



Extracción de DNA del gel de agarosa

La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo del Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN Cat No. 28706).

Clonación del fragmento del promotor con el plásmido pTZ57R/T

Ligación del PROM125b1 en el plásmido pTZ57R/T

Se realizó una ligación del fragmento del promotor con el plásmido pTZ57R/T

Bacterias competentes con cloruro de rubidio

1. La cepa DH5 α se siembra en 5 mL de medio LB sin antibióticos y se deja incubando con movimiento constante durante toda la noche a 37°C (usando los tubos de ensaye con tapa amarilla).
2. Frente al mechero, se toma una alícuota 4 mL de la cepa crecida durante toda la noche y se resiembra en 400 mL de preferencia en dos matraces de 1L con medio LB (dilución 1:20) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 630 nm.

NOTA: Emplear como blanco medio LB.

3. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se centrifuga a 4000 g por 15 min (Eppendorf grandota) a 4°C, y se desecha el sobrenadante.
4. Resuspender suavemente frente al mechero en 20 mL de TBF1
5. Incubar en hielo por 20 min.
6. Centrifugar a 4000 g durante 15 min a 4°C, y se desecha el sobrenadante.
7. Resuspender frente al mechero en 7 mL de TBF2.
8. Incubar en hielo por 20 min.

Hacer alícuotas de 100 μ L (cada alícuota sirve para dos transformaciones) y almacenar a -70°C, la posterior descongelación se realiza en hielo.

Buffer de Transformación 1 (TBF1) (100 mL)

Cloruro de rubidio	1.2 g
Cloruro de magnesio	0.99 g
Acetato de potasio	3 mL del stock 1M, pH 7.5
Cloruro de calcio	0.15 g
Glicerol	11.9 mL
Aforar con H ₂ O a 100 mL	
Ajustar el TBF1 a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M.	

Buffer de Transformación 2 (TBF2) (100 mL)

MOPS	2 mL de 0.5 M stock (pH 6.8)
Cloruro de rubidio	0.12 g
Cloruro de calcio	1.1 g
Glicerol	11.9 mL (15 g)
Aforar con H ₂ O a 100 mL	

Transformación de bacterias por choque térmico

1. Descongelar las bacterias competentes en hielo.
2. Agregar 4 μ L del plásmido ligado, mezclar suavemente.
3. Incubar en hielo por 30 min y agitar suavemente cada 10 min.
4. Incubar a 42°C durante 1 min.
5. Pasar inmediatamente a hielo.
6. Cerca del mechero, colocar 1 mL de medio LB sin antibiótico.
7. Incubar a 37°C en agitación durante 1 h.
8. Centrifugar a 3000 g y eliminar el sobrenadante.
9. Resuspender el botón con el remanente del medio LB y plaquera en medio LB-agar con ampicilina [100 μ g/mL].

10. Mantener la placa en una incubadora a 37°C de 8-12 hrs.

Miniprep de colonias de bacterias transformadas

Las obtención del plásmido se realizó con el protocolo de Plasmid Mini Kit (QIAGEN Cat No. 27106).

Orientación de la construcción pTZ57R/T-PROM125b1

Para determinar la orientación en que se insertó el fragmento del PROM125b1, se hizo una digestión del plásmido y el inserto con la enzima Apal (Invitrogen 15440-019). Se dejó incubando a 37°C durante toda la noche y se corrió un gel de TBE-agarosa al 1%.

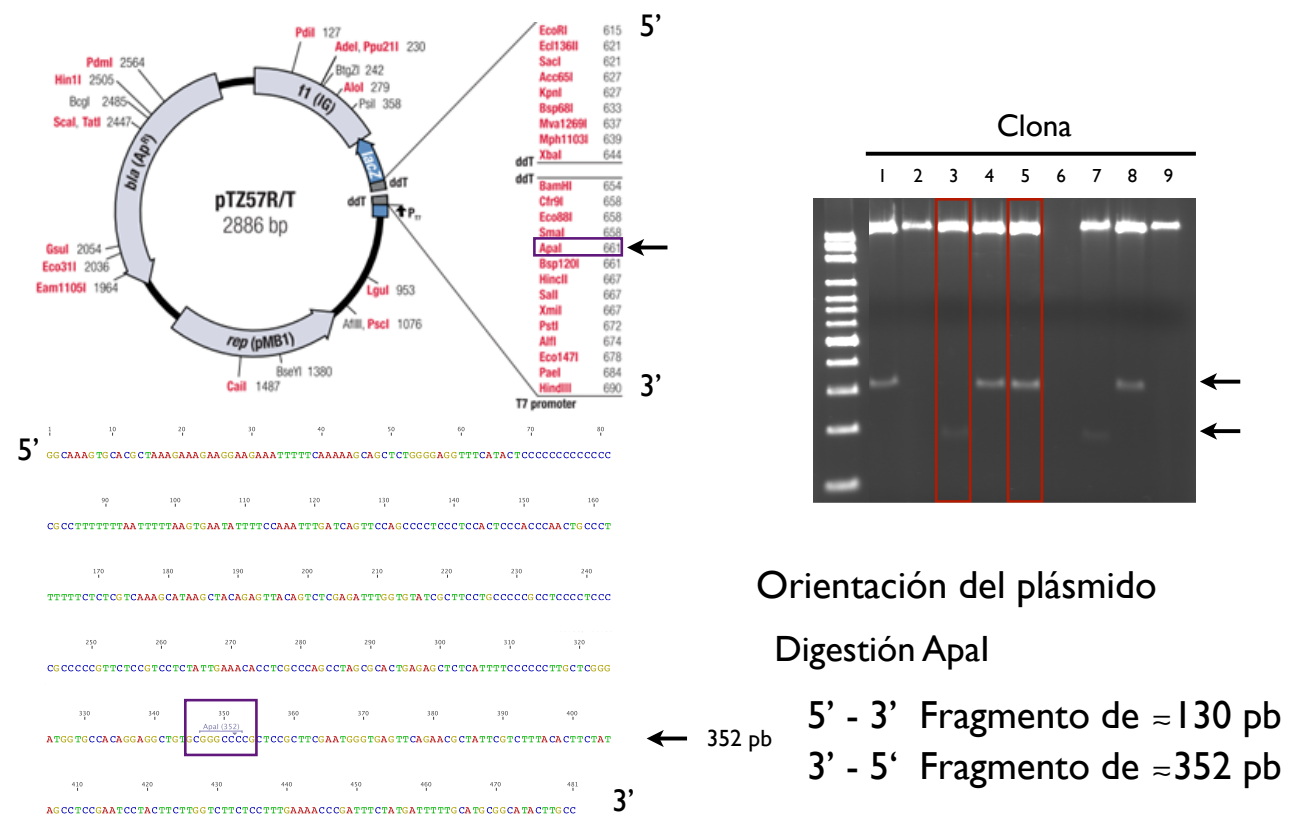


Figura 27. Orientación de la construcción pTZ57R/T-PROM125b1.

Clonación con pGL3 Basic

Para clonar el fragmento en otro vector, se digirió el fragmento cortando con dos enzimas de restricción: HindIII (PROMEGA R03A) y KpnI (PROMEGA R634A). Digiriendo a la par pGL3 Basic, usando el *MultiCore Buffer*. Posteriormente, se ligó el fragmento con el plásmido pGL3 Basic, se transformaron las bacterias por choque térmico y se extrajo el plásmido usando el mismo protocolo que la construcción pTZ57R/T-PROM125b1.

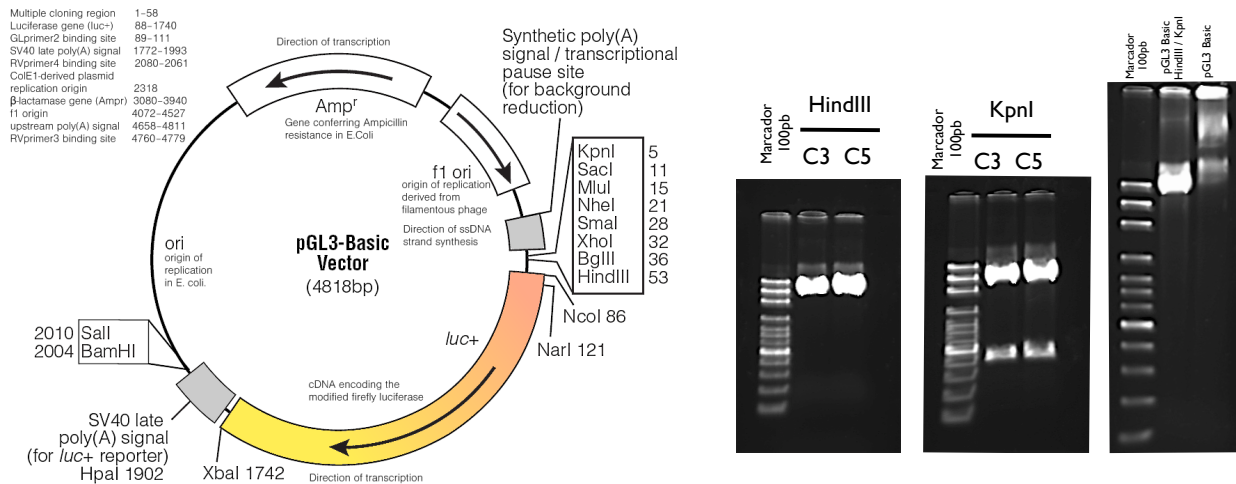


Figura 28. Digestión y construcción del pGL3-PROM125b1.

Transfección del plásmido pGL3-PROM125b1 en células HeLa

Se transfectó el plásmido en células HeLa, debido a que estas son una línea celular transformada y presentan la maquinaria y los factores transcripcionales necesarios para la transcripción de este gen (Lu *et al*, 2005; Liang *et al*, 2007).

Cultivo celular

1. Cultivar 200,000 células HeLa en 5 cajas cultivo celular de 6 pozos con 2 mL de medio completo (confluencia para la transfección del 50-80%). Agitar bien las células para que queden dispersas en la caja.

Co-transfección

2. Realiza las siguientes mezclas:

Tubo 1. Lipofectamina

Reactivo	[] (1X)	[] (27X)
Lipofectamina	2 µL	54 µL
DMEM HG	100 µL	2700 µL
Renilla-CMV [50ng/µL]	2 µL	54 µL

Tubo 2. Reactivo PLUS

Reactivo	[] (1X)	[] (27X)
PLUS	2 µL	54 µL
DMEM HG	100 µL	2700 µL

Vuelve a dividir en 8 tubos de 1.5 mL y coloca las siguientes concentraciones de plásmido (todos los plásmidos se encuentran a una concentración de 1 µg/µL, excepto CMV-Renilla)

Plásmidos (pGL3-PROM125 (C3,C5), pGL3 Basic)

[] de plásmido	µL de plásmido (3X)
0.5 µg (C3) (C5)	1.5 µL (3X) (3X)
1 µg (C3) (C5)	3 µL (3X) (3X)
2 µg (C3) (C5)	6 µL (3X) (3X)
pGL3-p53 [1 µg]	2 µL (2X)
pGL3 Basic cerrado [0.5 µg]	1 µL (2X)
pGL3 Basic cerrado [1 µg]	2 µL (2X)
pGL3 Basic cerrado [2 µg]	4 µL (2X)

3. Incuba por 15 min el Reactivo PLUS con el plásmido a temperatura ambiente.
4. Agrega 300 µL (3X) / 200 µL (2X) del tubo 1 (Lipofectamina) y mezcla suavemente y vuelve a incubar por 15 min a temperatura ambiente.
5. Lava las células dos veces con PBS 1X y agrega 800 µL medio sin suero ni antibióticos a cada pozo (1mL a los controles sin tratamiento).
6. Coloca 200 µL del complejo DNA-lípidos en las cajas con células (MUY IMPORTANTE: debe ser por goteo para disminuir la toxicidad y que les llegue a todas las células).
7. Incuba las células a 37°C por 6 h e inactiva la lipofectamina con medio adicionado con suero y antibióticos.
8. Incuba las células a 37°C por 48 h antes de probar la expresión del transgen.

Ensayo de luciferasa

Preparación de los reactivos:

- 1X PLB: Agrega un volumen de 5X Passive Lysis Buffer (PLB) a cuatro volúmenes de agua destilada (dura menos de un mes).

378 µL 5X PLB + 1512 µL H₂O destilada

- Stop and Glo Reagent: Agrega 2.1 mL de 100X Stop and Glo Substrate a 105 mL de Stop and Glo Buffer en el frasco ámbar provisto, vortexea 10 s y almacena a -20°C por 15 días. Para menores cantidades de 1X Stop and Glo Reagent: 0.2 mL de 50X Stop and Glo Substrate en 10 mL de Stop and Glo Buffer.

7.5 µL Stop and Glo + 742.5 µL Stop and Glo Buffer

Lisis

9. Elimina el medio de las células.
10. Lava las células con PBS 1X, dos veces.
11. Tripsiniza las células con 200 µL e incuba por 3min.

12. Inactiva con medio complementado con suero, coloca las células en un tubo de 1.5 mL y centrifuga a 1200 g durante 5 min.
13. Elimina el medio y vuelve a lavar con PBS 1X dos veces.
14. Agrega 70 µL de 1X PLB a cada pozo y vortexea el cultivo por 15 s.
15. Guarda las células a -80°C (puedes detenerte en este paso).
16. Descongela las células y vuelve a congelar a -80°C.
17. Centrifuga a máxima velocidad (18,000 g) durante 10 min y recupera el sobrenadante en un tubo nuevo.

Medición de luciferasa y Renilla

1. Coloca 25 µL del lisado y 25 µL de LAR II al tubo para luminómetro (tubos para citometría lavados con agua destilada).
2. Presiona start en el luminómetro.
3. Agrega 25 µL de Stop and Glo Reagent, mezcla suavemente y vuelve a presionar start en el luminómetro.

Características del luminómetro

MonoLight 3010

Protocolo #3 (LUC/SIN)

Tiempo de medida: 20s

Análisis del estado de metilación del promotor del *miRNA-125b1*

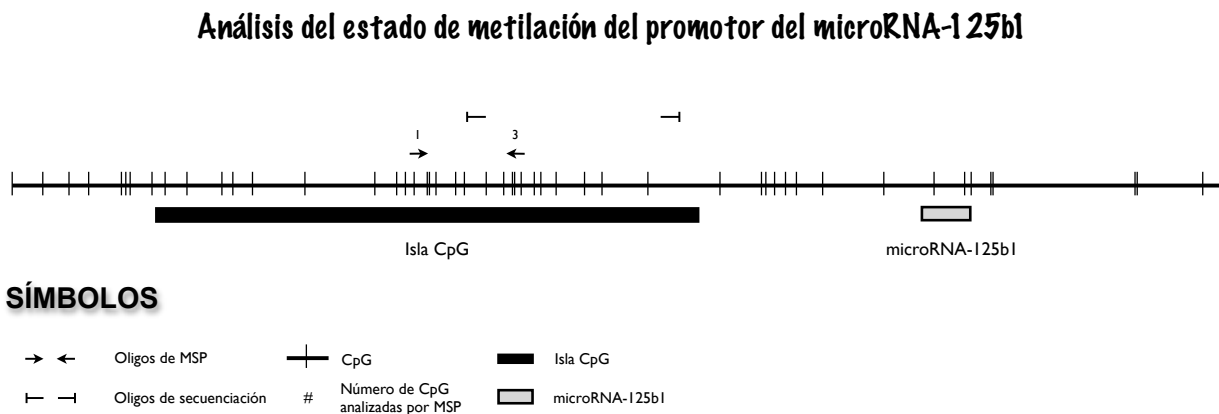


Figura 29. **Análisis del estado de metilación del promotor del *microRNA-125b1***. Se analizó la metilación de la isla CpG (barra negra) del promotor del *microRNA-125b1* por MS-PCR y secuenciación. Los oligos diseñados para MSP y secuenciación se muestran con flechas (→) y flechas de bloqueo (—), respectivamente.

Secuencia:

CGGCACAGGAAAGCCCCACTTCCAGTCTGATGAGGAAAGCGACAATCTATCAGGTAC
AGAACCAGGGGCTGTCTGCCAAGATGGAGGGGAATTATGCTTCGGATTCTCTGAAAT

ATTGGCCAAAGGCTTCAAAGAATCCGCAGCGGGAGGTGCGGGGGGAATGTCTCTCC
 CCAGCCCGCACCCAGCCCTTCCCAGTTGGTGTCTAGCAAATGACAGCCCTGGTGCTCG
 CTCTTGGTGATTTGGCCTTGACTTCAGCCAAGCAGCTGATGCAGACGAAGCCTCCGT
 TTGCAGGACTGGCAAAGTGCAGCGCTAAAGAAAGAAGGAAGAAATTTTTCAAAAAGGAG
 GTCTGGGGAGGTTTCATACTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTTTTTTAATTTTAAGTGAAT
 ATTTTCGAAATTTGATCAGTTCCAGCCCTGCCCTCCACTGCCACCCAAGTGGCGTTTTT
 TCTCTCGTCAAAGCATAAGCTACAGAGTTACAGTCTCGAGATT****TGGTGTATCGCTTCC**
TGCCCCCGCCTCGCCTCGCGCGCGCGCGTTCTCGGTCTCTATTGAAACACCTCGCC**
 CAGCCTAGCCGACTGAGAGCTCTCATTTTTCCCGCCTTGCTCGGG"**ATGGTGGCAGAG**
GAGGCTGTG"CGGGCCC****CGCTCCGCTTCCAATGGGT**GAGTTCAGAACGCTATTG**
GTCTTTACACTTCTATAGCCTCGGAATCCTACTTCTTGGTCTTCTCGCTTTGAAAACCCG
 ATTTCTATGATTTTTGCATGGCGGATACTTGGCGTGGGGGAAAGAGATGGCTCGTATTT
 TCTCTTCAGTCATTTGTGCTAGTCCGTAATAAAGCTTTGAAAAGAGACTAAATCGTTAT
 TGTAGA"**CTATGGTTTTAAAACTTGGGC**"ATTTCTGAGTCTGTGCATATTATTTCCGT
 TTTAGTGAAGTATTTGCCCAAATCTTGAAAGAGTTTTCTCTGATGTACTCGTGATCGTA
 TGTGTATGTGCGTGATTGTATATGCGCCCCCAGATACTGCGTATGTGTGTATATATGTAT
 TAGGCTTAAACGGAATCTCAATTTGTGAAGGAAAGGAGCTTAGAGAAGAAATACCATA
 CCACCTGTTTGTGCATCTTAGTTATGAACCTCGAACAGAAATTGCCTGTCAATCTTGT
 TTTGCTTTGCTTTGTCTCAAGAAAGAAAACATTGTT**GGCTCCTCTCAGTCCCTGAGA**
CCCTAACTTGTGATGTTTACCGTTTAAATCCACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCTGCGAG
 TCGTGCTTTTGCATCCTGGAATTTGGTGAATTTATTCTTTAAAGCAAAAACAAAAGA
 AAAGAAAGTTTGTCTGAGGTGATTGAGTATACCTCTGAGGTTTTTCATTGTTAGATGGGA
 TCAGGTGACCAGAGAGTGGCAGCTCCTGGATTTCTGTTAAAGTAGGTATATATTTTGCT
 TTAATAGCGTGTTGGCTGCTATGTGTATGTATGCATGTTATTGATGCCTGAGGCTTGTG
 GAACTCATCTGCCTGGTCTATTCCTTGAGAGCAACACGCAGTAGTATACGAGCGTA

Isla CpG - Tachado

CpG - Subrayado

miR-125b1 - En negritas

Oligos para MSP - En negritas entre **

Oligos para secuenciación - En negritas entre ++

Extracción de DNA de líneas celulares

1. Cultivar las líneas celulares en cajas p100 y *scrappear* cuando esten a un 80% de confluencia. Centrifugar a 3500g y eliminar el sobreadante.
2. Adicionar 0.8mL de buffer SSC 1X y resuspender con pipeta. Centrifugar a 3500g por 5 min y retirar todo el sobrenadante.
3. Adicionar 100uL de acetato de sodio (NaOAc) 0.2 M y mezclar.
4. Adicionar 300uL de NaOAc 0.2 M y mezclar.
5. Adicionar 25uL de SDS al 10% y 6uL de proteinasa K (20 mg/mL en NaOAc 0.2 M). Mezclar adecuadamente.
6. Incubar toda la noche a 55 ° C.
7. Adicionar 125uL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y mezclar suavemente. Centrifugar a 3500g por 5 min.
8. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo. Adicionar 125uL de cloroformo, mezclar suavemente y centrifugar a 3500g por 5 min.

9. Recuperar la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar 1mL de etanol absoluto frío (-20 ° C)
10. Hacer el spooling y pasar el material a un tubo nuevo.
11. Adicionar alcohol al 70% frío hasta llenar el tubo y mezclar.
12. Centrifugar a 3500g por 2 min.
13. Eliminar el alcohol con una punta y dejar secando a 55°C o a temperatura ambiente en un lugar sin flujo de aire.
14. Resuspender en TE (10/0.1) incubando a 55° C durante 24 h.
15. Guardar a -20°C.

20X SSC BUFFER

3M Cloruro de sodio

0.52M Citrato de sodio

Ajusta el pH a 7.0, se afora a 1 L y se esteriliza en autoclave.

Para obtener 1X SSC hay que diluir 1:20 la solución *stock*

TE BUFFER

10mM Tris-HCl

1mM EDTA

Esteriliza en autoclave y almacena a temperatura ambiente.

Conversión por bisulfito de sodio

1. Colocar 1 µg de DNA en un volumen de 18 µL.
2. Calentar por 2 min a 95°C y pasar inmediatamente a hielo por 2-5 min.
3. Desnaturalizar el DNA en un volumen final de 20 µL añadiendo 2 µL de NaOH 3M (concentración final 0.3M) e incubar 5 min a 37°C.
4. A la par de los pasos 2 y 3, preparar una solución de Hidroquinona (Sigma, H-9003) 100 mM y de bisulfito de sodio (Sigma, S-9000) 3M. Ajustar el bisulfito de sodio a pH 5 con NaOH 10 M.
5. Agregar 12 µL de hidroquinona 10 mM (diluir el stock preparado 1:10) al DNA desnaturalizado, mezclar con la pipeta (la solución se pone ligeramente amarilla) y posteriormente, añadir 208 µL de la solución de bisulfito de sodio. Mezclar ligeramente con el vórtex y añadir 100 µL de aceite mineral.
6. Incubar a 50°C de 12 a 16 horas en oscuridad.
7. Retirar el aceite mineral (congelar a -70°C por 15 min aproximadamente y retirar el aceite no congelado con pipeta)
8. Remover el bisulfito pasando la muestra por las columnas Wizard (Promega, A- 7280) y eluir en 50 µl de agua bidestilada.
9. Añadir 5.5 µL de NaOH 3M e incubar 15 min a 37°C
10. Añadir 20 µg de glicógeno para precipitar y 33.3 µL de acetato de amonio 5M pH 7.0 mezclar por vórtex y añadir 300 µL de etanol 100%. Precipitar por 4 horas a -70°C.
11. Centrifugar a 13,000 g por 1 h a 4°C, retirar el etanol, lavar el pellet con 300 µL de etanol 70%, dejar secar el pellet y resuspender la muestra en 30 µL de H₂O bidestilada.
12. Analizar por PCR y guardar a -20°C.

Oligos para MS-PCR (Producto: 162 pb)

Metilado (M)

FW - TGGTGTATCGTTTTTTGTTTTTC

RV - ACCCATTTCGAAACGAAAC

No metilado (U)

FW - ATTTGGTGTATTGTTTTTTGTTTTT

RV - CTCACCCATTCAAACAAAAC

Oligos para secuenciación (Producto: 271 pb)

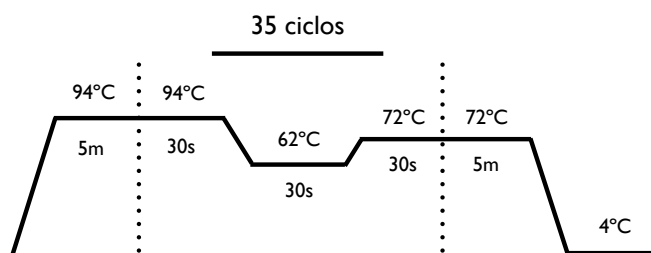
FW - ATGGTGTATAGGAGGTTGTG

RV - ACCCAAATTTTAAAACCATAA

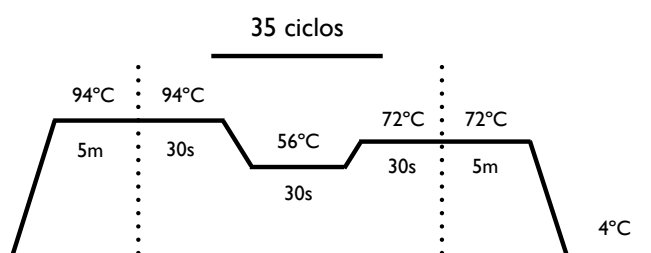
Condiciones del PCR para MS-PCR y secuenciación

Reactivo	1RX
dNTPs [10 mM]	0.5µL
MgCl ₂ [50 mM]	1µL
Buffer para PCR 10X	2.5µL
Primer FW [10 µM]	0.5µL
Primer RV [10 µM]	0.5µL
Taq DNA Pol Platinum [5 U/µL]	0.1µL
DNA [≈50 ng]	1µL
H ₂ O	18.9µL

PCR sensible a metilación (MS-PCR)



Bisulfito-secuenciación



Clonación y secuenciación del fragmento de secuenciación con el plásmido pTZ57R/T

Se ligó el fragmento de PCR para secuenciación en el vector de clonación pTZ57R/T, se transformaron las bacterias por choque térmico y se extrajo el plásmido de ocho colonias usando el kit Plasmid Mini Kit (QIAGEN Cat No. 27106). Los plásmidos se secuenciaron en la unidad de secuenciación de Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

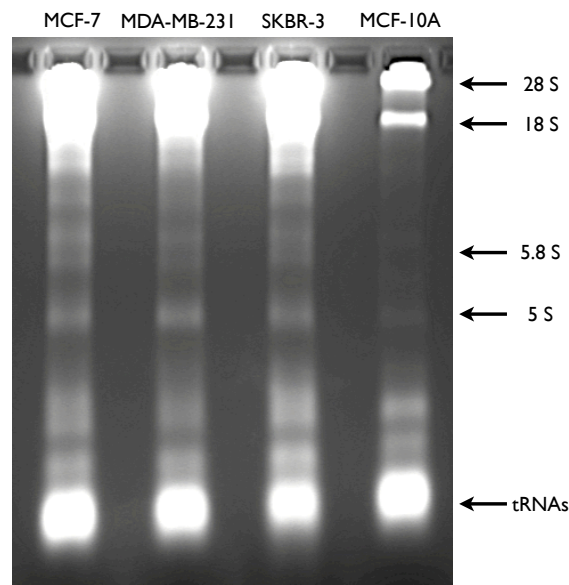
Análisis de los niveles de expresión del *miR-125b1*

Extracción de RNA total

1. Cultivar las líneas celulares en cajas p60 y despegar cuando lleguen a un 90% de confluencia. Centrifugar a 3500 g y eliminar el sobrenadante.
2. Agregar 1 mL de TRIzol y resuspender el botón con la pipeta. Incubar el homogenizado por 5 min a temperatura ambiente.
3. Agregar 0.2 mL de cloroformo y mezclar vigorosamente con el vórtex (15 s). Incubar a temperatura ambiente por 2-3 m.
4. Centrifugar las muestras a 12,000 g por 15 min (4°C).
5. Recuperar la fase acuosa y colocarla en un tubo nuevo.
6. Agregar 0.5 mL de alcohol isopropílico e incubar por 5 min.
7. Centrifugar a 12,000 g por 10 min (4°C) y eliminar el sobrenadante.
8. Agregar 1 mL de etanol al 70%, mezclar y centrifugar a 7,500 g por 5 min (4°C).
9. Eliminar todo el sobrenadante y dejar secando. Resuspender en 30 µL de H₂O libre de RNAsas.
10. Cuantificar la concentración de RNA por NanoDrop y determinar la integridad del RNA con un gel de agarosa desnaturalizante al 4%.

Integridad de RNAs pequeños

Para determinar la integridad del RNA, se corrió un gel desnaturalizante de agarosa al 4%. Con este gel, se observa la integridad de RNAs menores a 500 pb.



Transcripción reversa

Usa de 1-10 ng de RNA total por cada 15 µL de reacción de RT.
Descongela los componentes del Kit para RT y los primers (vortexea) en hielo y baja con la nanofuga.

1. En un tubo de polipropileno, prepara la siguiente reacción:

Componente	Volumen para el <i>MasterMix</i> (μL)
100mM dNTPs (con dTTP)	0.15
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/uL)	1.00
10X reverse Transcriptor Buffer	1.50
RNase Inhibitor (20U/uL)	0.19
Agua libre de nucleasas	4.16
Volumen final	7.00

a) Cada 15 μL de reacción de RT consiste en:

- 7 μL de *MasterMix*
- 3 μL de primer
- 5 μL de la muestra de RNA

2. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.

3. Coloca el *MasterMix* en hielo hasta que se prepare la reacción de miRNAs.

Preparación de la reacción de RT:

1. Para cada 15 μL de reacción de RT, mezcla 7 μL de RT *MasterMix* con 5 μL de RNA total (1-10 ng) y colocalo en un tubo de polipropileno de 0.2 mL.

2. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga (no exceder los 5 min o las 2000 g).

3. Agrega 3 μL de primer para RT a cada muestra.

4. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.

5. Incuba el tubo en hielo por 5 min y mantenlo en hielo hasta que lo cargues en el termociclador.

Programa del termociclador:

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	--	4

6. Coloca el volumen de la reacción en el termociclador (15 μL)

7. Carga los tubos de reacción en el plato del termociclador.

8. Comienza la corrida de transcripción reversa.

Amplificación por PCR en tiempo real con plataforma TaqMan

- Protege de la luz los componentes de la reacción.
- Mezcla la TaqMan Universal PCR *MasterMix* muy suavemente (con la punta de una pipeta, no resuspendas)
- Prepara la reacción antes de colocarla en el plato de reacción.
- Escala los volúmenes de acuerdo a la cantidad de reacciones que vayas a utilizar.

Componente	Volumen (μL)/ 20 μL de reacción
TaqMan MicroRNA Assay (20X)	1.00
Producto de la reacción de RT	1.33
TaqMan 2X Universal PCR MasterMix	10.00
Agua libre de nucleasas	7.67
Volumen final	20

Preparación del plato de reacción para PCR

1. Hacer el cálculo del volumen total de tus muestras.
2. En hielo, mezcla en la siguiente relación: 10 μL de TaqMan 2X Universal PCR *MasterMix* y 7.67 μL de agua libre de nucleasas (haciendo un volumen final de 17.67 μL por muestra).
3. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.
4. Coloca los 17.67 μL de la mezcla anterior en un tubo para PCR.
5. Transfiere 1 μL de 20X TaqMan MicroRNA Assay *Mix* en cada tubo.
6. Transfiere 1.33 μL del producto de RT al tubo de PCR.
7. Mezcla gentilmente y baja el volumen con la nanofuga.
8. Prepara el plato de reacción para colocar 20 μL de la mezcla en los pozos.
9. Sella el plato colocando una cubierta adhesivo, después centrifuga y elimina las burbujas.

Parámetros para el termociclador

Parámetro	Valor
Modo de corrida	9600 emulation
Volumen de la muestra	20 μL
Parámetros del termociclador	Paso AmpliTaq Gold Enzyme Activation PCR HOLD Ciclos: 40 Desnat Anidado/Extensión Tiempo 10 min 15s 60s Temp ($^{\circ}\text{C}$) 95 95 60
Ajuste de Autoincremento	Default (0)
Ajuste de Rampa	Default (Estándar)
Datos	Default (60 $^{\circ}\text{C}$)

Para correr la placa:

1. En el software SDS, abre el documento que corresponde a la reacción del plato.
2. Carga el plato de reacción en el instrumento.
3. Comenzar la corrida.

Análisis estadístico

Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes de cada uno de los datos obtenidos. Las diferencias entre cada grupo (datos obtenidos de las líneas celulares y la línea de mama no transformada) fueron analizadas usando la prueba *t*-Student. Los datos fueron considerados significativos cuando mostraban una $p < 0.001$.

REFERENCIAS

Artículos

Anastasiadou C, Malousi A, Maglaveras N, Kouidou S (2011), Human epigenome data reveal increased CpG methylation in alternatively spliced sites and putative exonic splicing enhancers, *DNA and cell biology*, 30(5):267-75.

Balmain A, Gray J, Ponder B (2003), The genetics and genomics of cancer, *Nature Genetics Supplement*, 33:238-244.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007), High-resolution profiling of histone methylations in the human genome, *Cell*, 129(4): 823-837.

Baylin SB, Jones PA (2011), A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications, *Nature Reviews in Cancer*, 11: 726-734.

Bell O, Tiwari VK, Thoma NH, Schübeler D (2011), Determinants and dynamics of genome accessibility, *Nature reviews in Genetics*, 12: 554-564.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA (2006), Human cancers express a mutator phenotype, *PNAS*, 103(48): 18238-18248.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985), A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA, *Cell*, 40: 91-99.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006), RNA polymerase III transcribes human miRNAs, *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12): 1097-1101.

Bueno MJ, Gómez de Cedrón M, Gómez-López G, Pérez de Castro I, Di Lisio L, Montes-Moreno S, Martínez N, Guerrero M, Sánchez-Martínez R, Santos J, Pisano DG, Piris MA, Fernández-Piqueras J, Malumbres M (2011), Combinatorial effects of miRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway, *Blood*, 117(23): 6255-6266.

Butler JEF, Kadonaga JT (2002), The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes and Development*, 16: 2583-2592.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004), Human miRNAs genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, PNAS, 101(9): 2999-3004.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004), Human miRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, RNA, 10: 1957-1966.

Cairo S, Wang Y, de Reyniès A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, Fabre M, McClelland M, Wang XW, Croce CM, Buendia MA (2010), Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer, PNAS, 107(47): 20471-20476.

Chadwick BP, Willard HF (2001), A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome, Journal of Cell Biology, 152(2): 375-384.

Chistodoulou F, Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, Snyman H, Hannon GJ, Bork P, Arendt D (2010), Ancient animal miRNAs and the evolution of tissue identity, Nature, 463: 1084-1090.

Chong MMW, Zhang G, Cheloufi S, Neubert TA, Hannon GJ, Littman DR (2010), Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery, Genes and development, 24:1951-1960.

Draker R, Cheung P (2009), Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z, Biochemistry and cell biology, 89(1): 19-25.

Duesberg P, Li R (2003), Multistep Carcinogenesis: A Chain Reaction of Aneuploidizations, Cell Cycle, 2 (3): 202-210.

Esteller M (2011), Epigenetic changes in cancer, Biology Reports, 3: 9-14.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006), The epigenetic progenitor origin of human cancer, Nature Reviews in Genetics, 7: 21-33.

Felsenfeld G, Groudine M (2003), Controlling the double helix, Nature, 421: 448-452.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008), Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, Nature Reviews in Genetics, 9: 102-114.

Flemming W (1965), HISTORICAL PAPER. CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESS, Journal of Cell Biology, 25 (SUPPL): 1-69 [Reimpresión].

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005), Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, PNAS, 102(30): 10604-10609.

Gamble MJ, Kraus WL (2010), Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: from genomics to cell biology, Cell Cycle, 9(13): 2568-2574.

Goll MG, Bestor TH (2005), Eukaryotic cytosine methyltransferases, Annual Reviews in Biochemistry, 74: 481-514.

Guan Y, Yao H, Zheng Z, Qiu G, Sun K (2011), MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation, *International Journal of Cancer*, 128(10): 2274-2283.

Handoko L, Xu H, Li G, Ngan CY, Chew E, Schnapp M, Lee CW, Ye C, Ping JL, Mulawadi F, Wong E, Sheng J, Zhang Y, Poh T, Chan CS, Kunarso G, Shahab A, Bourque G, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Ruan Y, Wei CL (2011), CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells, *Nature Genetics*, 43(7): 630-638.

Hanahan D, Weinberg RA (2000), Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011), Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144: 646-674.

Hannafon BN, Sebastiani P, de las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL (2011), Expression of miRNAs and their gene targets are dysregulated in pre-invasive breast cancer, *Breast Cancer Research*, 13(2): R24.

Hartley PD, Madhani HD (2009), Mechanism that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity, *Cell*, 137: 445-458.

Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K (2004), Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance, *TRENDS in Genetics*, 20(7): 320-326.

Huang L, Luo J, Cai Q, Pan Q, Zeng H, Guo Z, Dong W, Huang J, Lin T (2011), MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3, *International Journal of Cancer*, 128 (8): 1758-1769.

Huntzinger E, Izaurralde E (2011), Gene silencing by miRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay, *Nature Reviews Genetics*, 12: 99-110.

Illingworth RS, Bird AP (2009), CpG islands - 'A rough guide', *FEBS Letters*, 583:1713-1720.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CC, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Uerzoli P, Negrini M, Croce CM (2005), MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer, *Cancer Research*, 65(16): 7065-7070.

Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D (2007), Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview, *Biomedicine and pharmacotherapy*, 61(10): 640-658.

Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M (2009), Impaired recruitment of the histone methyltransferase DOT1L contributes to the incomplete reactivation of tumor suppressor genes upon DNA demethylation, *Oncogene*, 28: 4212-4224.

Jeltsch A (2006), On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme, *Epigenetics*, 1:63-66.

Jeltsch A, Nellen W, Lyko F (2006), Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31: 306-308.

Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G (2009), H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions, *Nature Genetics*, 41(8): 941-947.

Jin C, Felsenfeld G (2007), Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z, *Genes and Development*, 21: 1519-1529.

Jiang C, Pugh F (2009), Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics, *Nature Reviews in Genetics*, 10: 161-172.

Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JWM, Kadonaga JT (2008), The RNA Polymerase II Core Promoter - the Gateway to Transcription, *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3): 253-259.

Klose RJ, Bird AP (2006), Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31(2): 89-97.

Knudsen S (1999), Promoter 2.0: for the recognition of PolII promoter sequences, *Bioinformatics*, 15: 356-361.

Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B (2009), MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53, *Genes and Development*, 23(7): 862-876.

Li B, Carey M, Workman JL (2007), The Role of Chromatin during Transcription, *Cell*, 128: 707-719.

Li BH, Zhou JS, Ye F, Cheng XD, Zhou CY, Lu WG, Xie X (2011), Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect thought targeting PLK1 protein, *European Journal of Cancer*, 47(14): 2166-2174.

Li M, Li J, Ding X, He M, Cheng S-Y (2010), microRNA and Cancer, *The AAPS Journal*, 12 (3): 309-317.

Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C (2007), Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genomics*, 8:166-186.

Liu LH, Li H, Li JP, Zhong H, Zhang HC, Chen J, Xiao T (2011), miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(1-2): 31-38.

Lobert S, Jefferson B, Morris K (2011), Regulation of β -tubulin isotypes by micro-RNA 100 in MCF7 breast cancer cells, *Cytoskeleton*, 68(6): 355-362.

Loeb LA (1991), Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis, *Cancer Research*, 51: 3075-3079.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005), MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 435(7043): 834-838.

Lujambio A, Esteller M (2007), CpG Island Hypermethylation of Tumor Suppressor miRNAs in Human Cancer, *Cell Cycle*, 6(12): 1455-1459.

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Gitt A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M (2007), Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells, *Cancer Research*, 67(4): 1424-1429.

Lunger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997), Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature*, 389(6648): 251-260.

Maston GA, Evans SK, Green MR (2006), Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome, *Annual Reviews in Human Genetics*, 7: 29-59.

Meister G, Tuschli T (2004), Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, 431: 343-349.

Mellor J (2006), Dynamic nucleosomes and gene transcription, *TRENDS in Genetics*, 22(6): 320-329.

Melo S, Esteller M (2010), Dysregulation of miRNAs in cancer: playing with fire, *FEBS Letters*, 585(13): 2087-99.

Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006), Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nature Reviews in Cancer*, 6: 924-935.

Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, Zhu H, Gunaratne PH, Reid JG, Olokpa E, Itamochi H, Ueno NT, Hawkins SM, Anderson ML, Matzuk MM (2010), A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer, *Molecular Endocrinology*, 24(2): 447-463.

Ng WL, Yan D, Zhang X, Mo YY, Wang Y (2010), Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J, *DNA Repair*, 9(11): 1170-1175.

Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IM, Vogelstein B, Lengauer C (2002), The role of chromosomal instability in tumor initiation, *PNAS*, 99(25): 16226-16231.

Pang Y, Young CYF, Yuan H (2010), Mirnas and prostate cancer, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(6): 363-369.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000), Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406(6797): 747-752.

Petrelli A, Perra A, Schernhuber K, Cargnelutti M, Salvi A, Migliore C, Ghiso E, Benetti A, Barlati S, Ledda-Columbano GM, Portolani N, De Petro G, Columbano A, Giordano S (2012), Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression, *Oncogene*, [En prensa].

Prokhortchouk E, Defossez PA (2008), The cell biology of DNA methylation in mammals, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783: 2167-2173.

Rous P (1911), A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells, *Journal of Experimental Medicine*, 13: 397-411.

Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA (2007), mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies, *Nature Reviews in Genetics*, 8: 424-436.

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC (2007), Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b, *The journal of biological chemistry*, 282(2):1479-1486.

Shabalina SA, Koonin EV (2008), Origins and evolution of eukaryotic RNA interference, *Trends in Ecology and Evolution*, 23(10): 578-587.

Shahbazian MD, Grunstein M (2007), Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation, *Annual Review in Biochemistry*, 76: 75-100.

Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E, Peter ME (2007), Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer, *PNAS*, 104(27): 11400-11405.

Shenouda SK, Alahari SK (2009), MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?, *Cancer Metastasis Reviews*, 28: 369-378.

Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen BJ, Van Den Berg A (2010), Mirnas, macrocontrol: Regulation of microRNA processing, *RNA*, 16: 1087-1095.

Soto-Reyes E, Recillas-Targa F (2009), Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines, *Oncogene*, 29(15):2217-2227.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK (1976), DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA, *Nature*, 260(5547): 170-173.

Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Nakamura Y, Suyama A, Sakaki Y, Morishita S, Okubo K, Sugano S (2001), Identification and characterization of the promoter regions of 1031 kinds of human genes, *Genome Research*, 11:677-684.

Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, Kurumizaka H (2011), Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A, *Nature*, 476(7359):232-235.

Talbot SJ, Crawford DH (2004), Viruses and tumours - an update, *European Journal of Cancer*, 40: 1998-2005.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999), CpG island methylator phenotype in colorectal cancer, *PNAS*, 96: 8681-8686.

Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003), NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, *Nucleic Acids Research* 31: 3688-3691.

Vogelstein B, Kinzler KW (1993), The multistep nature of cancer, *Trends in Genetics*, 9: 138-141.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007), Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, *Nature Genetics*, 39 (4): 457-466.

Weber M, Schübeler D (2007), Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark, *Current Opinion in Cell Biology*, 19: 273-280.

Xia HF, He TZ, Liu CM, Cui Y, Song PP, Jin XH, Ma X (2009), MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 23(4-6):347-358.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC (2006), Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Cell*, 9(3): 189-198.

Yang MQ, Elnitski LL (2008), Diversity of core promoter elements comprising human bidirectional promoters, *BMC Genomics*, 9 (Suppl 2): S3.

Zhang S, Hao J, Xie F, Hu X, Liu C, Tong J, Zhou J, Wu J, Shao C (2011), Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development, *Carcinogenesis*, 32(8): 1183-1189.

Zhang Y, Yan LX, Wu QN, Du ZM, Chen J, Liao DZ, Huang MY, Hou JH, Wu QL, Zeng MS, Huang WL, Zeng YX, Shao JY (2011), miR-125b1 is Methylated and Functions as A Tumor Suppressor by Regulating the ETS1 proto-oncogene in Human Invasive Breast Cancer, *Cancer Research*, 71(10): 3552-3562.

Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, Xiong W, Li G, Lu J, Fodstad O, Riker AI, Tan M (2010), MicroRNA-125b Confers the Resistance of Breast Cancer Cells to Paclitaxel through Suppression of Pro-apoptotic Bcl-2 Antagonist Killer 1 (Bak1) Expression, *Journal of Biological Chemistry*, 285(28): 21496-21507.

Libros

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML, *Epigenetics*, CSHL Press, 1ª edición, Estados Unidos de América, 2006, pp. 502.

Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF, *The RNA World*, CSHL Press, 3ª edición, Estados Unidos de América, 2006, pp 768.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E, *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, 6ª edición, Estados Unidos de América, 2003.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J, *Molecular Biology of the Cell*, WH Freeman, 5º edición, Nueva York, 2004, pp. 963.

Mendelsohn AC, Howley A, Israel S, Gray JE, Lindsten T, *The Molecular Basis of Cancer*, Saunders Elsevier, 3ª edición, Estados Unidos de América, 2008, pp 757.

Nelson DL, Cox MM, Lehninger Principles of Biochemistry, Freeman, 5º edición, Nueva York, 2008, pp. 1158.

Páginas web

EMBL-EBI

- <http://www.ebi.ac.uk/>

Genome Browser UCSC

- <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Gene Expression Omnibus Número de acceso: GSE2564

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2564&submit.x=13&submit.y=6>

Global Burden of Disease (2004)

- http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf

GLOBOCAN (2008)

- <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH>

High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome

- <http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lmi/epigenomes/hgtcell.aspx>

miRanda

- <http://www.microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>

Organización Mundial de la Salud, 2008 (OMS, 2008)

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>

PicTar-Vert

- <http://pictar.mdc-berlin.de/>

TargetScan

- <http://www.targetscan.org/>