Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Microbiología

"Análisis de la metilación en los promotores de *BAG4* y *DEK* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, tratadas con epigalocatequina-3-galato."

Tesis para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

José Luis Martinez Vaquero

Marta Elena Hernández Caballero

Directora

Juana Narváez Morales

Co-Directora

Puebla, febrero de 2021

Agradecimientos.

Por su gran paciencia, la confianza depositada en mí y la fe hacia mí les agradezco a mis padres y a mis directoras de tesis.

Índice

1. Resumen 4

2. Introducción 5

3. Antecedentes 8

3.1 *DEK* y cáncer 8

***3.2 BAG4* y cáncer** 10

3.3 EGCG y cáncer 11

4. Justificación y planteamiento del problema 13

4.1 Pregunta 13

4.2 Hipótesis 13

4.3 Justificación 13

5. Objetivos 14

5.1. Objetivo general 14

5.2. Objetivos específicos 14

6. Materiales y métodos 14

6.1 Cultivo de las líneas celulares 14

6.2 Determinación de la toxicidad de la EGCG en las líneas celulares 15

6.3 Determinación de la expresión de los transcritos de *DEK* y *BAG4* por qRT-PCR 17

6.4 Determinación de la metilación de los promotores de *DEK y BAG4*, mediante conversión de ADN por bisulfito sódico y MSP. 20

6.5 Determinación de la secuencia de los amplicones de la MSP 24

7. Resultados 25

7.1 Toxicidad de la EGCG en las líneas celulares 25

7.2 Determinación de la expresión de los transcritos de *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares. 32

7.2.1 Validación de oligonucleótidos para qPCR 32

7.2.2 Extracción de ARN 35

7.2.3 Cuantificación de los transcritos de los genes *DEK* y *BAG4.* 40

7.3 Determinación del estado de metilacion en los promotores de *DEK* y *BAG4*. 44

7.3.1 Análisis de las secuencias en METH PRIMER 2.0 44

7.3.2 Validación de oligonucleótidos para MSP 46

7.3.3 Extracción de ADN genómico. 53

7.3.4 Determinación de la metilación con MSP. 55

7.4 Secuencias de los amplicones. 60
8. Discusión 61
9. Conclusiones 73
10. Bibliografía 73

1. Resumen

La búsqueda de compuestos con efectos anticancerígenos ha significado un considerable esfuerzo desde los inicios de los estudios sobre esta enfermedad hasta ocuparlos en tratamientos. Los compuestos de origen natural han demostrado ser candidatos potenciales para estos propósitos. Entre ellos se encuentra la epigalocatequina-3-galato (EGCG), un compuesto polifenólico del cual se ha reportado tener muchas propiedades, entre ellas, actividad anticancerígena.

Dentro de las causas y evolución del cáncer en la célula se encuentran las de tipo epigenético, entre ellas las aberraciones a nivel de la metilación del ADN. Estas alteraciones desencadenan desregulaciones a nivel del control de la transcripción de genes tan importantes como los supresores de tumores y los oncogenes. Dos oncogenes poco estudiados, *DEK* y *BAG4*, han demostrado su papel e importancia en el desarrollo de procesos tumorales.

La comprensión de los efectos de compuestos de origen natural, como la EGCG y sus efectos a nivel epigenético en los procesos anticancerígenos, proveerá de conocimiento para el entendimiento en el desarrollo de futuros tratamientos y estrategias contra el cáncer.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el estado de metilación en los promotores de los genes *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con la EGCG.

Se emplearon cultivos celulares en condiciones controladas, se realizaron experimentos de exposición a la EGCG y se determinó la supervivencia de las células. Luego, se obtuvieron ARN total y ADN genómico, posteriormente, empleando técnicas como RT-qPCR y MSP se determinó la expresión de los transcritos y los estados de metilación en los promotores de ambos genes estudiados, respectivamente. Finalmente, se secuenciaron los amplicones de la MSP para identificar el estado de metilación de los sitios CpG de estos.

La EGCG tiene múltiples efectos sobre las células, a bajas concentraciones (<25µg/mL) no ocasiona cambios en la metilación sobre los promotores, pero si se identificaron efectos moleculares no reportados anteriormente. Tampoco altera la expresión de los genes *DEK* y *BAG4*, sin embargo, a altas concentraciones (>25µg/mL) si disminuye considerablemente la expresión de estos además de tener efectos citotóxicos altos.

A bajas concentraciones (<25µg/mL) y en cortos lapsos de tiempo (~24h), la EGCG no influye sobre la metilación en los promotores de *DEK* y *BAG4*.

2. Introducción

El cáncer es una enfermedad que afecta a personas de todas las edades y que no discrimina en cuanto a género. Esta patología es descrita como un proceso celular aberrante, caracterizado por un desarrollo anormal en el crecimiento y una proliferación excesiva de las células del propio organismo, el cual desarrolla estructuras muy características, conocidas como tumores (1). Dicha patología puede desarrollarse y estar presente en cualquier órgano y tejido, y no es exclusiva de un sitio específico, e incluso puede presentar más de una variante dentro del mismo sitio anatómico afectado (2).

En la búsqueda para entender los procesos de desarrollo del cáncer, se les ha clasificado mediante sus descripciones anatomopatológicas, histopatológicas, citológicas, inmunológicas y actualmente por sus características genéticas gracias a las nuevas estrategias que hacen un gran uso de técnicas moleculares (1). Estas clasificaciones representan un esfuerzo para entender el proceso de inicio y desarrollo del cáncer, así como para sustentar bases para el desarrollo de estrategias de diagnóstico temprano y terapias con un mayor nivel de eficacia en el tratamiento de la enfermedad.

Múltiples pueden ser las causas que desencadenan a un cáncer (3), dichas causas pueden ser de origen intrínseco, que hace referencia a la participación de ciertos genes que pueden presentar un descontrol en su regulación y conducir a la formación de desarrollos anormales celulares, o por causas extrínsecas que refieren a la exposición a factores ambientales como la exposición a radiación ionizante como no ionizante, la exposición a químicos con presencia de agentes mutagénicos, hasta factores biológicos como virus, entre otros.

En las últimas décadas diversos estudios han reportado la participación de las alteraciones a nivel epigenético en el desarrollo y la progresión de tumores. Dichos cambios epigenéticos son definidos como cambios dentro del genoma, con capacidad heredable, que no necesariamente representan un cambio en la secuencia del ADN (4).

Se han descrito una gran variedad de mecanismos epigenéticos relacionados con el cáncer (5). Dentro de estos se incluyen: regulación génica por la intervención de los microARN (miARN), estabilidad y remodelación de la cromatina junto con la reversibilidad en la modificación de las histonas y la metilación del ADN, la cual es una modificación química de las bases del ADN que conduce a un silenciamiento transcripcional.

Dentro de todas las modificaciones en la metilación de las secuencias de ADN, algunas son encontradas en la estructura de la molécula de la base nitrogenada citosina en la doble cadena. En este nucleótido, dentro de la posición 5' del anillo de la pirimidina, es añadido un grupo metilo, por un grupo de enzimas conocidas como las ADN metiltransferasas, con ayuda del cofactor S-Adenosilmetionina (SAM), el cual es el donador del grupo metilo, por lo que se genera un nucleótido de citosina metilado en el carbono 5 (5mC), dentro de la secuencia del ADN (6). Estas marcas de metilación son altamente reguladas y se encuentran en regiones específicas a lo largo del genoma, donde las citocinas adyacentes a una guanina en el extremo 3', son preferentemente metiladas. Este dinucleótido con potencial de ser metilado es conocido como sitio CpG (7).

Los sitios CpG no se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de todo el genoma humano, se sabe que se encuentran preferentemente en regiones aledañas al sitio de inicio de la transcripción de varios genes y principalmente en el promotor. A un conjunto de sitios CpG muy cercanos entre ellos en una región en específico dentro del genoma se le conoce como islas CpG. (8). En estas regiones CpG, especialmente en los promotores, se les han caracterizado funciones reguladoras como elementos en *cis* para controlar la expresión génica (9).

De acuerdo con la transformación y/o alteración de la función de los genes que participan en el desarrollo de las células tumorales y los procesos cancerígenos, los genes participes en los procesos tumorogénicos son clasificados en dos grandes grupos, los genes supresores de tumores y los oncogenes (4).

Dentro de los niveles de regulación y sus alteraciones, las modificaciones en los estados de metilación de las islas CpG dentro de los promotores son unas de las

causas en las que se describen modificaciones que desencadenan la conversión de una célula normal a tumoral (10).

Una característica fundamental de las células tumorales es la presencia de una hipometilación de los promotores del grupo de los oncogenes y una hipermetilacion de los promotores del grupo de los genes supresores de tumores, lo que desencadena una sobreexpresión de los oncogenes y una disminución de la expresión de los genes supresores de tumores.

En la búsqueda de compuestos anticancerígenos para la prevención y el tratamiento del cáncer, el campo de los compuestos polifenólicos resalta como una propuesta atractiva debido a su gran variedad de moléculas con propiedades prometedoras que pudieran emplearse para estos propósitos (11). Dichos compuestos pueden hallarse en plantas de gran consumo como es el caso de la planta de té verde (*Camellia sinensis*), su infusión es una de las bebidas mayormente consumidas en el mundo (12).

Al consumo de té verde se le han documentado diversas cualidades entre las que destacan mejoras a las funciones cognitivas (13), beneficios a la salud que ayudan a la protección contra la diabetes (14) enfermedades cardiovasculares (15), obesidad (16) y efectos anticancerígenos (17). En los estudios realizados para caracterizar los principios activos del té verde, se han encontrado una gran diversidad de compuestos que se destacan por sus propiedades antioxidantes, no obstante, muchos de ellos presentan diversos efectos a nivel fisiológico y celular. (18).

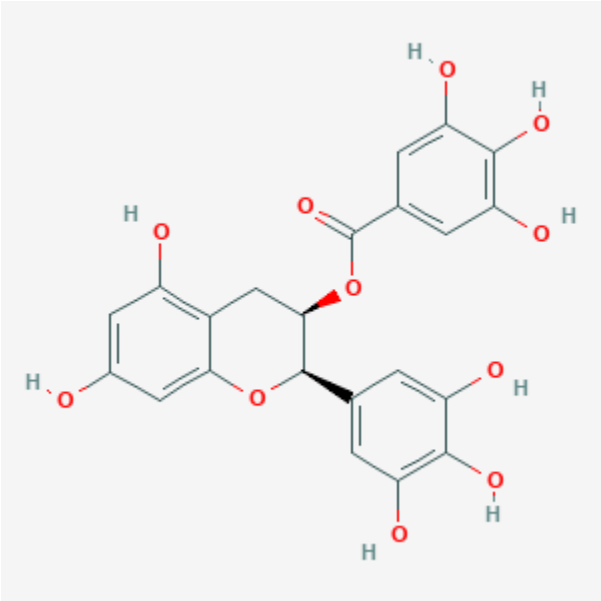


Figura 1. Estructura de la (-)-epigalocatequina-3-O-galato. La (-)-epigalocatequina-3-O-galato es también conocida de forma abreviada como EGCG. La fórmula molecular condesada es $C_{22}H_{18}O_{11}$ y este compuesto tiene un peso molecular de 458.4 g/mol. Nombre por la IUPAC [(2R,3R)-5,7-dihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromen-3-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato. El identificador en PubChem de esta molécula es CID 65064 (19).

La actividad biológica del té verde se debe a las diferentes catequinas y epigalocatequinas galato, las cuales se identifican como los principales antioxidantes contribuyendo aproximadamente al 30% de la capacidad antioxidante del té verde (21). El principal componente activo del té verde es la molécula (-)-epigalocatequina-3-O-galato (Figura 1), la cual se ha estudiado extensamente por sus cualidades, principalmente anticancerígenas, ya que se ha reportado su actividad en la inducción de la apoptosis e inhibición de la tumorogénesis a través de múltiples vías de señalización en células de cáncer de mama (20).

3. Antecedentes

3.1 *DEK* y cáncer

Según la base de datos GenBank (21), el gen *DEK* (número de acceso 7913) es un proto-oncogén localizado en el brazo corto del cromosoma seis (6p22.3) y presenta un tamaño de 40.682 kb. Se encuentra conformado por 13 exones y presenta dos isoformas generadas por “splicing” alternativo las cuales difieren por un exón. De acuerdo con APPRIS 2020_06.v32 (22), plataforma que alberga anotaciones de

isoformas de “splicing” humano, y la base de datos Ensembl (23) se sabe que la isoforma que presenta la función principal es el transcrito maduro DEK-212. Este transcrito tiene un tamaño de aproximadamente 3142 bases, es generado por la unión de 11 exones y al ser traducido genera una proteína de 375 aminoácidos.

La secuencia de referencia del gen *DEK* dentro del genoma se puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NC_000006.12. La secuencia de referencia del transcrito de la isoforma principal del gen *DEK* se puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NM_003472.4. La secuencia de referencia aminoacídica de la isoforma principal del gen *DEK* se puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NP_003463.1.

El producto del gen es una fosfoproteína nuclear no histona, que se encuentra principalmente dentro del núcleo de la célula y en menor medida en el citoplasma. La proteína DEK presenta diversas funciones dentro de la célula, que abarca desde formar parte de la heterocromatina, participar dentro de los mecanismos de reparación del ADN genómico, formar parte de la maquinaria de transcripción de algunos genes y también participa en el complejo del ¨spliseosoma¨ para el “splicing” alternativo de algunos transcritos (25).

DEK es un gen que se encuentra altamente regulado, y es expresado en tejidos donde las células presentan constante proliferación y recambio; así como en células troncales (26).

Inicialmente, *DEK* fue descubierto en una variante de la leucemia mieloide aguda donde el locus se hallaba fusionado a otro cromosoma, ocasionando una translocación y formando una proteína aberrante junto a CAN (una proteína del poro nuclear) (27). En años posteriores fue localizada, como proteína sobre-expresada, y no aberrante, en otros tipos de canceres como en el caso del cáncer hepático (28).

Esta oncoproteína se ha encontrado altamente sobre-expresada en diversos tumores. En estudios de cáncer de piel (melanoma) se halló una relación entre la progresión y el desarrollo de los tumores sólidos con respecto al aumento de la

proteína DEK, por lo que se propuso a esta misma como un posible marcador de pronóstico de supervivencia ante dicha patología (29).

El melanoma no es la única variante de cáncer en donde se propone a *DEK* como marcador de supervivencia, también en estudios de biopsias provenientes de adenocarcinoma ductal pancreático se halló que la sobreexpresión de *DEK* puede estar asociada a un mal pronóstico (30).

En estudios donde han trabajado con tejidos provenientes de cáncer mamario, se ha encontrado una asociación más con la sobreexpresión de *DEK* y un mal pronóstico de la enfermedad. Donde también se propone como un posible marcador para determinar la evolución de esta enfermedad en las primeras etapas, y a su vez como un indicador en posibles reincidencias (31).

Un caso más donde la sobreexpresión de *DEK* se encuentra asociada a un mal pronóstico de la enfermedad es en estudios realizados en adenocarcinomas gástricos, donde se halló una fuerte relación con el tamaño del tumor, grado de tumor e incidencia de metástasis, a la par de otros marcadores ampliamente usados y aceptados, como Ki-67 (32)**.**

3.2 BAG4 y cáncer

Según la base de datos GenBank (21), el gen *BAG4* (número de acceso 9530), también conocido como SODD, es un atanatogen (gen involucrado en la inhibición de las vías apoptóticas) asociado a BCL2 y está localizado en el brazo corto del cromosoma ocho (8p11.23), donde presenta un tamaño de 36.447 kb. *BAG4* también es considerado un proto-oncogen. Este gen está conformado por 5 exones y presenta dos isoformas por “splicing” alternativo las cuales difieren por un exón. Según APPRIS 2020_06.v32 (22) y Ensembl (23) se sabe que la isoforma que presenta la función principal es el transcrito BAG4-201. Éste transcrito ya maduro tiene un tamaño de aproximadamente 4197 bases, es generado por la unión de 5 exones y al ser traducido genera una proteína de 457 aminoácidos.

La secuencia de referencia del gen *BAG4* dentro del genoma se puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NC_000008.11. La secuencia de referencia del transcrito de la isoforma principal del gen *BAG4* se

puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NM_004874.4. La secuencia de referencia aminoacídica de la isoforma principal del gen *BAG4* se puede encontrar en la base de datos Ref-Seq (24) con el número de acceso NP_004865.1.

El producto del gen es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas relacionadas a BAG1 y se encuentra dentro del citoplasma de la célula. Esta proteína se caracteriza principalmente por la función antiapoptótica que confiere a la célula (33).

En estudios donde buscan las proteínas asociadas a las características clínico-patológicas de agresividad del cáncer de ovario, se hallaron de entre todas las proteínas dentro de la familia BAG, a BAG4 como la principal oncoproteína relacionada a la supervivencia de las pacientes analizadas en terapia, por lo que se propone como un biomarcador en la evolución de la enfermedad durante el tratamiento, en donde el aumento de esta da un pronóstico desfavorable (34).

Por otro lado, experimentos realizados *in vitro* en donde emplean como modelo líneas celulares obtenidas de un melanoma, se determinó que el sileciamiento a nivel traduccional del transcrito de *BAG4* por medio de un microARN (miR-26a) fue suficiente para ocasionar una rápida muerte en estas células, donde determinaron la importancia de esta proteína en las vías de supervivencia para estas células y a su vez proponen a BAG4 como posible blanco terapéutico (35).

Otro caso en donde reportan el papel primordial de la oncoproteína BAG4 en la supervivencia de la célula cancerígena, es en el caso de la resistencia al tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, en donde el fármaco empleado en tumores sólidos (aspirina donadora de oxido nítrico, [NO-aspirina]) es ineficaz para esta variedad de la enfermedad, en la cual, el papel de BAG4 junto con la caspasa-10 es la de inhibir la vía extrínseca de la apoptosis (36).

3.3 EGCG y cáncer

El inicio en la tendencia del estudio profundo de los polifenoles por sus propiedades antioxidantes y los beneficios a la salud arribó como resultado en la búsqueda de su empleo en las terapias contra el cáncer (37). Dicho interés se debe

principalmente al hecho de que las terapias actualmente usadas, como es el caso de la quimioterapia son generalizadas, inespecíficas y agresivas debido a que carecen de discriminación de una célula normal a una célula tumoral. Es por esto que estudiar la actividad antitumoral de compuestos naturales como es el caso de los polifenoles y precisamente el de la EGCG, resaltan como alternativa terapéutica (38).

Dentro de los polifenoles más estudiados se encuentra la EGCG. En varios estudios *in vivo* se determinó que la EGCG no presenta efectos tóxicos cuando es administrado directamente a la circulación en animales y se evaluaron los efectos protectores y preventivos que tiene esta molécula al tratar de inducir tumores (39).

Al tratar de determinar sus efectos antitumorales, se ha encontrado actividad altamente citotóxica a células tumorales en cultivos *in vitro*: interesantemente se ha observado que no daña significativamente a cultivos celulares no tumorales (40). La profundización en las investigaciones ha permitido observar que la EGCG genera efectos beneficiosos sobre las células no tumorales. Se halló que promueve la activación de mecanismos antioxidantes celulares más allá de la misma actividad intrínseca antioxidante de la misma molécula (41).

El efecto de la EGCG sobre células obtenidas de diversos tumores ha permitido determinar una diversidad de fenómenos que abarcan desde la promoción de la apoptosis hasta la inhibición de la proliferación y disminución de la migración de las células tumorales, donde paradójicamente también se observa actividad pro-oxidativa (42).

Se ha documentado la acción efectiva de la EGCG en la prevención y el tratamiento de cáncer, como lo es en el cáncer de próstata (39), hígado (43), colon (44) y en cáncer de mama (39,45). El tratamiento con la EGCG resulta en la inhibición del crecimiento de los tumores, a su vez se ha observado su efectividad en la inducción de la apoptosis, inhibición de la metástasis o de la angiogénesis en variedad de líneas celulares cancerígenas en donde se incluyen colon (46), mama (47), piel (48) y pulmón (49), mediante el arresto del ciclo celular o la activación de la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos.

4. Justificación y planteamiento del problema

Debido a la asociación entre el estado de metilación de diversos genes y el desarrollo de cáncer, elegimos realizar un estudio para evaluar el patrón de metilación en una línea celular de mama metastásica y en una no metastásica, en dos proto-oncogenes: *DEK* que es un proto-oncogen con una amplia variedad de funciones que incluyen la transcripción y la reparación, y *BAG4* que les confiere a las células tumorales la posibilidad de evadir la muerte. Estos genes son potenciales marcadores de diagnóstico y/o pronostico, por lo que es útil conocer si su expresión y patrón de metilación en el promotor presenta algún cambio después de exponer las células a un antioxidante.

4.1 Pregunta

¿Cómo se encuentra la metilación en los promotores de *BAG4* y *DEK* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con la EGCG?

4.2 Hipótesis

Los sitios CpG dentro de los promotores de los genes *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con la EGCG, se encuentran metiladas.

4.3 Justificación

Cada día es más evidente que un proceso cancerígeno, no solo puede estar ligado a mutaciones durante su inicio o desarrollo, sino también a alteraciones a nivel epigenético, (también conocidas como epimutaciones). La metilación del DNA es una modificación epigenética en sitios CpG, que juega un papel crítico no solo en la regulación de la transcripción de genes o mantenimiento del genoma, sino también en el desarrollo de enfermedades. En tumores en etapas tempranas es común observar hipometilación global del DNA de las células tumorales e hipermetilación de promotores de genes implicados en proliferación y diferenciación.

Dado que el cáncer es un padecimiento de características y causas multifactoriales, aún se desconocen una gran variedad de los factores que conllevan al aumento en sus índices de incidencia y mortalidad. El uso de líneas celulares para estudiar el desarrollo de estos procesos cancerígenos son una alternativa para comprender

estas patologías. Analizando el estado de metilación de genes como *DEK* y *BAG4*, se espera contribuir a la generación de conocimiento sobre las modificaciones epigenéticas que están involucradas en el desarrollo del cáncer de mama. Por otro lado, factores ambientales como la inclusión de mayor cantidad de antioxidantes en la dieta podría mejorar la respuesta de las pacientes durante el tratamiento.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Analizar el estado de metilación en los promotores de los genes *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con la EGCG.

5.2. Objetivos específicos

Cuantificar la expresión de los genes *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas y sin tratar con la EGCG.

Determinar el estado de metilación de los promotores de *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas y sin tratar con la EGCG.

Secuenciar las regiones amplificadas en los promotores de *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas y sin tratar con la EGCG.

6. Materiales y métodos

6.1 Cultivo de las líneas celulares

Para el mantenimiento y propagación de los cultivos celulares, estos se realizaron en cajas de cultivo de 25 cm^2. Para las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 se utilizó DMEM alto en glucosa como medio de cultivo a un pH de 7.4, el cual se preparó para que contuviera 1.5% (m/v) de bicarbonato sódico, 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, penicilina, estreptomicina y antimicóticos. A esta preparación se le determinó como medio suplementado. La incubación se realizó a una temperatura constante de 37 °C en una atmosfera humidificada y con 5% de CO_2.

Los cultivos celulares fueron transferidos a cajas nuevas una vez alcanzada una confluencia de aproximadamente 70% a 80%, las células fueron lavadas con PBS estéril y despegadas utilizando tripsina en solución. Pasadas 24h se cambió el medio añadiendo 4 mL de medio de cultivo suplementado fresco y posteriormente se realizaron cambios cada 3 ó 4 días dependiendo del crecimiento celular y cambio de coloración del indicador del pH que contenía el medio de cultivo.

La línea celular MCF7 fue obsequiada por el Dr. Barbier del laboratorio de toxicología renal del Departamento de Toxicología del CINVESTAV. La línea celular MDA-MB-231 fue obsequiada por el Dr. Monjaraz del laboratorio de neuroendocrinología del Instituto de Fisiología de la BUAP.

6.2 Determinación de la toxicidad de la EGCG en las líneas celulares

Tratamiento con epigalocatequina-3-galato.

Se utilizó EGCG (Sigma-Aldrich, Número de producto E4143) en polvo con una pureza mayor del 95%.

Se preparó un stock diluyendo 15mg de la EGCG en 3mL de agua desionizada ultrapura y se filtró en membranas de 0.22µm. La solución siempre se mantuvo almacenada a -40 °C, alicuotada en volúmenes de 500µL y protegida de cualquier fuente luminosa para evitar su degradación.

Se emplearon placas de cultivo de 24 pocillos para determinar la tasa de supervivencia de las líneas celulares en cultivo con bajo contenido en suero y en presencia de la EGCG. Partiendo de cultivos stock, como se describe anteriormente, se colocaron 2500 células por pocillo y se añadió medio de cultivo DMEM alto en glucosa complementado, se incubaron por 24h para permitir su adherencia. Pasado este tiempo el medio de cultivo fue cambiado a las células y se dejaron 48h para permitir su propagación hasta llegar una confluencia de aproximadamente 80-90%. Una vez obtenido esto se cambió el medio de cultivo añadiendo DMEM alto en glucosa con 1.5% de suero fetal bovino junto con una serie de diluciones graduales de la solución de la EGCG, de tal forma que se tuviera una concentración final que iba desde 100µg/mL a 5µg/mL con un respectivo control negativo al cual no se

agregó EGCG. Las placas de 24 pocillos se incubaron por 24h, 72h y 96h. El medio de cultivo en cada pozo fue sustituido por medio suplementado a las concentraciones de la EGCG correspondientes cada 24h, la adición de la EGCG fue realizada al momento que se realizaron los cambios de medio de cultivo. Se realizaron tres experimentos independientes para cada línea celular y cada condición se realizó por triplicado.

Se obtuvieron imágenes para determinar la evolución de la morfología de los cultivos con ayuda de un microscopio invertido a un aumento de 100X cada 24h antes de realizar cualquier cambio de medio.

Para la cuantificación de la tasa de supervivencia de las células en cultivo en presencia de la EGCG, se realizó una tinción con cristal violeta de las células que permanecieron adheridas después de los tratamientos. Una vez concluidos los tiempos de cultivos programados, el medio de cultivo fue retirado cuidadosamente. No se realizó ningún lavado para evitar despegar las células que permanecieron adheridas e inmediatamente fueron prefijadas añadiendo 300µL de una solución que contenía 50% de metanol en PBS, realizando esto por un tiempo de 2min. Después se retiró cuidadosamente esta solución y se fijaron las células añadiendo 300µL de metanol puro y se dejó reposar por 10min. Concluido el tiempo fue desechado el metanol y se lavaron todos los pocillos con agua destilada, dejándose secar a temperatura ambiente. Una vez secados los pocillos se añadieron 300µL de solución de cristal violeta al 0.1% en agua ultrapura recién preparada y se incubo en agitación a 150rpm por 10min. Después se desechó la solución y los pocillos fueron lavados con agua destilada hasta retirar todo el exceso de solución de cristal violeta. La placa de 24 pozos se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se añadió a cada pozo 500µL de solución de ácido acético al 10% en agua ultrapura recién preparada, se agitó la placa a 150rpm por 10min, se tomaron 100µL de cada pozo desteñido, se colocaron en una placa de 96 pozos y se determinó la absorbancia en un lector de placas, empleando una fuente de luz de 590nm.

6.3 Determinación de la expresión de los transcritos de *DEK* y *BAG4* por qRT-PCR

Extracción de ARN total

Una vez obtenida la suspensión celular se realizó la técnica para la obtención del ARN total. El ARN se extrajo y purificó de los cultivos celulares, utilizando el reactivo comercial TRIzol™ de Invitrogen™ bajo las condiciones y reactivos que especifica el fabricante. El ARN total fue diluido en agua estéril inyectable PISA™ y almacenado a -40°C.

Se cuantificó el ARN total extraído de los cultivos celulares con ayuda de un NanoDrop TM100 (Thermo Fisher), donde también se obtuvieron los cocientes 260nm/280nm y 260nm/230nm, para determinar el grado de pureza.

Se realizó una electroforesis en agarosa al 1% en buffer TBE a 90V durante 45min y se determinó la integridad del ARN. El gel de agarosa fue teñido utilizando GELRED™ ACID NUCLEIC (Biotium) bajo las condiciones que especifica el fabricante. El gel de agarosa fue visualizado con ayuda del transiluminador Benchtop 2UV™ de UVP.

Síntesis de ADNc.

Se realizó la síntesis de ADNc empleando el kit SUPERSCRIPT III™ First Strand, numero de catálogo 18080-051 (Invitrogen™), bajo las condiciones que especifica el fabricante. En todos los ensayos se utilizó 1µg de ARN total. En todas las reacciones se empleó oligo$(dT)_{20}$ como cebador. La síntesis se realizó en un termociclador MAXYGENE II (Axygen) y fueron incubadas a 55°C por 1h y posteriormente a 85°C por 15min. Los tubos con el ADNc resultante fueron almacenados a -40°C.

Diseño de oligonucleótidos para qPCR.

Los oligonucleótidos que se emplearon en la qPCR para la cuantificación de los transcritos fueron diseñados empleando la herramienta bioinformática online Primer-BLAST (50).

Las secuencias de los transcritos utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos fueron obtenidas de la base de datos Nucleotide (51) del National Center of Biotechnologic Information (NCBI).

Se procuró que las secuencias de los transcritos estuvieran reportadas como transcrito principal según APPRIS 2020_06.v32 (22) y Ensembl (23); que los amplicones resultantes no fueran mayor a 200 pares de bases; que las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos de cada transcrito no tuvieran una diferencia mayor a 1°C entre ellos; además de que estas temperaturas de alineamiento fueran lo más cercanas a 60°C y, por último, que los exones donde se hibridan los oligonucleótidos estuvieran separados por un intrón mayor a 1000 bases con respecto a la secuencia del gen, con el fin de evitar amplificación por ADN contaminante. Todas las secuencias pertenecen a la especie *Homo sapiens*.

Validación experimental de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos diseñados fueron solicitados para su síntesis con un grado de purificación obtenido por desalado y una escala de síntesis mínima (0.025µmol) sin modificaciones adicionales. Los oligonucleótidos fueron comprados a Integrated DNA Technologies (IDT)

Los oligonucleótidos liofilizados fueron rehidratados con agua estéril inyectable PISA™, bajo las indicaciones del fabricante, para preparar un stock a una concentración de 100µM, a partir del stock se prepararon las soluciones de trabajo diluyendo 1:5 para tener una concentración final de 20µM empleando agua estéril inyectable PISA™. Los oligonucleótidos rehidratados, las soluciones stock y las soluciones de trabajo fueron almacenados a -40°C.

Los oligonucleótidos fueron probados y validados. Se buscó la temperatura óptima de alineamiento y la ausencia de productos inespecíficos. Se realizaron PCR en las cuales se probaron tres temperaturas de alineamiento, utilizando como molde ADNc y sus respectivos controles negativos, a los cuales se les añadió agua estéril inyectable PISA™. Se comprobó que no hubiera amplificación con ADN genómico.

Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando 1U de Taq Pol (Invitrogen™), se añadió cloruro de magnesio, mezcla de dNTPs y oligonucleótidos en suficiente cantidad para obtener una concentración final de 1.5mM, 0.2mM y 0.2µM, respectivamente. Se añadieron 2µL de ADNc por reacción y se añadió agua grado biología molecular suficiente para tener un volumen final de 20µL.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MAXYGENE II (Axygen) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5min, un paso de desnaturalización a 95°C por 15s, seguido de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos (en donde se probaron 56°C, 58°C y 60°C para la determinación de la temperatura óptima) durante 30s, y por último una extensión a 72°C por 20s. Estos tres pasos fueron repetidos en 35 ciclos y finalmente se llevó a una extensión final de 72°C por 10min.

Para la visualización de los amplicones obtenidos se cargaron 3µL de cada reacción en pozos de un gel de agarosa al 2% en TBE y corridos a 90V por 45min junto con un marcador de peso molecular de 50pb a 1000pb. El gel de agarosa fue teñido utilizando GELRED™ acid nucleic (Biotium) bajo las condiciones que especifica el fabricante. El gel de agarosa fue visualizado con ayuda del transiluminador Benchtop 2UV™ de UVP. Los geles de agarosa visualizados fueron fotografiados empleando una cámara integrada a un teléfono inteligente.

qPCR para la obtención de la expresión relativa de los transcritos.

Se realizaron varios ensayos de qPCR para determinar la expresión relativa de los transcritos empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (52) en la cual fue utilizado *HPRT1* como gen de referencia y se empleó ADNc obtenido del ARN total de los cultivos celulares.

Las reacciones se prepararon empleando 5µL de mix de 2x de qPCR PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0.25µL de cada reacción de ADNc respectivo a medir, 3µL de mix de ambos oligonucleótidos para cada transcrito respectivo, “forward y reverse”, a una concentración de 1.5µM de cada oligo y la suficiente agua grado biología molecular para tener reacciones a un volumen final de 10µL. Las reacciones

de qPCR de cada transcrito (*HPRT1*, *DEK* o *BAG4*), y de cada réplica perteneciente a cada condición de tratamiento con la EGCG, fueron realizadas por triplicado. Para cada transcrito se preparó un control negativo de amplificación, el cual llevaba su par de oligonucleótidos correspondiente y agua grado biología molecular en lugar de ADNc.

Una vez preparadas y colocadas todas las reacciones en tiras de 8 tubos de qPCR fueron homogenizadas, centrifugadas y llevadas inmediatamente al termociclador StepOne Real Time PCR System (Life Technologies), en donde fueron corridas con previa configuración de las condiciones en el equipo. Se escogió la modalidad de cuantificación relativa, reacciones de qPCR con reactivos de SYBR Green modo Fast. Se configuró para determinar la fluorescencia basal por medio de ROX y las condiciones de reacción incluyeron un paso previo de incubación a 50°C por 5 min seguido de un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 3min, seguido por 35 ciclos conformado por dos pasos: uno de desnaturalización a 95°C por 3s y otro paso de alineamiento/elongación de 60°C por 15s. En este segundo paso se capturo en cada ciclo la señal de fluorescencia. Todas las reacciones se acompañaron de una curva “Melt” una vez concluida la reacción de amplificación, para la determinación de posibles productos inespecíficos.

Los datos fueron obtenidos y analizados con ayuda del software StepOne™ Software v2.3 incluido con el equipo.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo condiciones rigurosas como señalan las recomendaciones de la guía MIQE (53).

6.4 Determinación de la metilación de los promotores de *DEK y BAG4*, mediante conversión de ADN por bisulfito sódico y MSP.

Extracción y purificación de ADN genómico.

El ADN se extrajo y purificó de los cultivos celulares utilizando el reactivo comercial TRIzol™ de Invitrogen™ bajo las condiciones y reactivos que especifica el fabricante. Una vez obtenido el ARN total, a partir de esa misma muestra inmediatamente se realizó la continuación de la técnica para la obtención del ADN

genómico, como recomienda el manual del reactivo. El ADN genómico fue diluido en agua estéril inyectable PISA™ con NaOH a una concentración de 8mM y almacenado a -40°C.

Se cuantificó el ADN genómico con ayuda de un NanoDrop TM100 (Thermo Fisher), con el que también se obtuvieron los cocientes 260nm/280nm y 260nm/230nm para determinar el grado de pureza.

Se realizó una electroforesis en agarosa al 1% en buffer TBE a 90V durante 45min para determinar la integridad del ADN genómico. El gel de agarosa fue teñido utilizando GELRED™ acid nucleic (Biotium) bajo las condiciones que especifica el fabricante. El gel de agarosa fue visualizado con ayuda del transiluminador Benchtop 2UV™ de UVP.

Conversión de ADN genómico con bisulfito sódico.

Se realizó la conversión de ADN genómico con bisulfito sódico empleando el kit EpiTect Bisulfite (QIAGEN™) número de catálogo 59104 bajo las condiciones que especifica el fabricante. En todos los ensayos se utilizaron 700ng de ADN genómico de los cultivos celulares. Las reacciones purificadas de ADN genómico convertido fueron almacenadas a -40°C.

Diseño de oligonucleótidos para MSP.

Los oligonucleótidos para la determinación del estado de metilación en los promotores por medio de MSP empleando ADN convertido por bisulfito sódico fueron diseñados empleando la herramienta bioinformática online METH PRIMER 2.0 (54).

Las secuencias de los promotores en los genes que fueron utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos fueron obtenidas de The Eukaryotic Promoter Database (PDB) (55). Se realizó la conversión por bisulfito sódico *in silico* de las secuencias de los promotores ocupando la cadena sentido, todas las citosinas fueron modificadas a uracilos (señalados como timinas) a excepción que formaran parte de un sitio CpG. Para esto también se empleó la herramienta bioinformática METH PRIMER 2.0 (54).

Se procuró que cada uno de los oligonucleótidos diseñados tuviera de dos a tres sitios CpG (ubicándose lo más cercano al extremo 3'), un contenido de GC mayor a 30%, la Tm cercana a 60°C y no más de 3°C de diferencia entra cada par de oligonucleótidos correspondientes a la región a amplificar. También se procuró que el amplicón a obtener fuera menor a 350pb de longitud. Para cada promotor se obtuvo un par de juegos de oligonucleótidos: un juego con secuencia específica para metilación y otro juego con secuencia específica para desmetilación. Estos últimos discriminan las citocinas convertidas o no a uracilos, las cuales se ubican en sitios CpG, dependiendo de su estado de metilación.

Validación experimental de los oligonucleótidos diseñados para MSP.

Los oligonucleótidos diseñados para la determinación del estado de metilación en los promotores de *DEK* y *BAG4* por medio de MSP fueron solicitados para su síntesis con un grado de purificación obtenido por desalado y una escala de síntesis mínima (0.025µmol) sin modificaciones adicionales. Los oligonucleótidos fueron comprados a Integrated DNA Technologies (IDT).

Los oligonucleótidos liofilizados fueron rehidratados con agua estéril inyectable PISA™ (según las indicaciones del fabricante) para preparar un stock a una concentración de 100µM. A partir del stock se fueron preparando las soluciones de trabajo diluyendo con agua estéril inyectable PISA™ (1:5) para tener una concentración final de 20µM. Los oligonucleótidos rehidratados, las soluciones stock y las soluciones de trabajo fueron almacenados a -40°C.

Los oligonucleótidos fueron probados y validados. Se buscó la temperatura óptima de alineamiento y la ausencia de productos inespecíficos. Se realizaron MSP, en las cuales se probaron de 3 a 4 temperaturas de alineamiento diferentes en un rango de 50°C a 60°C, utilizando como molde un control certificado de ADN genómico humano 100% metilado o control certificado de ADN genómico humano 100% desmetilado, según correspondiera a su juego de oligonucleótidos y sus respectivos controles negativos. Las reacciones de control negativo se hicieron para ambos estados de metilación y se usó agua grado biología molecular en lugar de ADN molde. Posteriormente, también se comprobó que no hubiera amplificación

inespecífica de cada juego de oligonucleótidos con control certificado de ADN genómico humano sin convertir, control certificado de ADN genómico humano 100% metilado para el caso de los juegos específicos a desmetilación y control certificado de ADN genómico humano 100% desmetilado para el caso de los juegos específicos de metilación, todos junto con sus respectivos controles negativos. Todos los controles certificados de ADN genómicos humanos 100% metilados o 100% desmetilados, convertidos o no por bisulfito sódico, fueron obtenidos del EpiTect PCR Control DNA Set de QUIAGEN™.

Las reacciones de estandarización de las MSP fueron preparadas empleando 5µL del mix 2X EpiTect® MSP (número de catálogo 59305), 2µL de mix de oligonucleótidos con una concentración de 3.5µM de cada oligonucleótido, 0.5µL de molde correspondiente al juego de oligonucleótido usado y se añadió la suficiente agua grado biología molecular para tener un volumen final de reacción de 10µL.

Las reacciones de MSP preparadas se llevaron a cabo en un termociclador MAXYGENE II de Axygen™ bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 10min, un paso de desnaturalización a 94°C por 15s, seguido de la temperatura correspondiente a evaluar de alineamiento de los oligonucleótidos durante 45s y una extensión a 72°C por 30s. Estos tres pasos fueron repetidos en 45 ciclos y finalmente se llevó a una extensión final de 72°C por 10 min.

Para la visualización de los amplicones obtenidos fueron cargados 5µL de cada reacción en un pozo de un gel de agarosa al 2% en TBE y corridos a 90V por 45min junto con un marcador de peso molecular de 50pb a 1000pb. El gel de agarosa fue teñido utilizando GELRED™ acid nucleic (Biotium) bajo las condiciones que especifica el fabricante. El gel de agarosa fue visualizado con ayuda del transiluminador Benchtop 2UV™ de UVP. Los geles de agarosa visualizados fueron fotografiados empleando una cámara integrada a un teléfono inteligente.

Reacciones de MSP.

Para determinar el estado de metilación de los promotores de *DEK* y *BAG4* correspondiente a cada línea celular bajo los respectivos tratamientos, se realizaron las MSP con los ADN genómicos convertidos por bisulfito sódico.

Las reacciones de MSP se prepararon empleando 5µL de mix 2X EpiTect® MSP (número de catálogo 59305), 0.5µL de ADN genómico convertido por bisulfito sódico y 2µL de un mix de oligonucleótidos, Forward y Reverse.

Las reacciones de MSP preparadas se llevaron a cabo en un termociclador MAXYGENE II Axygen bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 10min, un paso de desnaturalización a 94°C por 15s, seguido de la temperatura correspondiente optima de alineamiento de cada juego de oligonucleótidos durante 45s y una extensión a 72°C por 30s. Estos tres pasos fueron repetidos en 45 ciclos y finalmente se llevó a una extensión final de 72°C por 10min.

Para la visualización de los resultados obtenidos, de cada reacción fueron cargados 5µL en un pozo de un gel de agarosa al 2% en TBE y corridos a 90V por 45min junto con un marcador de peso molecular de 50pb a 1000pb. El gel de agarosa fue teñido utilizando GELRED™ acid nucleic (Biotium) bajo las condiciones que especifica el fabricante. El gel de agarosa fue visualizado con ayuda del transiluminador Benchtop 2UV™ de UVP. Los geles de agarosa visualizados fueron fotografiados empleando una cámara integrada a un teléfono inteligente.

6.5 Determinación de la secuencia de los amplicones de la MSP

Preparación de los amplicones a secuenciar.

De las MSP que resultaron positivo a algún estado de la metilación comprobada con la electroforesis en agarosa, se realizó de nuevo la MSP bajo las condiciones descritas. Una vez terminada la reacción, inmediatamente se tomaron 5µL de MSP de cada tubo y fueron llevadas a un tubo nuevo de 0.2mL donde posteriormente se añadió 2µL de USB ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix USB) y fueron incubados en el termociclador a 37°C por 15min seguido de 80°C por 15min. Acabado esto, se añadió un oligonucleótido del par ocupado anteriormente para

obtener este amplicón a cada tubo lo suficiente para obtener una concentración final de 1µM y se añadió agua grado biología molecular para tener un volumen final de 12µL por tubo.

Secuenciación.

El servicio de secuenciación fue realizado en los laboratorios de Clínica Ruiz, Puebla, México. Se empleo la plataforma de secuenciación tipo Sanger por fluorescencia en electroforesis capilar Genetic Analyzer ABI 3130 de Thermo Fisher Scientific.

Visualización y análisis de las secuencias.

Los archivos con los resultados de la secuenciación fueron visualizados y exportados a archivos de texto utilizando el software gratuito Chromas 2.6.5, disponible en el sitio web http://www.technelysium.com.au/chromas.html.

Se realizaron alineamientos para determinar la similitud con respecto a las secuencias obtenidas de las bases de datos y modificadas por bisulfito *in silico* empleando las herramientas online de QUMA en su servidor web http://quma.cdb.riken.jp/(56).

Para la identificación de los sitios CpG y la determinación del estado de metilación en las secuencias obtenidas de los amplicones de estos mismos también se utilizó las herramientas online de QUMA en su servidor web http://quma.cdb.riken.jp/ (56), donde se generaron gráficas y esquemas de las secuencias con la posición relativa del sitio CpG y su estado metilado/no metilado.

7. Resultados

7.1 Toxicidad de la EGCG en las líneas celulares

Una vez que los cultivos celulares de MCF7 y MDA-MB-231 alcanzaron la confluencia, fueron sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de la EGCG y se fueron monitoreando al microscopio los cambios morfológicos apreciables a simple vista para observar el deterioro o desprendimiento de las células. Con ayuda de estas primeras observaciones se escogió un set de

concentraciones especificas a tiempos específicos para la realización de los experimentos posteriores dependientes de estos cultivos.

Toxicidad de la EGCG en MCF7.

En un inicio de los experimentos, se escogió como concentración mínima 5µg/mL de la EGCG por un tiempo de 24h, ya que no ocasionaba muerte masiva en los cultivos y fueron apreciables ligeros cambios morfológicos (Figura 2).

Para determinar efectos de la EGCG en un lapso más largo, se aumentó el tiempo de exposición a la EGCG a 96h a una concentración de 2.5µg/mL (Figura 3).

También se acompañó de la realización de cultivos a distintas concentraciones de la EGCG (0µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 100µg/mL) por un lapso de 72h, en la cual se determinó que la supervivencia de las células MCF7 disminuía gradualmente hasta el 55% a una concentración de 50µg/mL (Figura 5). También fue determinando los cambios morfológicos (Figura 4) en los cuales se apreciaba notoriamente la disminución del tamaño de estas, destacándose a la máxima concentración (100µg/mL) desde las primeras 24h.

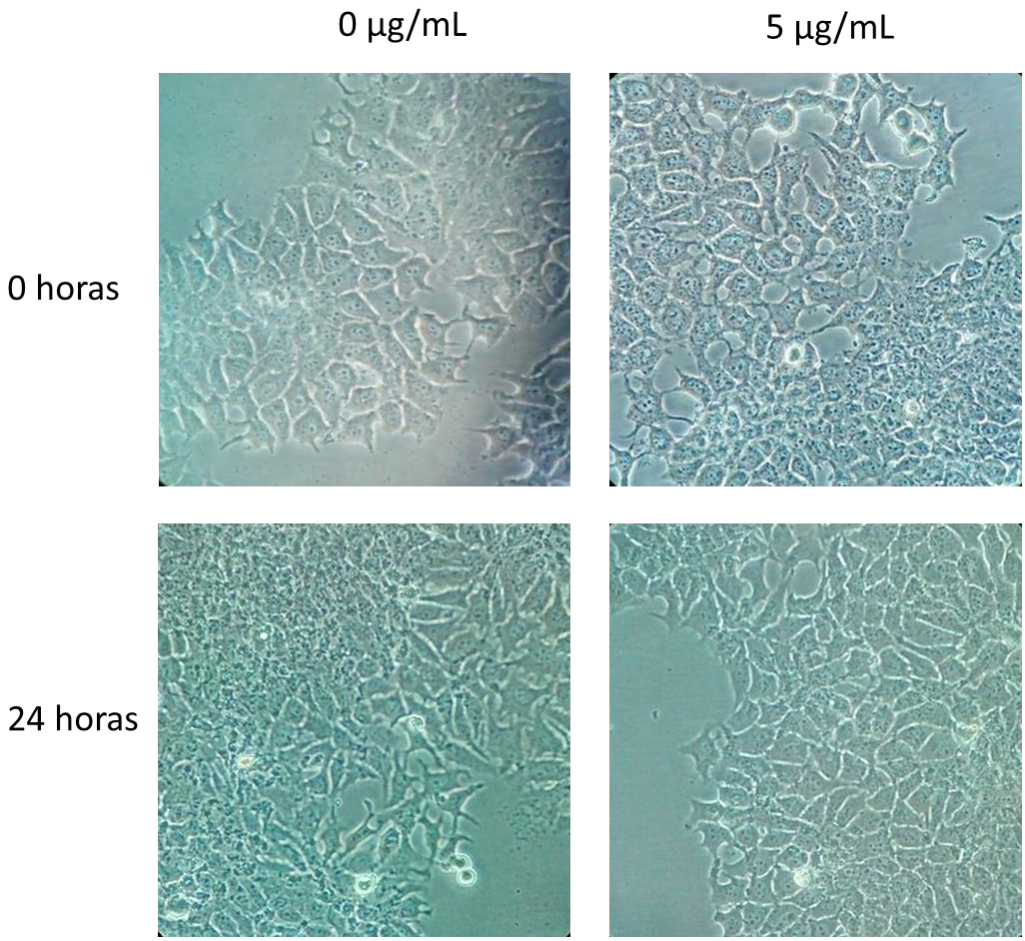


Figura 2. Morfología de las células MCF7 en cultivo con (5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo total de 24h. Aquí se aprecia los cambios en la morfología celular en las células tratadas con EGCG después de 24h.

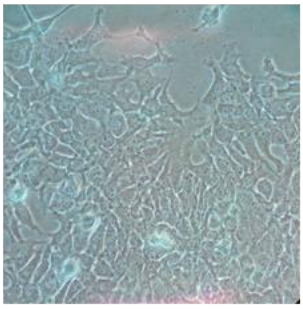
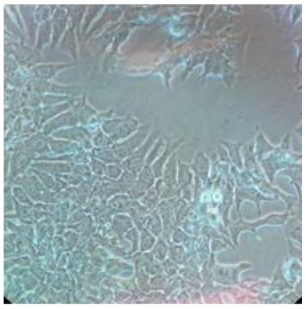
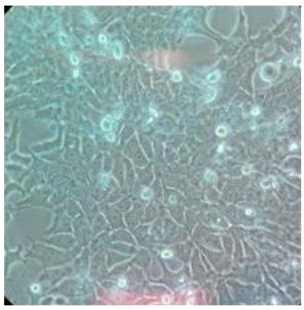
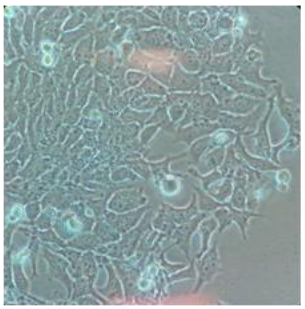
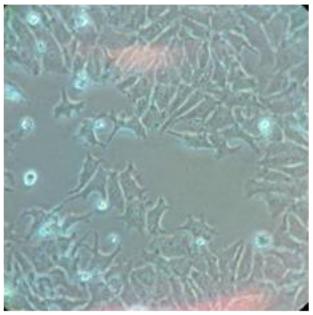
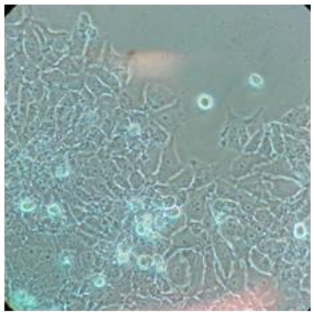
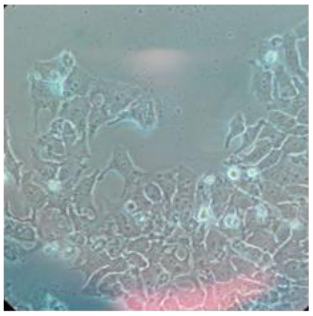
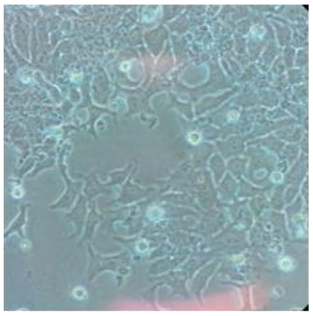
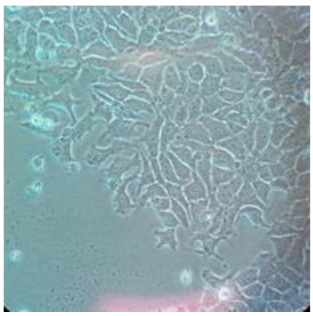
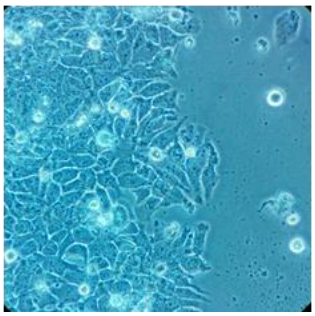
	0 µg/mL	2.5 µg/mL
0 horas		
24 horas		
48 horas		
72 horas		
96 horas		

Figura 3. Morfología de las células MCF7 en cultivos con (2.5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG a diferentes intervalos de tiempos por un periodo total de 96 horas. El medio de cultivo con la EGCG fresco, a la concentración indicada fue cambiado cada 24 horas durante todo el ensayo y las fotografías fueron obtenidas momentos antes de hacerles cualquier cambio de cultivo para evitar estresarlas.

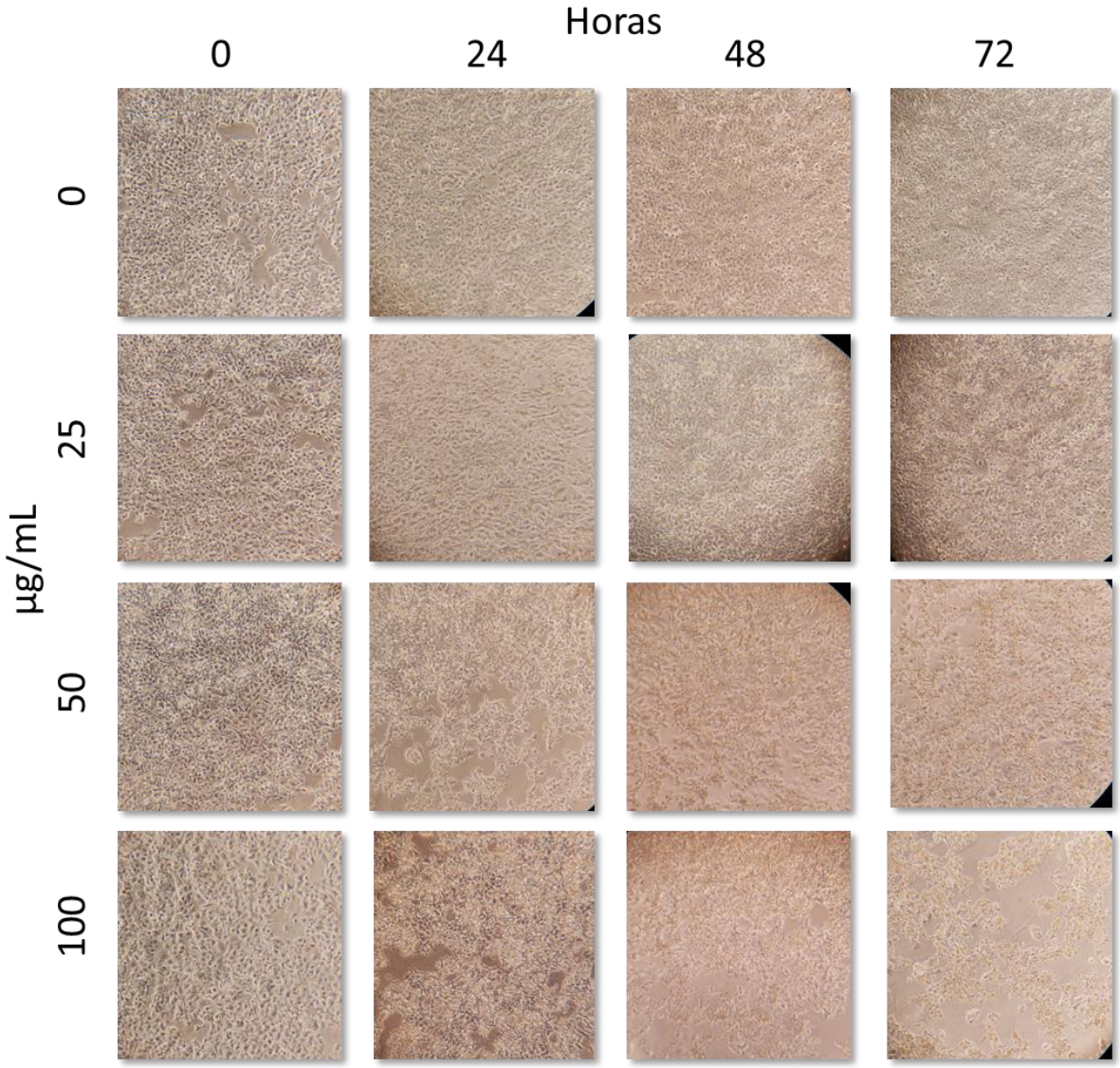


Figura 4. Morfología de las células MCF7 en presencia o ausencia de la EGCG a diferentes intervalos de tiempo de exposición por un periodo total de 72 horas. El medio de cultivo con la EGCG a la concentración indicada fue cambiado cada 24 horas durante todo el ensayo y las fotografías fueron obtenidas momentos antes de hacerles cualquier cambio de medio.

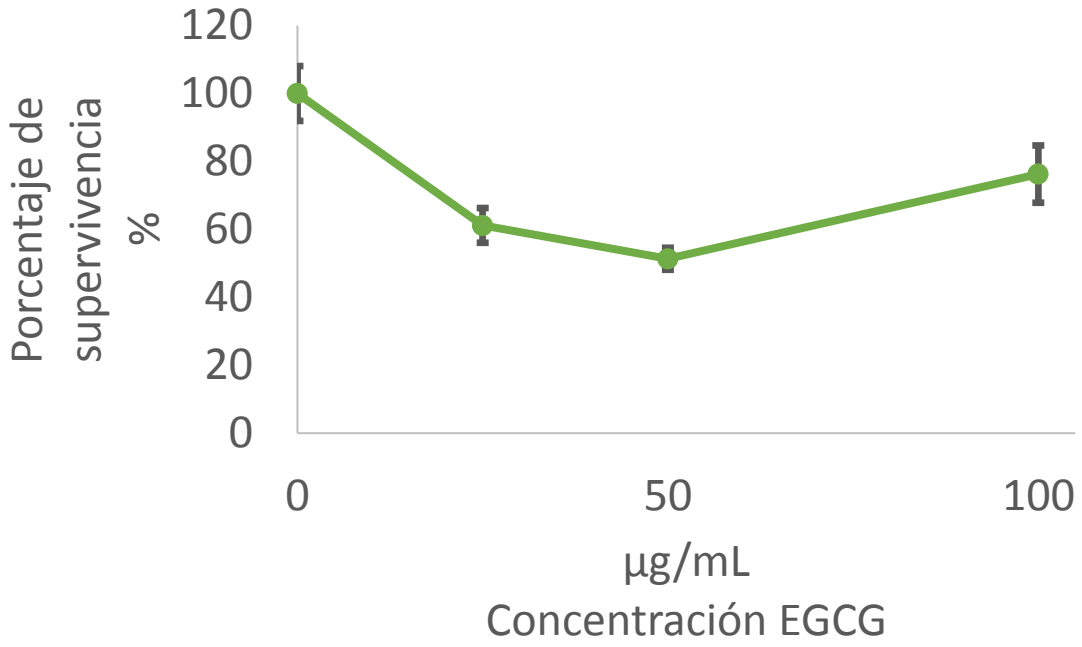


Figura 5. Gráfica de la curva de supervivencia de los cultivos celulares de MCF7 a diferentes concentraciones de la EGCG por un periodo total de 72h.

Toxicidad de la EGCG en MDA-MB-231.

En un inicio de los experimentos, se escogió como concentración mínima 10µg/mL de la EGCG por un tiempo de 24h, ya que no ocasionaba muerte masiva en los cultivos y fueron apreciables ciertos cambios morfológicos como disminución de las proyecciones citoplasmáticas, disminución de tamaño e incluso vacuolización. (Figura 6).

También se acompañó de la realización de cultivos a distintas concentraciones de la EGCG (0µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 100µg/mL) por un lapso de 72h, en la cual se determinó que la supervivencia de las células MDA-MB-231 disminuía gradualmente hasta aproximadamente el 46% a una concentración de 100µg/mL (Figura 7).

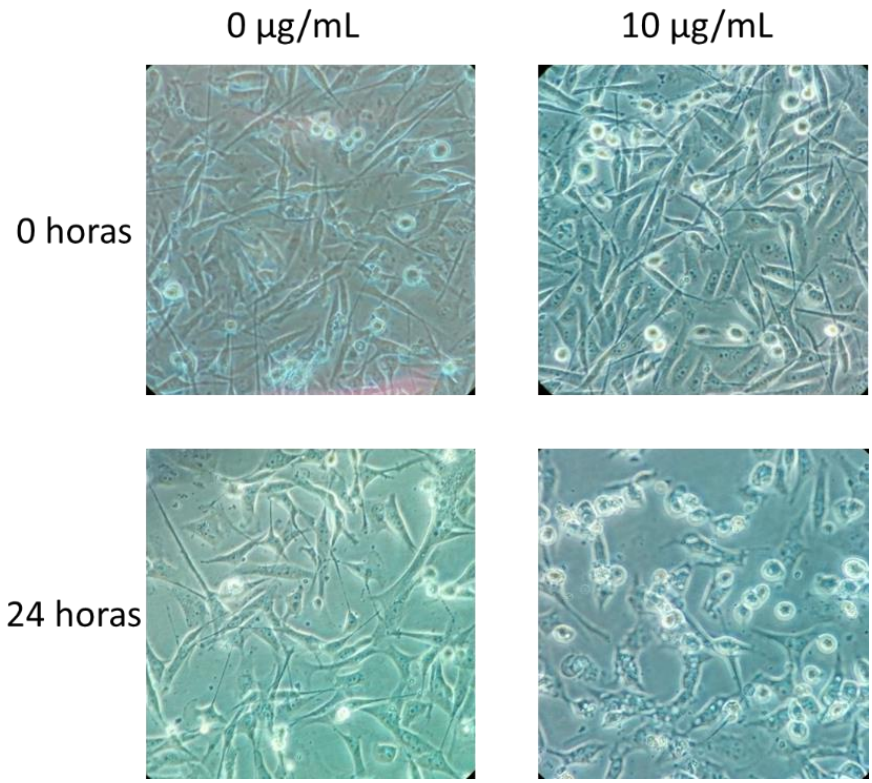


Figura 6. Morfología de las células MDA-MB-231 en cultivo con (10 µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo total de 24h. Aquí se aprecia la alteración en las proyecciones celulares y vacuolización de las células incubadas en presencia de la EGCG.

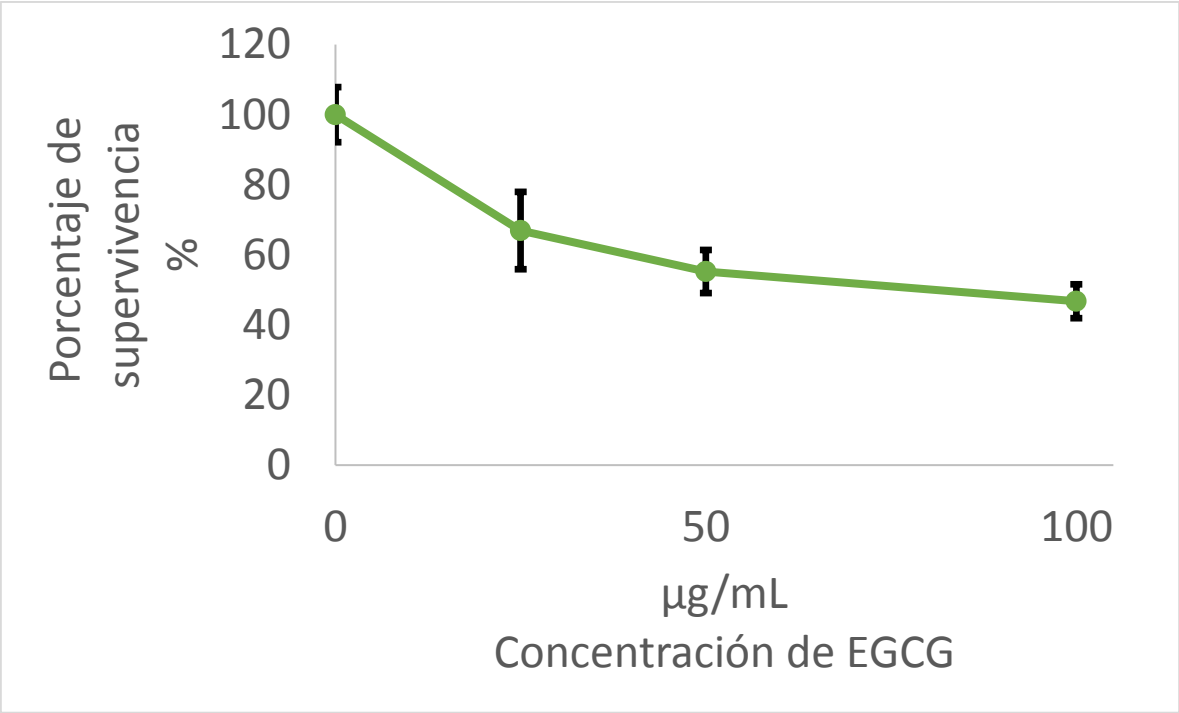


Figura 7. Gráfica de la curva de supervivencia de los cultivos celulares de MDA-MB-231 a diferentes concentraciones de la EGCG por un periodo total de 72h.

7.2 Determinación de la expresión de los transcritos de *DEK* y *BAG4* en las líneas celulares.

7.2.1 Validación de oligonucleótidos para qPCR

Los oligonucleótidos diseñados fueron validados y estandarizados exitosamente los cuales fueron empleados en los experimentos posteriores para la qPCR. Las concentraciones, volúmenes y condiciones establecidas en la validación y estandarización están resumidas en las tablas 1 y 2.

La presencia de amplicones únicos obtenidos de los transcritos de *HPRT1* (gen de referencia), *DEK* y *BAG4* en el rango de temperaturas probadas son mostrados en las figuras 8, 9 y 10, respectivamente.

Las secuencias de los oligonucleótidos y sus temperaturas de alineamiento están detalladas en la tabla 3.

Tabla 1. Reactivos, volúmenes y concentraciones para la estandarización de la PCR.

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción	Volumen para 4 reacciones
Buffer	10X	1X	2µl	8µl
dNTP´s	10mM	0.2 mM	0.4µl	1.6µl
Mix de oligonucleótidos	20 µM c/u	0.2 µM c/u	0.4µl	1.6µl
Mg^{2+}	50 mM	1.5 mM	0.6µl	2.4µl
TaqPol	5 U/µl	1 U	0.2µl	0.8µl
H_2O	-	-	14.4µl	Ajustar a NTC
ADNc	-	-	2µl	Ajustar a NTC

Tabla 2. Condiciones para la estandarización de la PCR.

Temperatura	**94°C**	**94°C**	**[56,58,60]°C**	**72°C**	**72°C**
Tiempo	5 min	15 s	30 s	20 s	10 min
Ciclos	1		35		1

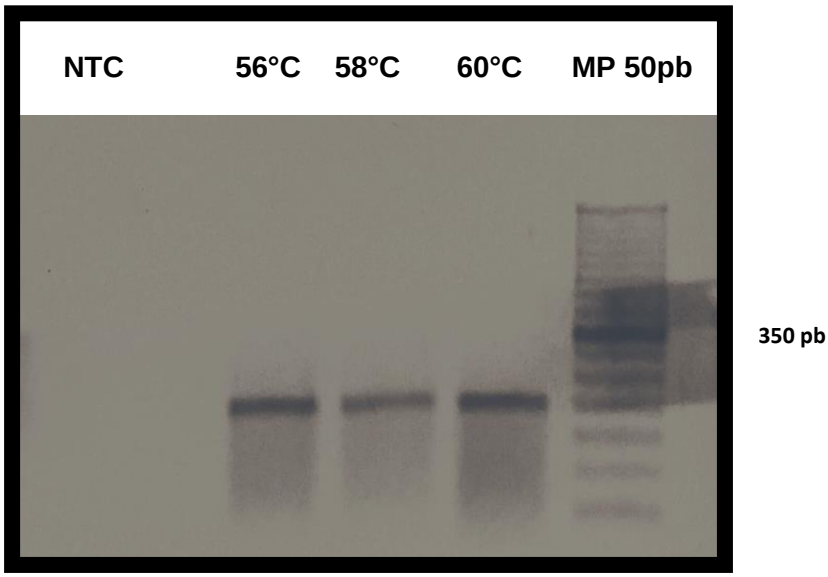


Figura 8. Estandarización de la PCR para el amplicón proveniente del transcrito de *HPRT1*. En la imagen se presentan las 3 temperaturas utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 60°C. El tamaño del amplificado esperado es de 160pb. NTC-control negativo. Productos amplificados a partir de ADNc obtenido por RT-PCR de ARN total de MDA-MB-231.

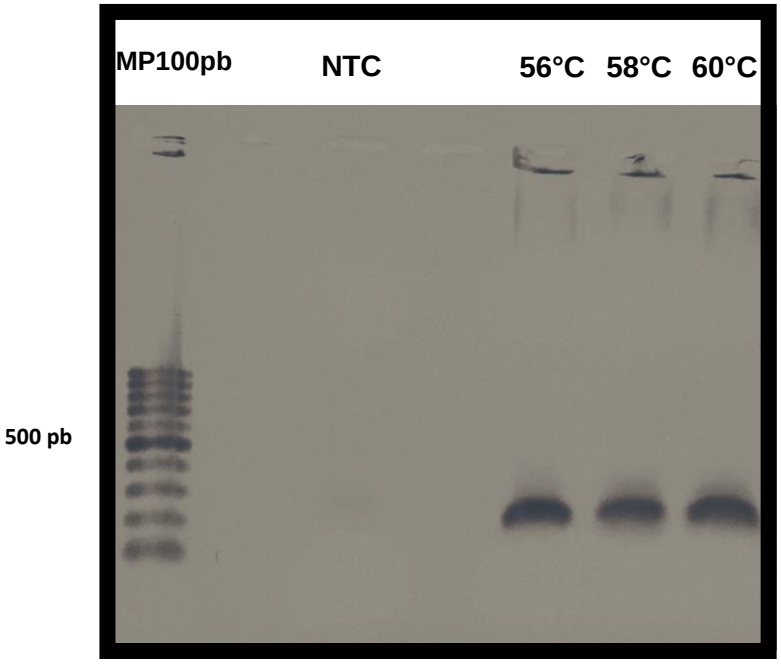


Figura 9. Estandarización de la PCR para el amplicón proveniente del transcrito de *DEK*. En la imagen se presentan las 3 temperaturas utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 60°C. El tamaño del amplificado esperado es de 190pb. NTC-control negativo. Productos amplificados a partir de ADNc obtenido por RT-PCR de ARN total de MDA-MB-231.

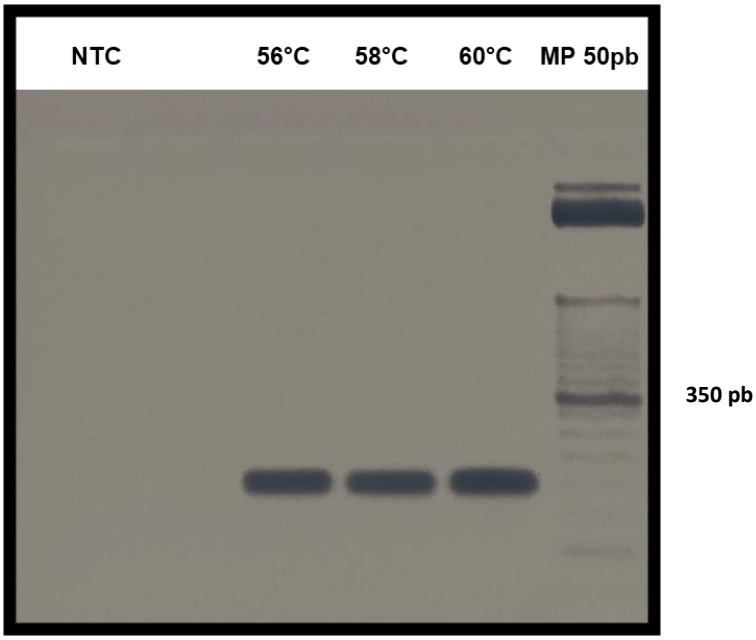


Figura 10. Estandarización de la PCR para el amplicón proveniente del transcrito de *BAG4*. En la imagen se presentan las 3 temperaturas utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 60°C. El tamaño del amplificado esperado es de 109pb. NTC-control negativo. Productos amplificados a partir de ADNc obtenido por RT-PCR de ARN total de MDA-MB-231.

Tabla 3. Parámetros obtenidos de la estandarización de los oligonucleótidos diseñados.

Gen	Tm	Tiempo de alineamiento	Tamaño del amplificado	Secuencia
HPRT1 (gen de referencia)	60°C	30s	160pb	F- TGCTGAGGATTTGGAAAGGG
				R- GTAATCCAGCAGGTCAGCAA
DEK	60°C	30s	192pb	F- TCTTCCTTACAGAGAGAGCCA
				R- TGGAAAGCCACTGAACTGAC
BAG4	60°C	30s	109pb	F- AACTCCAGTCTCTCGTTGGA
				R- GGTCATTCCAGGGTTCTGTG

7.2.2 Extracción de ARN

Los ARN totales fueron extraídos y purificados de cada cultivo de todas las líneas celulares con y sin tratamiento con la EGCG a las condiciones previamente determinadas y seleccionadas.

Todos los ARN totales obtenidos y purificados fueron corridos en geles de agarosa para determinar su integridad, solamente los ARN que cumplieron con la apreciación visual de dos bandas claramente definidas, correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, fueron seleccionados para ser empleados en la síntesis de su ADNc respectivo. Los ARN totales en los cuales no se apreciaran estas bandas claramente definidas y presentaran un barrido fueron descartados para cualquier experimento posterior.

Todos los ARN totales obtenidos fueron cuantificados con espectrofotometría UV y se realizó lecturas de la absorbancia a 230nm, 260nm y 280nm para posteriormente determinar su concentración y calidad, solamente los ARN que cumplieran con un cociente de sus absorbancias a 260nm y a 280nm (A260/A280) en un rango de 1.8-2.1, junto con un cociente de sus absorbancias a 260nm y a 230nm (A260/A230) en un rango de 2-2.5; fueron seleccionados para ser empleados en la síntesis de su ADNc respectivo. Los cocientes fuera de esos rangos indican una posible contaminación de sales, agentes caotrópicos, detergentes o proteínas que pudieran interferir en el proceso de síntesis enzimática del ADNc.

ARN total de los cultivos celulares de MCF7

Figura 11. Integridad de los ARN totales obtenidos de MCF7 provenientes de cultivos celulares con (5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo total de 24 horas visualizados en gel de agarosa al 1%.

Figura 12. Integridad de los ARN totales obtenidos de MCF7 provenientes de cultivos celulares con (2.5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo total de 96 horas visualizados en gel de agarosa al 1%.

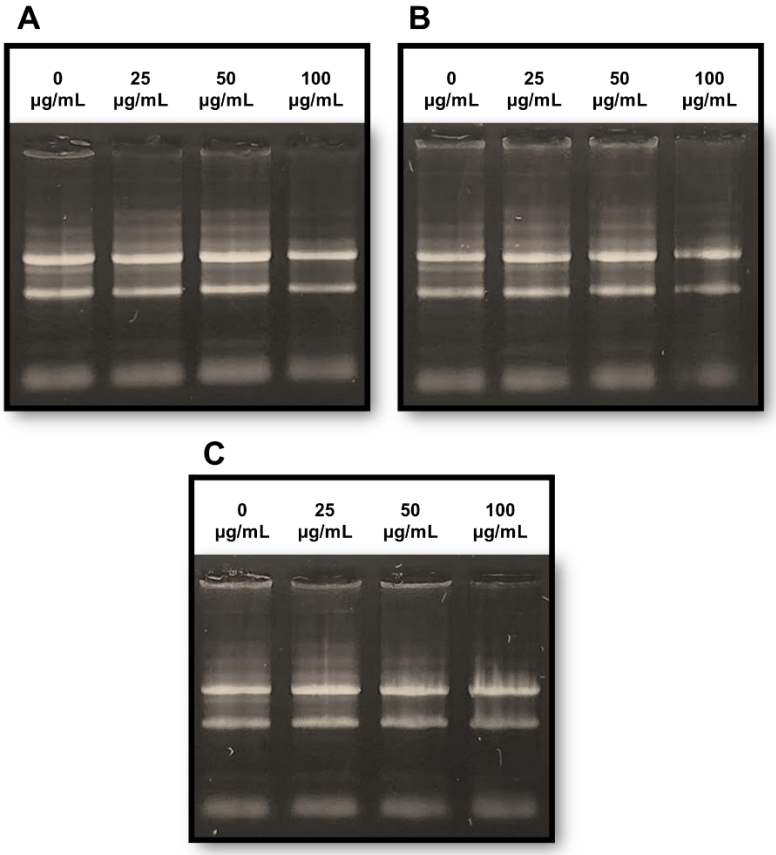


Figura 13. Integridad de todos los ARN totales obtenidos de MCF7 visualizados en gel de agarosa. Todos los ensayos de exposición a la EGCG fueron realizados por triplicado para cada condición junto con sus respectivas referencias. Cada inciso corresponde a una de las réplicas. En cada carril se encuentra indicada la concentración de exposición a la EGCG correspondiente del cultivo procedente. La referencia corresponde al carril de la exposición a 0µg/mL. Todos los grupos fueron incubados por un periodo de tiempo de 72 horas.

Tabla 4. Cuantificación y calidad de las purificaciones de los ARN totales de MCF7 a partir de cultivos con o sin tratamiento de la EGCG por un periodo de 72 h.

Grupo-Condición	Réplica	Concentración de ARN (ng/µL)	260nm	260/280	260/230
0µg/mL	1	894.8	23.805	1.95	2.29
	2	936.1	20.904	1.98	2.33
	3	951.8	23.794	1.95	2.22
25µg/mL	1	908.3	22.709	1.95	2.15
	2	1086.1	26.154	1.96	2.18
	3	1013.8	25.346	1.94	2.06
	1	1060.5	26.513	1.92	2.03

50µg/mL	2	1170.3	29.258	1.97	1.91
	3	1131.8	28.295	1.89	1.93
100µg/mL	1	662.8	16.57	1.8	2.73
	2	845.7	21.293	1.8	1.86
	3	804.2	20.105	1.76	1.6

ARN total de los cultivos celulares de MDA-MB-231

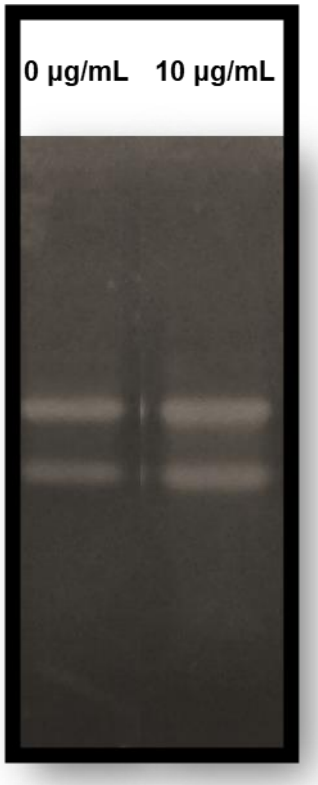


Figura 14. Integridad de los ARN totales obtenidos de MDA-MB-231 provenientes de cultivos celulares con (10µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo total de 24 horas visualizados en gel de agarosa al 1%.

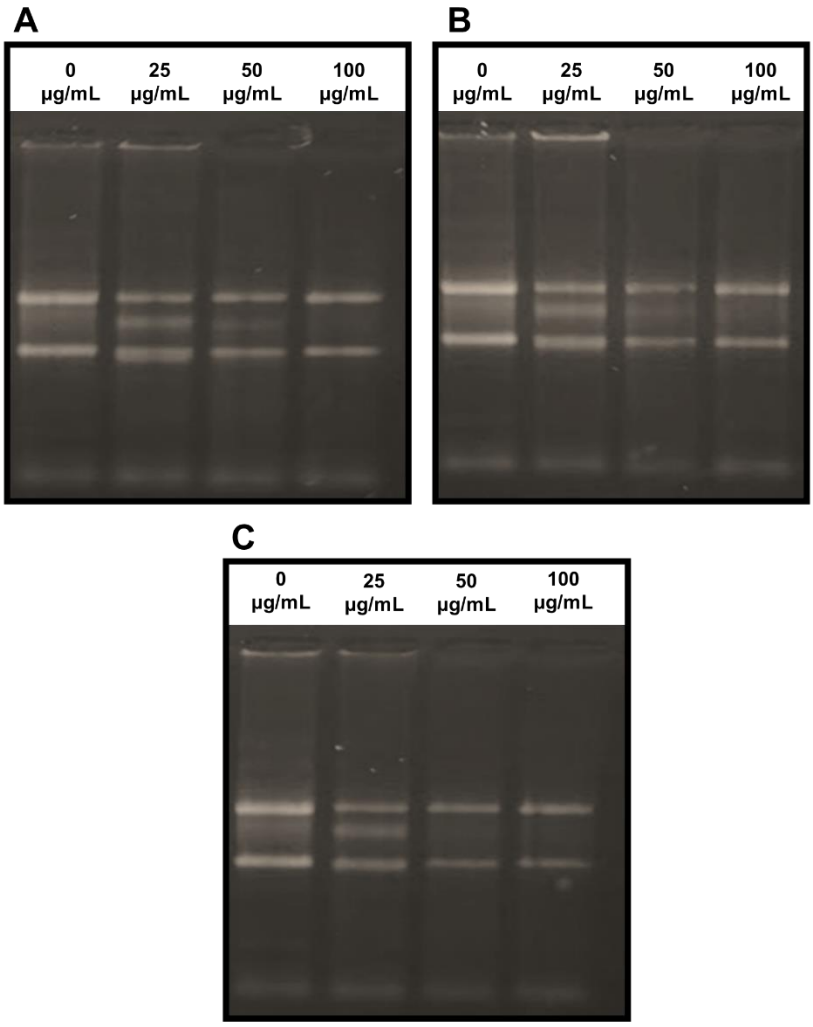


Figura 15. Integridad de todos los ARN totales obtenidos de MDA-MB-231 visualizados en gel de agarosa. Todos los ensayos de exposición a la EGCG fueron realizados por triplicado para cada condición junto con sus respectivas referencias. Cada inciso corresponde a una de las réplicas. En cada carril se encuentra indicada la concentración de exposición a la EGCG correspondiente del cultivo procedente. La referencia corresponde al carril de la exposición a 0µg/mL. Todos los grupos fueron incubados por un periodo de tiempo de 72 horas.

Tabla 5. Cuantificación y calidad de las purificaciones de los ARN totales de MDA-MB-231 a partir de cultivos con o sin tratamiento de la EGCG por un periodo de 72 h.

Grupo-Condición	Réplica	Concentración de ARN (ng/µL)	260nm	260/280	260/230
0µg/mL	1	394	0	1.9	2.24
	2	442.8	0	1.88	2.26
	3	381	0	1.93	2.08
25µg/mL	1	257.4	0	1.84	2.13
	2	267.8	0	1.87	2.15
	3	271.2	0	1.87	2.08

50µg/mL	1	183.2	0	1.76	1.81
	2	199.2	0	1.77	1.83
	3	178.9	0	1.76	1.86
100µg/mL	1	194.3	0	1.73	1.6
	2	186.5	0	1.75	1.13
	3	176.8	0	1.76	1.57

7.2.3 Cuantificación de los transcritos de los genes *DEK* y *BAG4.*

Para la determinación de la expresión de los genes *DEK* y *BAG4*, se realizó la cuantificación relativa de los transcritos de cada gen por medio de la técnica de RT-qPCR.

Todos los ensayos de qPCR para la cuantificación de cada transcrito en cada réplica respectiva dentro de cada grupo de exposición a la EGCG junto con sus respectivas referencias y controles, fueron realizados por triplicado.

Una vez finalizada cada corrida de qPCR, para todas las reacciones se les determino su curva “Melt” para la obtención de la Tm de los amplicones generados y, la derivada negativa de los datos obtenidos fue graficada para este propósito. Solamente las réplicas de cada transcrito respectivo en las cuales se obtuviera un único pico en la Tm del amplicón correspondiente a cada transcrito, eran consideradas válidas para el posterior análisis de los datos. Si se apreciaba más de un pico, inclusive de menor magnitud al principal o un pico con una Tm considerablemente diferente a la esperada, los datos de cuantificación se descartaron.

Todas las corridas fueron acompañadas de controles negativos para cada uno de los transcritos a cuantificar, solamente las corridas en las cuales no se registraba una amplificación de negativos, eran consideradas válidas para el posterior análisis de los datos obtenidos, si una corrida contenía amplificación de un control negativo, los datos obtenidos fueron descartados.

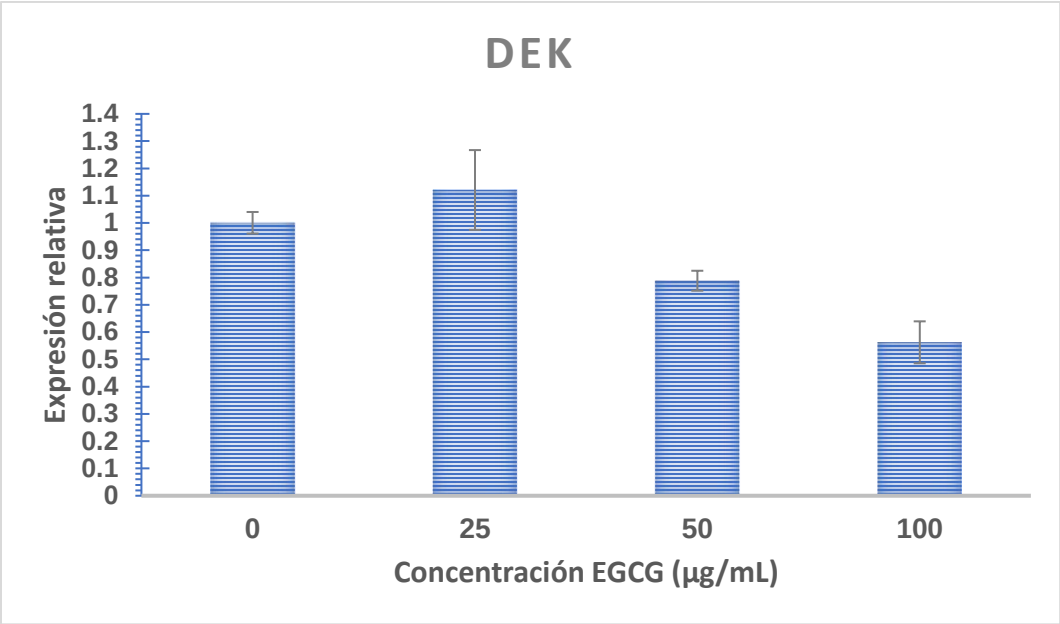
Expresión relativa de los genes DEK y BAG4 en MCF7.

La expresion relativa de los transcritos de *DEK* y *BAG4* fueron determinadas de los cultivos celulares incubados a concentraciones de 0µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL y 100µg/mL de EGCG por un tiempo de 72h.

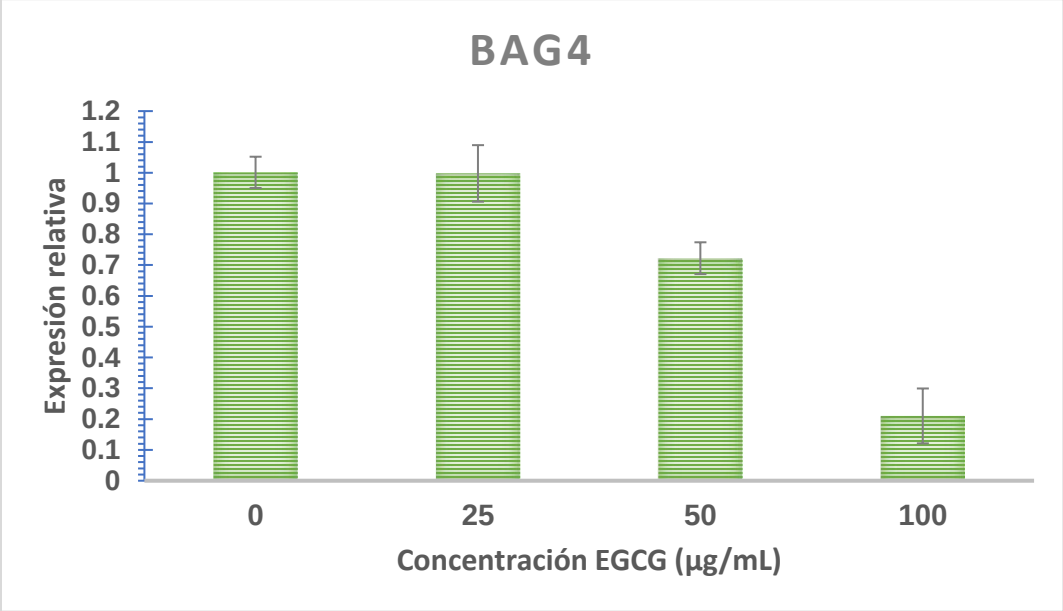
Para el caso del transcrito de *DEK* (Figura 16, inciso A) se aprecia una disminución hasta aproximadamente al 78% a una concentracion de 50µg/mL y de hasta aproximadamente al 56% a una concentracion de 100µg/mL.

Para el caso del transcrito de *BAG4* (Figura 16, inciso B) se aprecia una disminución hasta aproximadamente al 72% a una concentración de 50µg/mL y de hasta aproximadamente al 21% a una concentración de 100µg/mL.

Las curvas “Melt” de estos experimentos están ilustradas en la figura 17.



(A)



(B)

Figura 16. Gráficas de la expresión relativa de los genes (A) *DEK* y (B) *BAG4* de los tratamientos con o sin la EGCG de la línea celular MCF7 por un periodo total de 72h. La expresión de los transcritos de los cultivos a exposición de 0µg/mL fue normalizada a 1 y los demás resultados fueron comparados con respecto a esta**.**

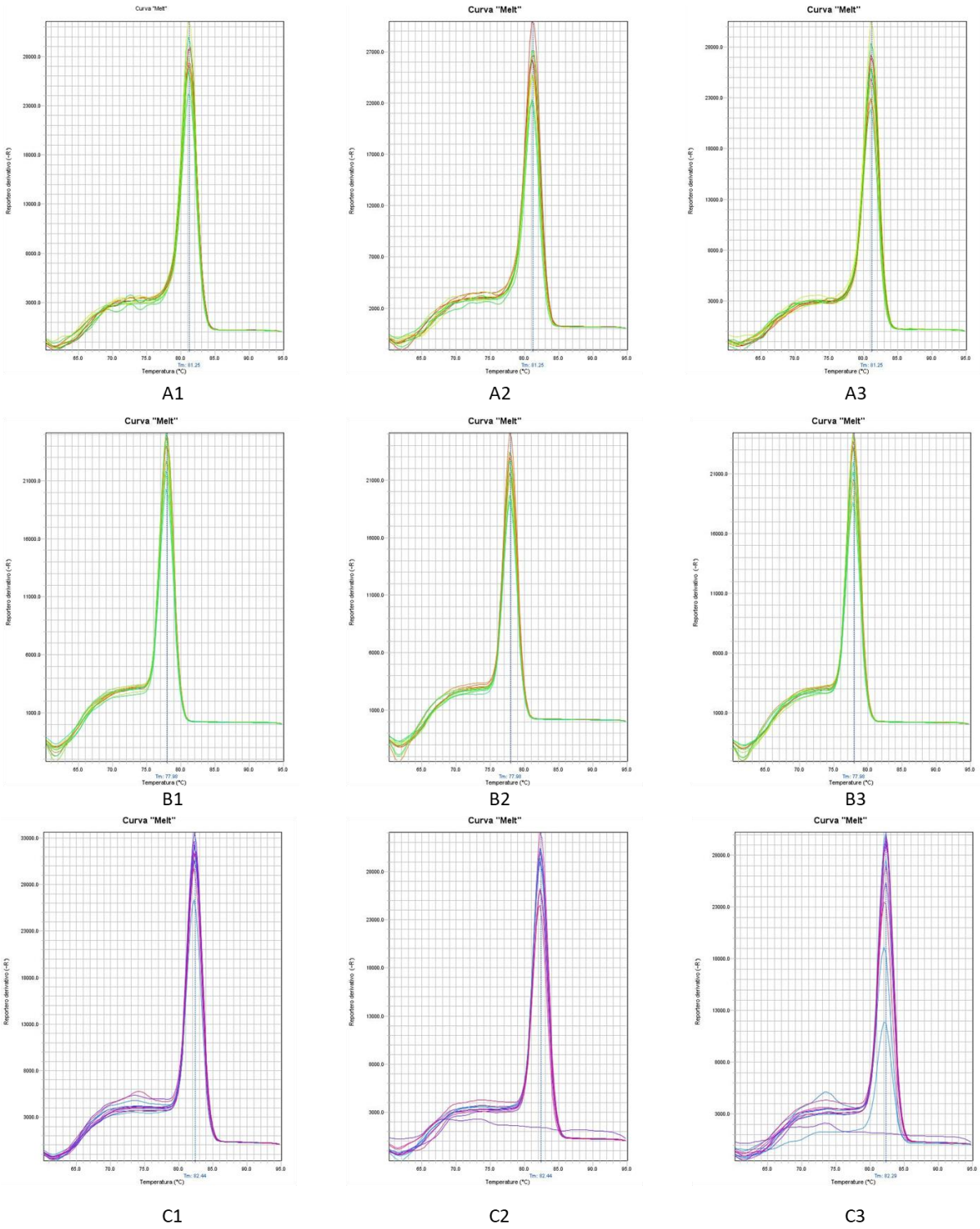


Figura 17. Gráficas de la "curva melt" de cada uno de los transcritos cuantificados, (A)*HPRT1*, (B)*DEK* y (C)*BAG4*, donde cada número indica el número de réplica. En todas las curvas se observa un único pico. Las Tm de los amplicones obtenidos de los transcritos de *HPRT1, DEK* y *BAG4* son 81.25°C, 77.98°C y 82.44°C, respectivamente.

7.3 Determinación del estado de metilacion en los promotores de *DEK* y *BAG4*.

7.3.1 Análisis de las secuencias en METH PRIMER 2.0

Se analizaron las secuencias de los promotores de *DEK* y *BAG4* para la identificación de sitios CpG e islas CpG y al mismo tiempo para la conversión por bisulfito *in silico*, y se obtuvieron oligonucleótidos para MSP.

Promotor DEK.

El análisis sobre la secuencia del promotor de DEK identificó una gran isla CpG de un tamaño aproximado de 800pb en el cual el sitio de inicio de la transcripción (TSS) se ubico justo a la mitad de este. Dentro de esta misma región se encontraron una gran densidad de sitios CpG y se escogio una secuencia a la región cercana al TSS rio arriba para ser amplificada con MSP (Figura 18).

De la región que se analizó con MSP se delimitó la secuencia *in silico* y se identificaron las citosinas ajenas y pertenecientes a sitios CpG. (Figura 19).

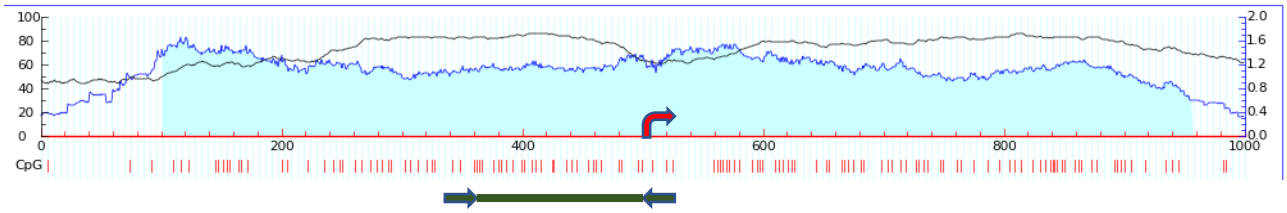


Figura 18. Gráfico del análisis de la secuencia del promotor *DEK*. La flecha en rojo indica el sitio de inicio de la transcripción. Las flechas encontradas en azul indican los oligonucleótidos diseñados flanqueando el amplicón a obtener.

TATATTTTAGGCGTAGTCGGGGAGAGTTTCGCGCGCGTAT

TTTTTCGTTCGCGGTCGAGGCGATTTTTCGCGGTTTCGTT

CGTTCGAGTTTTTCGCGGAGGTATTCGGTCGTTTCGTTTT

TTTCGTTTCGCGTTCGTTAATTTTTAGTTCGCGGTTTTGA

TTGGTCGTCGTATTTTCGTTTTT

Figura 19. Secuencia convertida *in silico* del amplicón de *DEK*. Aquí se ilustra en color rojo las citosinas que son modificadas a timinas y en azul las citosinas dentro de los sitios CpG que no serán alteradas en caso de estar metiladas.

Promotor de BAG4.

El análisis sobre la secuencia del promotor de *BAG4* identificó una pequeña isla CpG de un tamaño aproximado de 150pb en el cual el TSS se ubico rio abajo de este. Dentro de esta misma región se encontraron una baja densidad de sitios CpG y se ocupo una región que incluyera al TSS para la realización de la MSP (Figura 20).

De la region que se analizó con MSP se delimito la secuencia *in silico* y se identificaron las citosinas ajenas y pertenecientes a sitios CpG. (Figura 21).

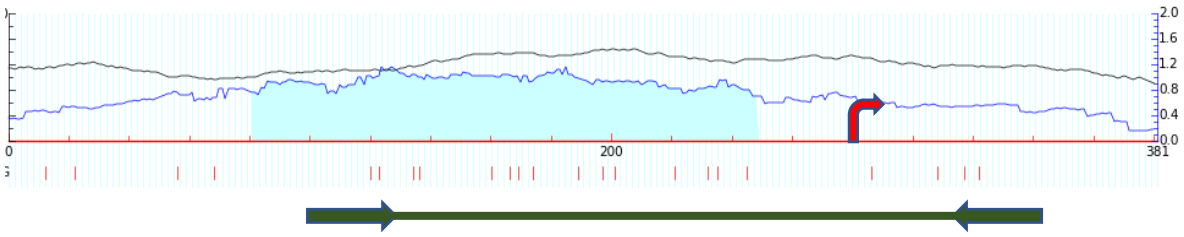


Figura 20. Gráfico del análisis de la secuencia del promotor *BAG4*. La flecha en rojo indica el sitio de inicio de la transcripción. Las flechas encontradas en azul indican los oligonucleótidos diseñados flanqueando el amplicón de interés.

GTTGTAATGTATAGCGGCGGGAGGTTAGCGCGTTTAAAAT

TTTTTTTTTTTTATCGTAGTCGTCGTTTCGGTGGGATTAA

GTTCGGAATTTCGATCGAGATTAGTATTTTTGTTTCGGTT

TTTAGTCGTCGGGGGTTGTCGGAAGTTTTTTTATATTATT

TTTATTTATTTTTTGTAATACGTGTGGGTTTTTAGGAAGA

GGCGGGGTAGTCGTATCGTTGGGGGATATTTTT

Figura 21. Secuencia convertida *in silico* del amplicón de *BAG4*. Aquí se ilustran en color rojo las citosinas que son modificadas a timinas y en azul las citosinas dentro de los sitios CpG que no serán alteradas en caso de estar metiladas.

7.3.2 Validación de oligonucleótidos para MSP

Los oligonucleótidos diseñados fueron validados y estandarizados exitosamente, los cuales fueron empleados para los experimentos posteriores de MSP. Las condiciones establecidas en la validación y estandarización son resumidas en la tabla 6.

La determinación de la Tm óptima para la obtención de un único amplicón en un rango de temperaturas son mostrados en las figuras 22 y 23 para el caso de DEK y las figuras 26 y 27 para el caso de *BAG4*.

La determinación de la especificidad de cada par de oligonucleótidos diseñados al estado de metilación correspondiente es ilustrada en las figuras 24 y 25 para el caso de *DEK* y las figuras 28 y 29 para el caso de *BAG4*.

Las secuencias de los oligonucleótidos y sus temperaturas de alineamiento correspondientes están detalladas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones para la estandarización de las MSP.

Temperatura	**95°C**	**94°C**	**[50 - 60]°C**	**72°C**	**72°C**
Tiempo	10min	15s	45s	35s	10min
Ciclos	1		45		1

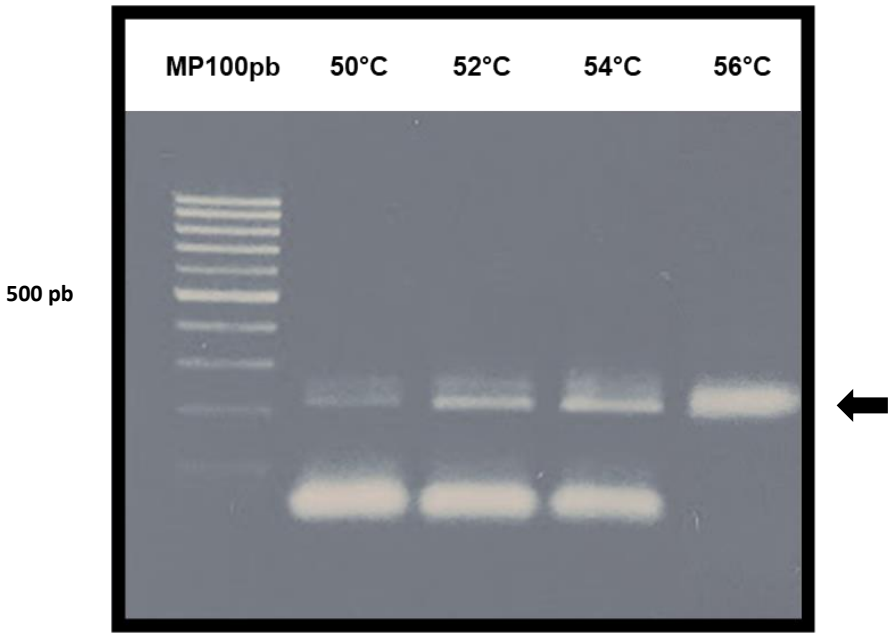


Figura 22. Estandarización de la MSP para el amplicón proveniente del promotor desmetilado de *DEK*. En la imagen se presentan los amplicones resultantes del gradiente de las temperaturas durante el alineamiento utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 56°C. El tamaño del amplificado esperado es de 178pb (señalado con una flecha negra). Productos amplificados a partir de control certificado de ADN genómico humano 100% desmetilado convertido por bisulfito.

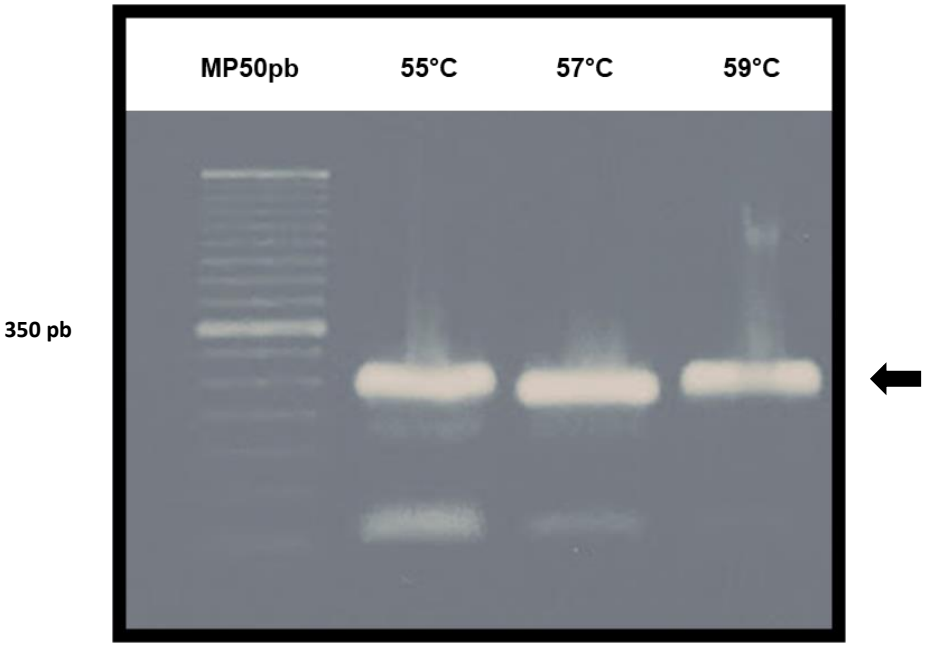


Figura 23. Estandarización de la MSP para el amplicón proveniente del promotor metilado de *DEK*. En la imagen se presentan los amplicones resultantes del gradiente de las temperaturas durante el alineamiento utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de

amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 59°C. El tamaño del amplificado esperado es de 183pb (señalado con una flecha negra). Productos amplificados a partir de control certificado de ADN genómico humano 100% metilado convertido por bisulfito.

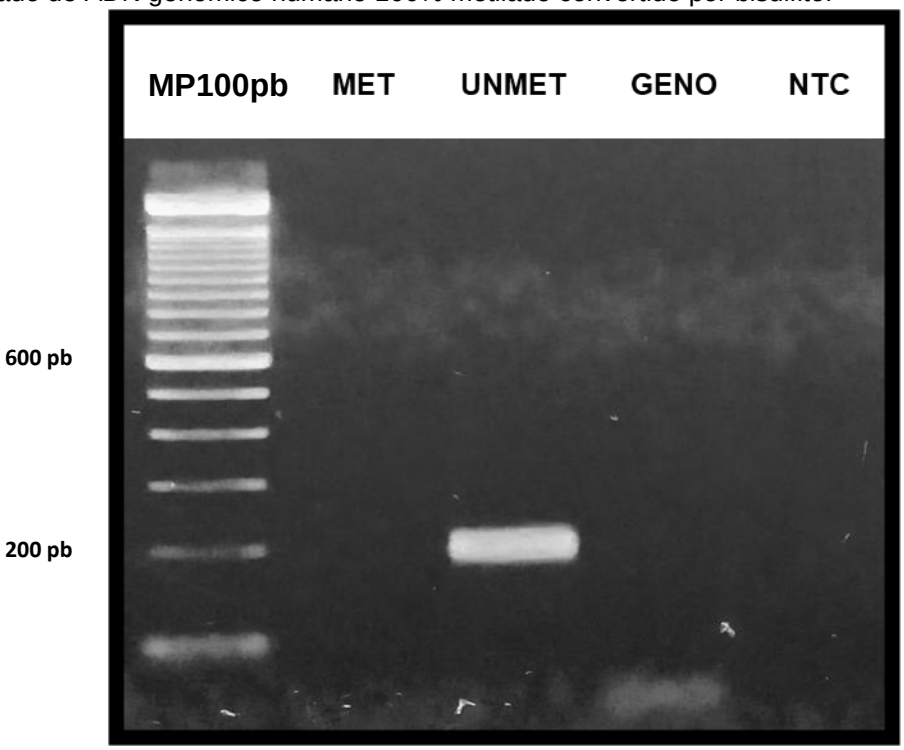


Figura 24. Especificidad de la MSP para discriminar únicamente el promotor desmetilado de *DEK*, usando oligonucleótidos específicos. En la imagen se presentan cuatro reacciones de MSP donde se observa amplificación únicamente en la reacción que contiene ADN genómico desmetilado convertido por bisulfito sódico. El tamaño del amplificado esperado es de 178pb. MSP realizadas a partir de controles certificados de ADN genómico humano 100% metilado (MET) o 100% desmetilado (UNMET) convertido por bisulfito y sin convertir (GENO), control negativo (NTC).

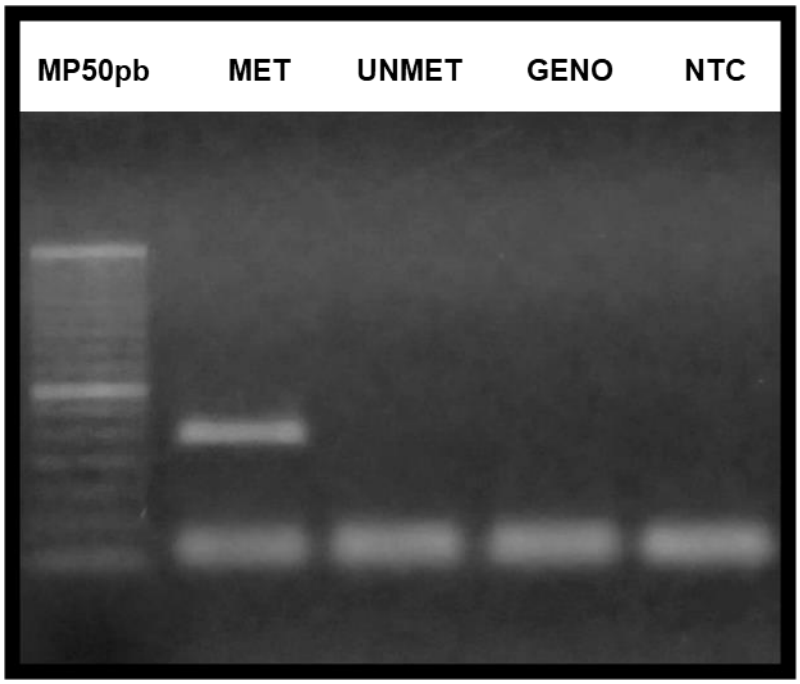


Figura 25. Especificidad de la MSP para discriminar únicamente el promotor metilado de *DEK*, usando oligonucleótidos específicos. En la imagen se presentan cuatro reacciones de MSP donde se observa amplificación únicamente en la reacción que contiene ADN genómico metilado convertido por bisulfito sódico. El tamaño del amplificado esperado es de 183pb. MSP realizadas a partir de controles certificados de ADN genómico humano 100% metilado (MET) o 100% desmetilado (UNMET) convertido por bisulfito y sin convertir (GENO), control negativo (NTC).

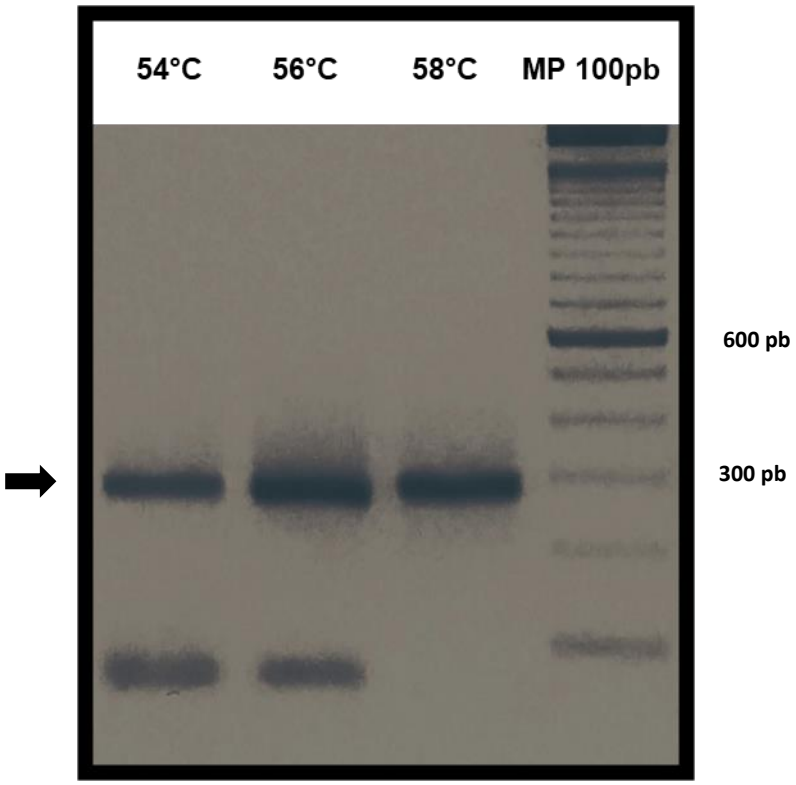


Figura 26. Estandarización de la MSP para el amplicón proveniente del promotor desmetilado de *BAG4*. En la imagen se presentan los amplicones resultantes del gradiente de las temperaturas durante el alineamiento utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 58°C. El tamaño del amplificado esperado es de 230pb (señalado con una flecha negra). Productos amplificados a partir de control certificado de ADN genómico humano 100% desmetilado convertido por bisulfito.

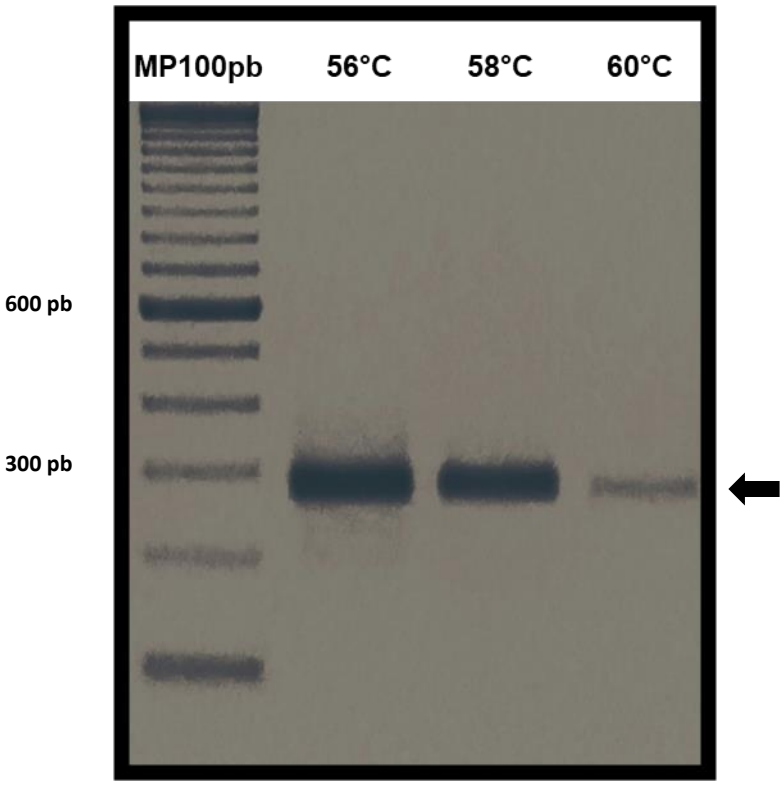


Figura 27. Estandarización de la MSP para el amplicón proveniente del promotor metilado de *BAG4*. En la imagen se presentan los amplicones resultantes del gradiente de las temperaturas durante el alineamiento utilizadas para obtener la temperatura de alineamiento óptima de amplificación, la temperatura de alineamiento elegida fue la de 56°C. El tamaño del amplificado esperado es de 233pb (señalado con una flecha negra). Productos amplificados a partir de control certificado de ADN genómico humano 100% metilado convertido por bisulfito.

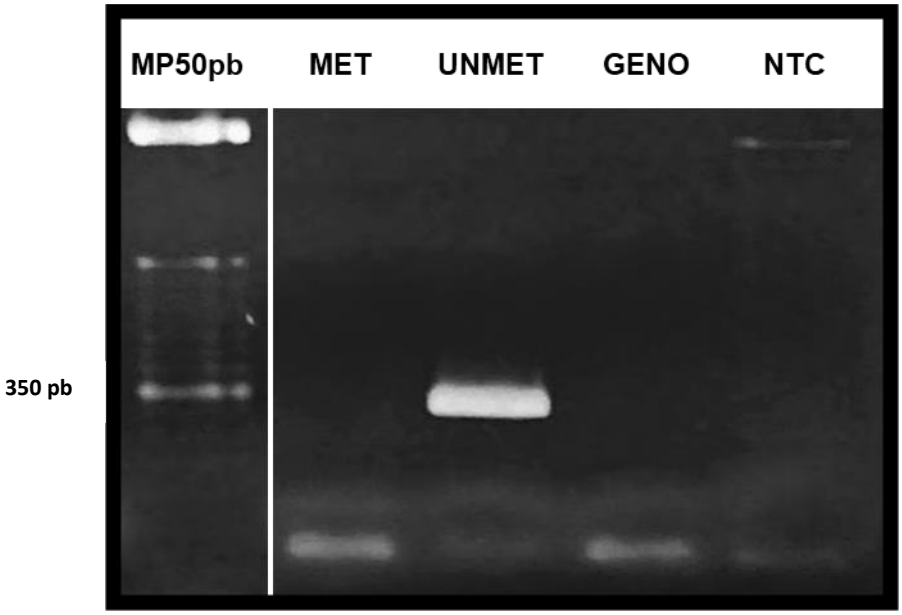


Figura 28. Especificidad de la MSP para discriminar únicamente el promotor desmetilado de *BAG4*. En la imagen se presentan cuatro reacciones de MSP donde se observa amplificación

únicamente en la reacción que contiene ADN genómico desmetilado convertido por bisulfito sódico. El tamaño del amplificado esperado es de 230pb. MSP realizadas a partir de controles certificados de ADN genómico humano 100% metilado (MET) o 100% desmetilado (UNMET) convertido por bisulfito y sin convertir (GENO), control negativo (NTC).

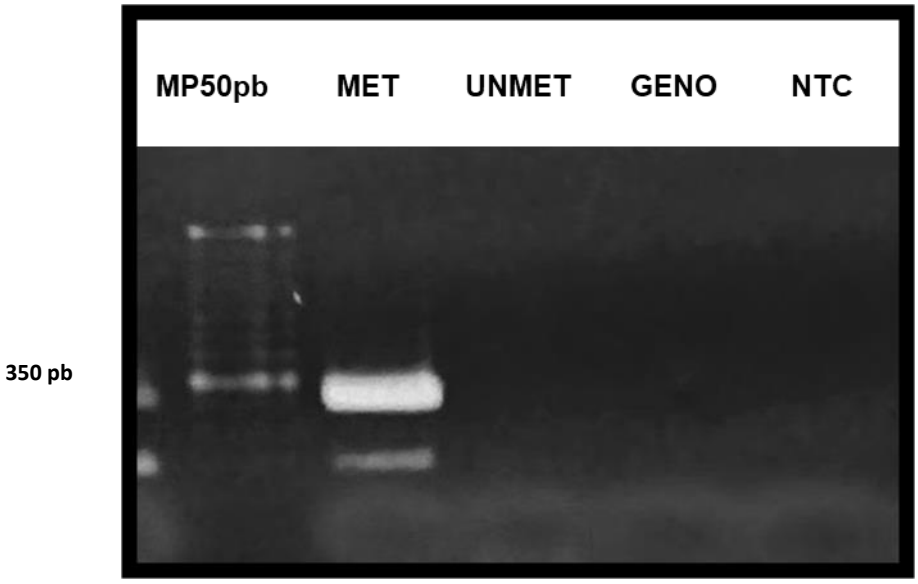


Figura 29. Especificidad de la MSP para discriminar únicamente el promotor metilado de *BAG4*. En la imagen se presentan cuatro reacciones de MSP donde se observa amplificación únicamente en la reacción que contiene ADN genómico metilado convertido por bisulfito sódico. El tamaño del amplificado esperado es de 233pb. MSP realizadas a partir de controles certificados de ADN genómico humano 100% metilado (MET) o 100% desmetilado (UNMET) convertido por bisulfito y sin convertir (GENO), control negativo (NTC).

Tabla 7. Condiciones para la MSP con los oligonucleótidos específicos de los promotores de los genes estudiados.

Gen	Tipo	Tm	Tiempo de alineación	Tamaño del amplicón	Secuencia de los oligonucleótidos (5´a 3´)
DEK	Desmetilado	56°C	45s	178pb	F- ATTTTAGGTGTAGTTGGGGA
					R- AAACAAAAATACAACAACCA
	Metilado	60°C	45s	183pb	F-TATATTTTAGGCGTAGTCGGGG
					R- AAAAACGAAAATACGACGACC
BAG4	Desmetilado	58°C	45s	230pb	F-TTGTAATGTATAGTGGTGGGAG
					R-AAATATCCCCCAACAATACAAC
	Metilado	56°C	45s	233pb	F- GTTGTAATGTATAGCGGCGG
					R-AAAAATATCCCCCAACGATACG

7.3.3 Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico fue extraído y purificado de cada cultivo de todas las líneas celulares con y sin tratamiento con la EGCG a las condiciones previamente determinadas y seleccionadas, y de las mismas muestras de las cuales se obtuvo el ARN total.

Todas las purificaciones de ADN genómico obtenidas fueron visualizadas en geles de agarosa para determinar su integridad, solamente los ADN que cumplieron con la apreciación visual de una banda de alto peso molecular claramente definida fueron seleccionados para ser empleados en la conversión por bisulfito sódico. Los ADN genómicos en los cuales no se apreció esta banda claramente definida y presentaron un barrido a lo largo de todo el carril de migración o ausencia de cualquier señal fluorescente, fueron descartados para cualquier experimento posterior.

Todas las purificaciones de ADN genómico obtenidos fueron cuantificadas con espectrofotometría UV y tomando lecturas de la absorbancia a 230nm, 260nm y 280nm para posteriormente determinar su concentración y calidad, solamente las purificaciones de ADN genómico que obtuvieran un cociente de absorbancias a 260nm y a 280 nm (A260/A280) en un rango de 1.6-1.9, y un cociente de sus absorbancias a 260nm y a 230nm (A260/A230) en un rango de 1.4-2.1; seleccionados para ser empleados en la conversión por bisulfito sódico. Las muestras de ADN genómico en las cuales los valores de cualquiera de los cocientes se encontraron fuera de los rangos establecidos, se consideraron de mala calidad y fueron descartados para cualquier experimento posterior.

ADN genómico de las líneas celulares MCF7.

Figura 30. Integridad de los ADN genómicos obtenidos de MCF7 provenientes de cultivos celulares con (5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo de 24 horas. Aquí se observa una banda de alto peso molecular sin presencia de barridos en cada carril.

Figura 31. Integridad de los ADN genómicos obtenidos de MCF7 provenientes de cultivos celulares con (2.5µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo de 96 horas. Aquí se observa una banda de alto peso molecular en cada carril, en el carril de 2.5µg/mL la banda esta ligeramente barrida.

ADN genómico de las líneas celulares MDA-MB-231.

Figura 32. Integridad de los ADN genómicos obtenidos de MDA-MB-231 provenientes de cultivos celulares con (10µg/mL) o sin tratamiento de la EGCG por un periodo de 24 horas. Aquí se observa una banda de alto peso molecular sin presencia de barridosen cada carril.

7.3.4 Determinación de la metilación con MSP.

Los estados de metilación de los promotores de *DEK* y *BAG4* fueron identificados y se compararon los patrones dentro de los mismos grupos de tratamiento para identificar los cambios en el estado de metilación.

En los cultivos de MCF7 los tratamientos a 5µg/mL por 24 horas y 2.5µg/mL por 96 horas los estados de metilación para el promotor de DEK fueron obtenidos y en ambos casos (Figura 33 y Figura 35) se obtuvo un único amplicón para el estado desmetilado, en ningún caso se obtuvo un amplicón para el estado metilado, en ambos casos el patrón de los amplicones fue semejante por lo que no se consideró que hubo cambios en la metilación. Para los estados de metilación del promotor de

BAG4 obtenidos en ambos casos la presencia de amplicones para el estado desmetilado fueron obtenidos, sin embargo, para el grupo control de las células tratadas a 5µg/mL por 24 horas una banda de menor tamaño al esperado fue observada en el estado desmetilado (Figura 34). Y para el grupo control tanto como del tratamiento de las células tratadas a 2.5µg/mL por 96 horas un amplicón tenue fue observado junto con una banda de menor tamaño al esperado en el estado metilado (Figura 36). No se consideró que hubo cambios en los estados de metilación.

En los cultivos de MDA-MB-231 los tratamientos a 10µg/mL por 24 horas, los estados de metilación para el promotor de DEK fueron obtenidos (Figura 37) se obtuvo un único amplicón para el estado desmetilado, en ningún caso se obtuvo un amplicón para el estado metilado, el patrón de los amplicones fue semejante por lo que no se consideró que hubo cambios en la metilación. Para los estados de metilación del promotor de BAG4 (Figura 38) la presencia de amplicones para el estado desmetilado fueron obtenidos y no se consideró que hubo cambios en los estados de metilación.

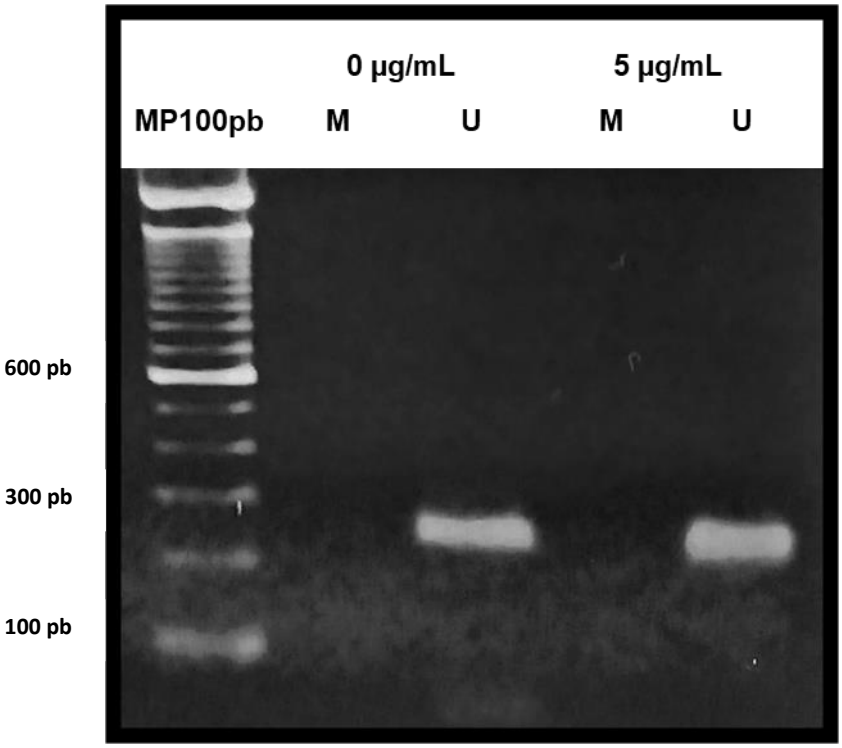


Figura 33. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *DEK* de la línea celular MCF7 tratada con la EGCG por 24 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 100pb (MP100).

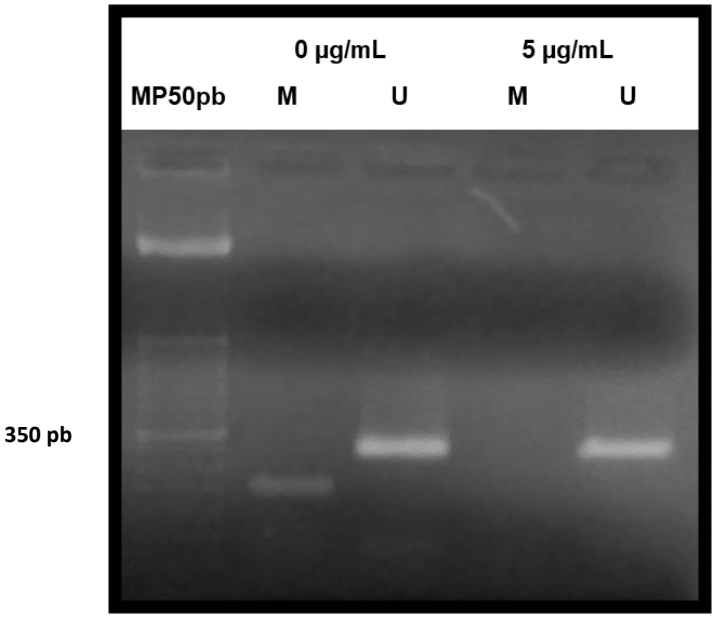


Figura 34. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *BAG4* de la línea celular MCF7 tratada con la EGCG por 24 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 50pb (MP50).

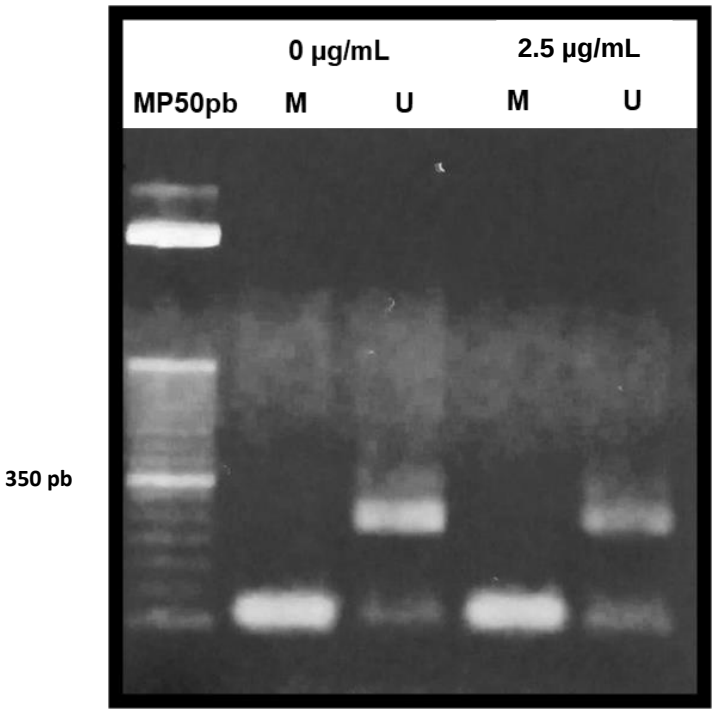


Figura 35. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *DEK* de la línea celular MCF7 tratada con la EGCG por 96 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 50pb (MP50).

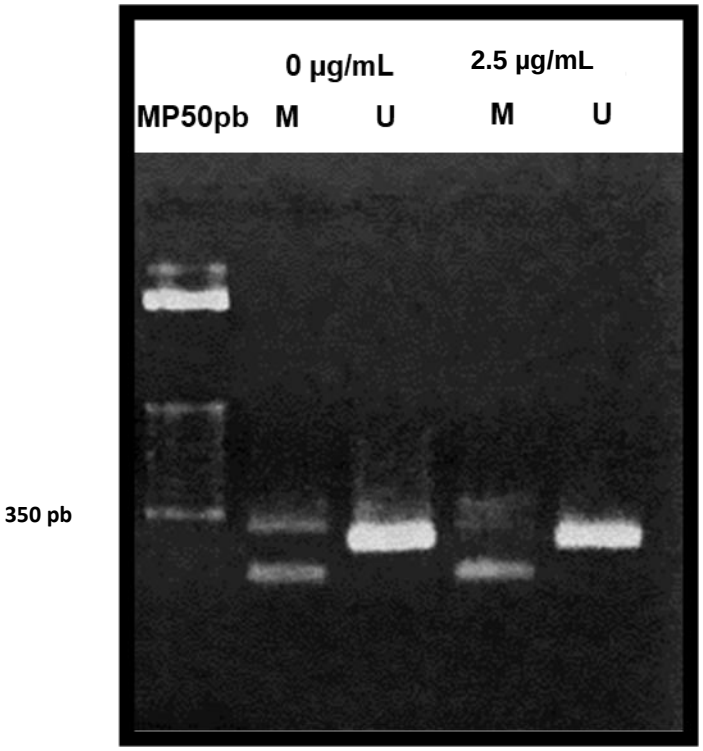


Figura 36. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *BAG4* de la línea celular MCF7 tratada con la EGCG por 96 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 50pb (MP50).

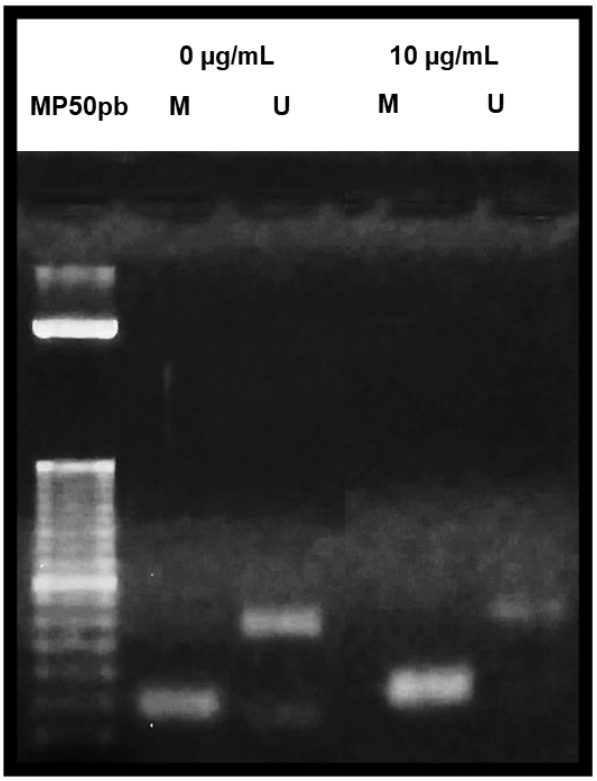


Figura 37. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *DEK* de la línea celular MDA-MB-231 tratada con la EGCG por 24 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 50pb (MP50).

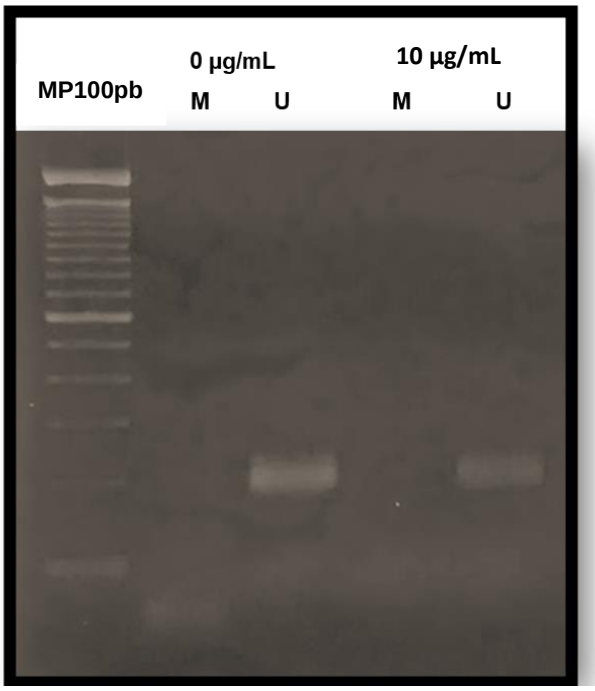


Figura 38. Visualización de amplicones de la MSP para determinar el estado de la metilación del promotor de *BAG4* de la línea celular MDA-MB-231 tratada con la EGCG por 24 horas. Oligonucleótidos para determinar ADN desmetilado (U) o ADN metilado (M). Marcador de peso molecular de 100pb (MP100).

7.4 Secuencias de los amplicones.

Las secuencias de los amplicones de las MSP para el estado desmetilado de MCF7 con (5µg/mL) y sin tratamiento de la EGCG por 24 horas fueron alineados y cada sitio CpG identificado dentro de la secuencia fue analizado y comparado su estado de metilación de (Figura 39). No se encontró modificación en la metilación en ningún sitio CpG.

```
                1        10        20        30        40        50        60
Genomic         CACACTCCAGGCGCAGCCGGGGAGAGCCCCGCGCGCGCATCCCTCCGCCCGCGGCCGAGG
DEK_METH        TATATTTTAGGCGTAGTCGGGGAGAGTTTCGCGCGCGTATTTTTTCGTTCGCGGTCGAGG
MCF7_96DEKC     --TATTTTAGGTGTAGTTGGGGAGAGTTTTGTGTGTGTATTTTTTTGTTTGTGGTTGAGG
MCF7_96DEKT     --TATTTTAGGTGTAGTTGGGGAGAGTTTTGTGTGTGTATTTTTTTGTTTGTGGTTGAGG

               61        70        80        90       100       110       120
Genomic         CGACCCCTCGCGGTCCCGCCCGCCCGAGCTTCCCGCGGAGGCACCCGGCCGCCCCGCCTC
DEK_METH        CGATTTTTCGCGGTTTCGTTCGTTCGAGTTTTTCGCGGAGGTATTCGGTCGTTTCGTTTT
MCF7_96DEKC     TGATTTTTTGTGGTTTTGTTTGTTTGAGTTTTTTGTGGAGGTATTTGGTTGTTTTGTTTT
MCF7_96DEKT     TGATTTTTTGTGGTTTTGTTTGTTTGAGTTTTTTGTGGAGGTATTTGGTTGTTTTGTTTT

              121       130       140       150       160       170       180
Genomic         CCCCGCCCCGCGCCCGCCAACTCCCAGCTCGCGGCCCTGATTGGTCGCCGCATTCCCGCT
DEK_METH        TTTCGTTTCGCGTTCGTTAATTTTTAGTTCGCGGTTTTGATTGGTCGTCGTATTTTCGTT
MCF7_96DEKC     TTTTGTTTTGTGTTTGTTAA-TTTTAG----------------------------------
MCF7_96DEKT     TTTTGTTTTGTGTTTGTTAA-TTTTAG----------------------------------

              181       190
Genomic         CTC
DEK_METH        TTT
MCF7_96DEKC     ---
MCF7_96DEKT     ---
```

Figura 39. Alineamiento de las secuencias. Secuencias obtenidas de los amplicones de MSP usando oligonucleótidos desmetilados para *DEK* en el ADN convertido por bisulfito sódico de la línea celular MCF7 tratada con la EGCG (MCF7_96*DEK*T) y sin tratar (MCF7_96*DEK*C) por un tiempo de 96 horas. Las T resaltadas en azul indican citosinas de sitios CpG que fueron convertidas a timinas. Secuencia obtenida de las bases de datos del promotor *DEK* (Genomic). Secuencia para *DEK* metilada y convertida *in silico* (*DEK*_METH).

8. Discusión

La gran variedad de efectos fisiológicos, bioquímicos y en la regulación transcripcional sobre una gran diversidad de genes por la EGCG se conocen desde hace bastante tiempo. Dentro de esta variedad de efectos el que nos intereso es su actividad anticancerígena.

Dentro de los reportes que existen actualmente se determina que las concentraciones mínimas toxicas y/o letales son diferentes (57–60). Esto podría tener diversas explicaciones, ya que se determinan en diferentes tipos de células, provenientes de diferentes tipos de cáncer, por mencionar algunas posibles razones.

Examinando los mecanismos de acción propuestos del efecto de esta molécula en la célula tumoral, varias vías de señalización que se encuentran alteradas en las líneas celulares, podrían explicar el fuerte, bajo o nulo efecto, entre ellas la vía de WNT/β-catenina (48,58,61–63), entre muchas otras, las cuales contribuyen de diferente manera con la supervivencia y proliferación celular y se encuentran alteradas de diferente manera dependiendo la célula que se estudió.

En otros estudios también han determinado el efecto de la EGCG en la proliferación, viabilidad, movilidad y apoptosis de las líneas celulares provenientes de tumores mamarios, algunas de ellas son el mismo tipo que nosotros empleamos en este trabajo. La línea celular MCF7 es un tipo celular tumoral proveniente de un adenocarcinoma mamario de una paciente de 69 años y fue establecida como tal desde 1973 (64). Es empleada como modelo de estudio de procesos tumorales *in vitro* y sus principales características son su morfología de tipo epitelial, poseer receptores a estrógenos (65). La línea celular MDA-MB-231 es un tipo celular tumoral proveniente de un adenocarcinoma mamario de una paciente de 51 años y fue establecida desde 1973 (66). También es empleada como modelo de estudio de procesos tumorales in vitro y de invasión, sus principales características son su morfología siendo células alargadas presentado espinas en sus polos (67).

En estudios donde la supervivencia de las células se determinó (40,45,47,63,68–71), entre ellos se encontraron resultados muy diferentes, nuestros resultados son

similares a algunos de ellos. En algunos casos las concentraciones letales y subletales de la EGCG son bastantes diferentes en comparación de las concentraciones determinadas y empleadas en este trabajo.

Esto podría deberse a la fuente de obtención y los procesos de purificación, ya que en muchos reportes el compuesto de la EGCG es purificado en el mismo laboratorio y no necesariamente reportan la calidad y pureza de este (72). También podría influir la forma de preparación y administración de la EGCG ya que varía entre reportes y en muchos de ellos (68,71,73) la forma de administración es acompañada con DMSO para facilitar la solubilidad de la EGCG en medio acuoso. Sin embargo, en nuestro caso no fue así, ya que debido a indicaciones del fabricante se preparó en agua ultrapura y no hubo ningún problema de solubilidad o precipitación. Cabe mencionar que en un inicio también se intentó disolver en solución tamponada de fosfatos usados para el mismo lavado de los cultivos celulares, sin embargo, al cabo de tres días de disuelto la EGCG, esta solución cambiaba drásticamente de color por una posible reacción del compuesto con la solución y sus componentes, pensando una posibilidad de oxidación de la EGCG, por lo que se decidió no emplear esta forma para las exposiciones del compuesto en el medio de cultivo.

Como se observa en los resultados obtenidos, en los efectos de la EGCG sobre la supervivencia, esta va disminuyendo conforme las concentraciones de la EGCG van aumentando y aunque los resultados difieren con algunos reportes la conclusión, seguiría siendo la misma: la EGCG tiene un efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales a altas concentraciones.

Solo por mencionar, existe una gran diversidad de estrategias para determinar supervivencia, viabilidad y proliferación. Nuestra estrategia fue simple pero robusta ya que solo se cuantificaron las células que permanecían adheridas durante el tratamiento, aunque no se analizó si estas células eran capaces de seguir replicándose o de regresar a un estado similar del que partieron en un inicio, por lo que existen limitantes para su análisis.

Con respecto al posible “aumento de células” de MCF7 señalados en los resultados (Figura 5), pensamos que es un “artefacto” de la naturaleza experimental que se

empleó, ya que este se limita únicamente a asociar el tinte retenido en células capaces de hacerlo y que se encuentren adheridas, mas no si están se encuentran aún vivas. Junto con los reportes disponibles del efecto de la EGCG en la línea celular MCF7 y lo observado en este trabajo, podemos decir que este compuesto tiene efectos más pronunciados sobre esta línea celular, lo cual podría deberse a que el efecto de la EGCG es tan citotóxico y rápido que las células mueren mientras permanecen adheridas (Figura 5, supervivencia a 100µg/mL), similar a cuando son fijadas.

Además, como se observó en las fotografías de los cultivos de MDA-MB-231 (Figura 6) los efectos de la EGCG a bajas concentraciones a nivel morfológico sobre las células, aunque no tienen cambios apreciables en la supervivencia, la forma de las células se ve bastante afectada aludiendo a un posible estrés, disminución aparente en el número de estas e incluso reducción en la extensión de la célula sobre la superficie de la caja, además de la apreciación de vacuolas intracelulares posiblemente ligadas a un efecto apoptótico.

También es interesante la observación en los patrones de bandas en la extracción de los ARN totales para la determinación de la integridad y aunque este paso es crucial para la realización de una buena cuantificación en los transcritos, no se esperaba observar una banda (Figura 15) entre las correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S en los ARN totales de los tratamientos con la EGCG. Es evidente que en los ARN totales purificados de MDA-MB-231 que no tuvieron tratamiento alguno con la EGCG no se observa este cambio, por lo que es un efecto ocasionado por la exposición al mismo. Mas interesante es que esta banda aparece de mayor intensidad a la concentración de tratamiento con la EGCG de 25µg/mL y conforme se aumentó la concentración de exposición al compuesto esta va decayendo de intensidad mas no desaparece totalmente. Cabe mencionar que se buscaron en la literatura observaciones similares, sin embargo, no se hallaron reportes con esta evidencia.

Se sugiere que esta observación pudiera servir de indicador sobre el efecto de la EGCG en cultivos celulares. Podría ser una respuesta a nivel de los ARN

ribosomales en los cuales, ya sea por regulación transcripcional o post-transcripcional, ocurre una modificación en el tamaño de estos o que los inhabilita para adquirir la conformación tridimensional necesaria para llevar a cabo la traducción de los ARN mensajeros y ser una de las causas de la muerte de las células.

También hay que añadir que estas observaciones solo se obtuvieron en las líneas celulares MDA-MB-231 y no en la línea celular MCF7, aunque los experimentos fueron realizados en las mismas condiciones. Todo esto genera nuevas preguntas como ¿En qué otras líneas celulares se observaría el mismo efecto? o también ¿Qué características de las células determinan ese efecto y que no tienen aquellas que no lo presenten? ¿Cuánto afecta esto a la traducción?

Hasta este punto la evidencia nos dice que la EGCG es un compuesto cuyo efecto puede depender del tipo de célula utilizada y que depende tanto de las condiciones como la concentración (aunque no únicamente (67)). Esto explicaría la abundancia de reportes en los cuales caracterizan el efecto de la EGCG sobre muchas vías de señalización y procesos bioquímicos en una gran diversidad de líneas celulares con diferentes características. En resumen, la EGCG a bajas concentraciones tiene un efecto de modular y altas concentraciones estos efectos pueden ser opacados, superados o sustituidos por efectos citotóxicos que ocasionen la muerte celular (Figura 40).

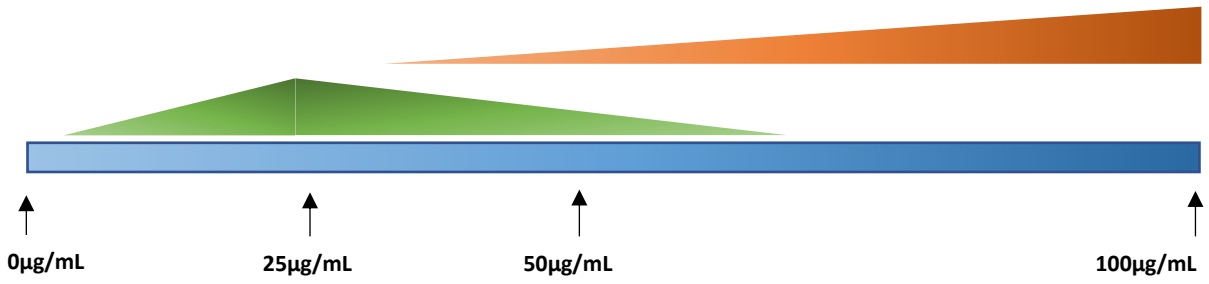


FIGURA 40. Esquema que ilustra los diferentes efectos de la EGCG a diferentes concentraciones. En color verde se ilustra la variación de la intensidad del efecto de modular en general en ese rango de concentraciones. En color rojo se ilustra el efecto citotóxico y su aumento de acuerdo con la concentración.

Hasta el momento, no hay evidencia sobre el efecto de la EGCG en la trascripción sobre los genes *DEK* y *BAG4*. En la literatura disponible se analiza los cambios de la expresión que pudiera ocasionar este compuesto u otros compuestos fenólicos de origen natural en los genes más estudiados en procesos oncológicos, como son E-caderina (62), β-catenina (62), DNMT1 (40,74), HDAC1 (40,74), p21 (74), suvirvina (40) por mencionar algunos.

Los genes aquí estudiados, *DEK* y *BAG4*, pertenecen al grupo de los oncogenes, en los cuales su desregulación y sobreexpresión son claramente componentes de procesos cancerígenos (75,76). Además, se sabe que son elementos importantes para la evolución tumoral de la célula y el mantenimiento de malignidad, ya que al ser suprimidos la célula pierde viabilidad.

En los resultados obtenidos se observó claramente una disminución dosis-dependiente de los transcritos *DEK* y *BAG4*. Cabe mencionar que los efectos son apreciablemente observables hasta alcanzar ciertas concentraciones superiores, a más de 25µg/mL, en ambos casos y que, de igual manera, como antes se mencionó, la EGCG puede tener distintos efectos y formas de actuar dependiendo de la concentración y la forma de exposición.

Sin embargo, aunque no se pudieron apreciar cambios en la expresión en ninguno de los genes estudiados a concentraciones de 25 µg/mL o menos, es claro que la EGCG está provocando un efecto sobre la célula.

Aunque en otros reportes (77) se observan efectos moduladores casi instantáneos y a más bajas concentraciones, los efectos que se analizan son sobre las vías de señalización y modificaciones post-traduccionales, como en los estados de fosforilación sobre las proteínas que participan en estas vías. Así, no habría un

punto de comparación sólido, por lo que las variaciones en la expresión en estos rangos (<20 µg/mL, en tiempo no superiores a las 6 horas) tanto de *DEK* como de *BAG4* deberían de monitorearse en esas mismas condiciones. En este trabajo se decidió no hacerlo de esa manera debido a que las modificaciones en la metilación en el ADN son eventos que pueden tardar entre 3 a 7 días o más.

A concentraciones superiores a 25 µg/mL es claro el efecto en la disminución de la expresión que va desde aproximadamente el 50% para el caso de *DEK* en un tiempo de 72 horas y hasta al 25% o menos para *BAG4*. En este caso se observaron efectos citotóxicos severos a los cultivos, los cuales se vieron acompañados de una disminución de la expresión de los genes estudiados.

En la actualidad se sabe claramente el papel epigenético modulador de una gran variedad de compuestos fenólicos de origen natural, como son los efectos de estos a nivel de la remodelación de la cromatina y marcas de histonas (78) y, lo que fue el interés de este trabajo, la metilación del ADN (79).

La EGCG tiene actividad evidente en la modificación de la metilación en distintos genes a nivel del promotor (74), sin embargo esos genes estudiados pueden ser catalogados dentro del grupo de los genes supresores de tumores. Los efectos observados de la EGCG sobre las líneas celulares tumorigénicas estudiadas por estos autores, son efectos desmetiladores, por lo que el cambio del estado metilado a desmetilado promovería la expresión *de novo* de estos genes supresores de tumores, alterada en un inicio en estas células tumorigénicas, trayendo consigo efectos reguladores en los procesos para la proliferación y supervivencia, principalmente. Por otro lado, los procesos moleculares en la célula encargados de regular la metilación del ADN y las implicaciones de los compuestos fenólicos naturales sobre estos mismos aún no se encuentran bien elucidados ni caracterizados.

La EGCG no solamente ocasionaría un efecto de eliminar la metilación sino también de promover la metilación al ADN y esto a su vez traería consigo la supresión de la expresión genética, incluyendo los oncogenes. Un método simple y rápido para determinar el estado de metilación es la MSP. Para emplear esta técnica se

diseñaron y validaron los oligonucleótidos específicos para determinar el estado de metilación (Figuras de la 22 a la 29) (Tablas 6 y 7).

A la fecha en la cual ya se tenían diseñados los oligonucleótidos para la detección del estado de metilación con MSP para *DEK* se publicó un artículo donde los autores analizaron el estado de metilación del promotor *DEK* y cómo esta influía en la regulación transcripcional de este mismo gen. Este trabajo es el primero en su tipo, donde determinan la importancia de la metilación del promotor *DEK* (80). En esta investigación mencionada se determinó experimentalmente la región mínima promotora necesaria para la transcripción del gen. Al comparar las secuencias de las regiones con nuestros resultados, coincide sobre la misma región que ellos determinaron como región mínima promotora (Figura 42). En este trabajo se analizó la metilación en una región más pequeña a comparación de la investigación antes mencionada y por una técnica diferente, la MSP, la cual solo determina el estado de la metilación de los sitios CpG que se encuentran en la región donde hibrida cada oligonucleótido, a diferencia del trabajo de Quiao, et al. (80) donde emplearon la BSP (por sus siglas en inglés, secuenciación de amplicones provenientes de ADN modificado por bisulfito) en la cual sus oligonucleótidos hibridaron en zonas donde no se encuentra ningún sitio CpG y así no se discriminó entre ADN metilado y desmetilado.

En un inicio se determinó el estado de metilación en el promotor *DEK* a bajas concentraciones de la EGCG, 5µg/mL y 10µg/mL y a un bajo periodo de tiempo, 24 horas las líneas celulares estudiadas. Los resultados indican que bajo estas condiciones no hay cambios en la metilación (Figura 33 y Figura 37). Después, como se ha venido mencionando que los cambios en la metilación pueden tomar días, se realizaron cultivos de 5 días a bajas concentraciones de la EGCG (2.5µg/mL) en la cual tampoco se observaron cambios en la metilación (Figura 35). No se pudo realizar el mismo ensayo sobre la línea celular MDA-MB-231, por lo cual no se obtuvieron resultados para analizar y discutir.

Por otro lado, la ausencia de cambios en la metilación que encontramos empleando MSP no necesariamente significa que no haya cambios en la metilación en todo el

promotor ya que se determinaron únicamente 5 sitios CpG de los 30 sitios CpG que abarca todo el amplicón (Figura 41).

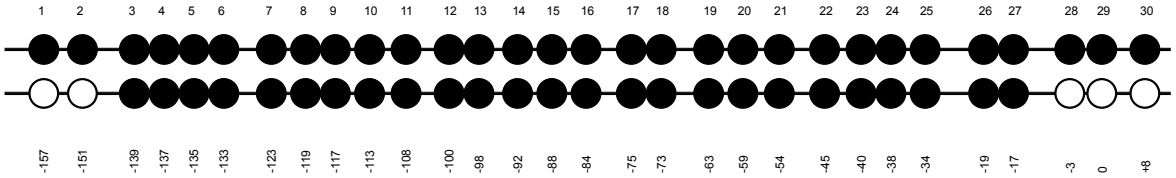


Figura 41. Esquema simplificado de los sitios CpG ubicados en la región del promotor de *DEK*. Los círculos en blanco ilustran los sitios CpG responsables de la discriminación en las MSP (dos a la izquierda, tres a la derecha, cinco en total). Los números superiores enumeran cada sitio CpG (30 en total) ubicado dentro de la región del amplicón obtenido en las MSP. Los números inferiores determinan la posición relativa de cada sitio CpG con respecto al sitio de origen de la transcripción. Sitios analizados 5/30.

Estos sitios CpG se encontraron también desmetilados en muestras de ADN de leucocitos obtenidos de donantes sin cáncer.

En el trabajo de Quiao, et al. (80) al comparar el estado de metilación de algunos de sus sitios CpG en sus resultados de secuenciación, los cuales nosotros también analizamos con MSP, coinciden en que se encuentran desmetilados tanto para muestras de líneas celulares tumorales como para líneas celulares no tumorales y tejido sano hepático, por otro lado ellos encuentran modificación en la metilación en sitios CpG muy específicos, aunque algunos de estos sitios se encuentran en los amplicones que obtuvimos y mediante una secuenciación pudieran identificarse, la MSP empleada no es capaz de discriminar y por ello se realizaron las secuenciaciones.

Diseñar nuevos oligonucleótidos los cuales hibriden en los sitios CpG que ellos reportan donde hubo cambios permitiría determinar cambios en la metilación. Lo interesante es que encontraron diferencias de la metilación, entre muestras tumorales y no tumorales, en una región de unión para el factor transcripcional AP2α, la cual contiene varios sitios CpG. Aunque no es el único responsable de la transcripción de este gen, determinaron que si es muy importante para este propósito, además de que el estado de metilación influye para llevar acabo su

actividad y se sabe por otros estudios que es un factor transcripcional capaz de discriminar el estado de metilación de su sitio de unión (81).

Para poder determinar el estado de metilación de los sitios CpG dentro de los amplicones obtenidos por MSP se secuenciaron y se comparó cada sitio CpG con su respectivo control sin tratamiento.

Lamentablemente, debido a errores en el proceso de secuenciación que consumieron los recursos con los que se contaba para este propósito, no se pudieron enviar todos los amplicones obtenidos de cada experimento y únicamente se obtuvieron datos de secuenciación de la línea celular MCF7 (96 horas) y del promotor de *DEK* (Figura 39).

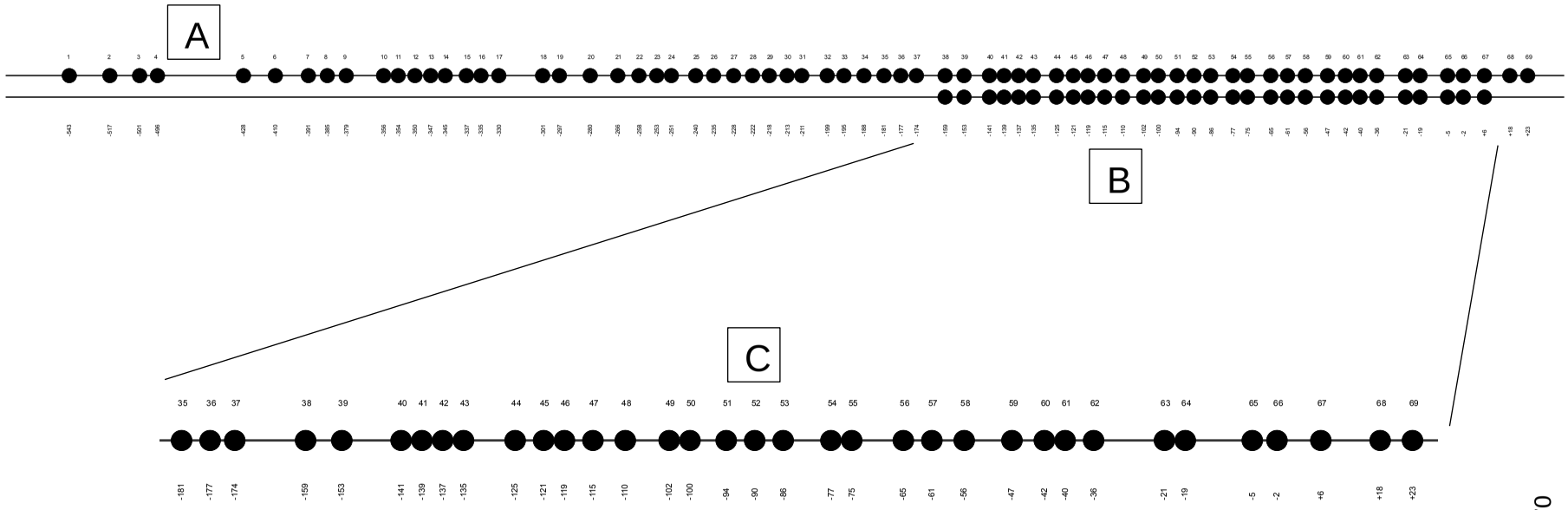


Figura 42. Esquema simplificado de los sitios CpG ubicados en una región más amplia en el promotor de DEK. Aquí se ilustra la posición de la región analizada en este trabajo con respecto a la región analizada por Quiao, et al. (80). (A) posición relativa de los sitios CpG en la secuencia del trabajo de Quiao, et al. (80), (B) región analizada en este trabajo, (C) la misma región del inciso B amplificada para visualizar la numeración y posiciones de los sitios CpG con respecto a la de Quiao, et al. (80). La numeración inferior a los diagramas es relativa al TSS.

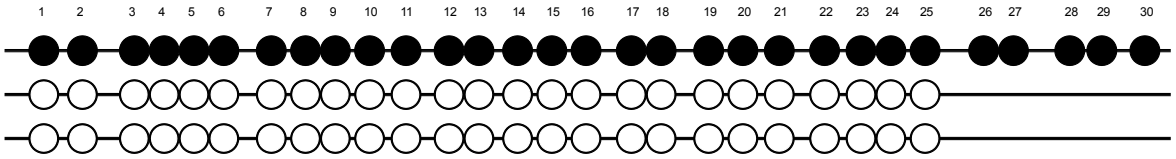


Figura 43. Esquema simplificado de los sitios CpG determinados por secuenciación. La posición inferior de los círculos en blanco ubica el sitio CpG con respecto al diagrama superior junto con la enumeración respectiva dentro del amplicón obtenido del promotor del gen *DEK* por MSP. La ausencia de un círculo blanco significa que no pudo ser determinado el sitio CpG.

Estos únicos resultados de secuenciación obtenidos mostraron que el promotor de *DEK*, por lo menos en esta pequeña región analizada, se encuentra totalmente desmetilado y que la EGCG no ocasiona cambios en ningún sitio CpG. Debido a la naturaleza misma de la técnica, no fue posible discriminar los últimos 5 sitios CpG sin embargo, como los últimos dos pertenecen a los sitios CpG que discrimina uno de los oligonucleótidos de la MSP, no se tienen esos resultados de estado de la metilación que se encuentran prácticamente sobre el sitio de inicio de la transcripción (Figura 43).

Por último, con respecto al promotor *DEK*, los análisis *in silico* muestran una gran abundancia de sitios CpG ubicados en varias islas CpG sobre y aledañas al promotor, tanto río arriba como río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Figura 18), a lo largo de más de 1500 pb. La limitante intrínseca de MSP nos restringió a trabajar en una pequeña región, y aunque es la región crucial para la transcripción del gen, sería importante conocer el estado de metilación de todo este sitio e incluso regiones alejadas que se involucren en la transcripción de este.

A diferencia del promotor de *DEK*, hasta la fecha no hay reportes ni estudios sobre la situación de la metilación del promotor o su asociación con la regulación de la transcripción del gen *BAG4*.

Sin embargo, el análisis *in silico* de la secuencia (Figura 20) muestra una probable isla CpG que pudiera influir en la transcripción de este gen. Para determinar el estado de metilación de este promotor también se empleó la técnica de MSP, en la cual los resultados muestran que permanece desmetilada en ambas líneas

celulares a bajas dosis de la EGCG probadas en pequeños lapsos de tiempos (Figuras 34 y 38) y en un periodo de 96 horas para MCF7 (Figura 36).

Al igual que en el caso del amplicón de *DEK*, la ausencia de cambios en la metilación que encontramos empleando MSP no necesariamente significa que no haya cambios en la metilación en todo el promotor ya que se analizaron únicamente 4 sitios CpG de los 19 sitios CpG que se encuentran en todo el amplicón (Figura 44).

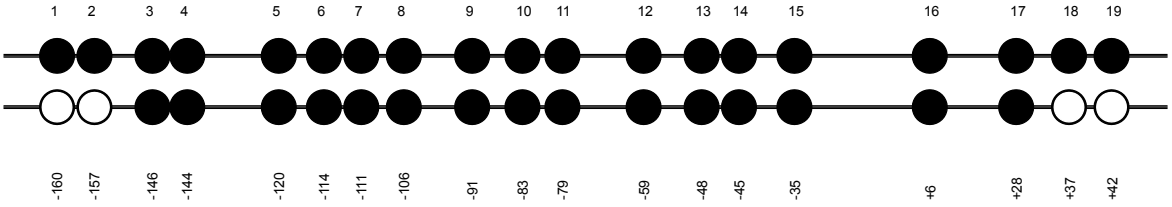


Figura 44. Esquema simplificado de los sitios CpG ubicados en la región del promotor de *BAG4*. Los círculos en blanco ilustran los sitios CpG responsables de la discriminación en las MSP (2 a la izquierda, 2 a la derecha, 4 en total). Los números superiores enumeran cada sitio CpG (19 en total) ubicado dentro de la región del amplicón obtenido en las MSP. Los números inferiores determinan la posición relativa de cada sitio CpG con respecto al sitio de origen de la transcripción. Sitios analizados 4/19.

Por otro lado, las electroforesis de agarosa muestran que se obtuvieron amplicones, aunque en muy baja eficiencia, con los oligonucleótidos para determinar el estado metilado del promotor *BAG4* (Figura 36). Esto pudiera decir que BAG4 está metilado en uno de los cromosomas. Sin embargo, también están acompañadas de un amplicón inespecífico, lo cual haría dudar de los resultados.

No se pudo realizar el mismo ensayo por un periodo de tiempo mayor (5 días) sobre la línea celular MDA-MB-231.

Cabe mencionar que estos sitios CpG se encontraron también desmetilados en muestras de ADN de leucocitos obtenidos de donantes sin cáncer. Si en estas muestras la expresión del gen *BAG4* se encuentran silenciada o por lo menos atenuada, teniendo por causa la metilación, otros sitios CpG que no consideramos pudieran ser los responsables de que existiera esta forma de regulación.

9. Conclusiones

Al integrar los resultados obtenidos, podemos resaltar que bajas concentraciones de la EGCG (<25µg/mL) en los cultivos celulares no ocasionan cambios en la expresión de los transcritos de *DEK* y *BAG4*, ni en la metilación en sus respectivos promotores. Por otro lado, a concentraciones mayores, el compuesto tiene efectos citotóxicos sobre las células y también tiene un efecto en la expresión génica, ocasionando una disminución de los transcritos de *DEK* y *BAG4* (únicamente determinado en MCF7).

10. Bibliografía

1. Weinberg RA. The biology of cancer. 2nd ed. New York: Garland Science; 2014. 4–5, 7–9, 12–13 p.
2. Alves JM, Prieto T, Posada D. Multiregional Tumor Trees Are Not Phylogenies. Vol. 3, Trends in Cancer. Elsevier Inc.; 2017. p. 546–50.
3. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. Nat Commun. 2018 Aug 1;9(1):3490.
4. Ruddon RW. Cancer biology. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007. 42, 324–326, 352–354 p.
5. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet. 2016;17(8):487–500.
6. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet. 2000;9(16):2395–402.
7. Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. PLoS Genet. 2012;8(6):e1002750.
8. Bird AP. CpG-Rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 1986;321(6067):209–13.
9. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. Nature. 2015;517(7534):321–6.
10. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. Oncogene. 2001;20(24):3139–55.
11. Suganuma M, Saha A, Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. Cancer Sci. 2011;102(2):317–23.
12. Adak M, Abdel-Gabbar M. Green tea as a functional food for better health: A brief review. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2011;2(2):645–64.

13. Scholey A, Downey LA, Ciorciari J, Pipingas A, Nolidin K, Finn M, et al. Acute neurocognitive effects of epigallocatechin gallate (EGCG). Appetite. 2012;58(2):767–70.

14. Pournourmohammadi S, Grimaldi M, Stridh MH, Lavallard V, Waagepetersen HS, Wollheim CB, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) activates AMPK through the inhibition of glutamate dehydrogenase in muscle and pancreatic ß-cells: A potential beneficial effect in the pre-diabetic state? Int J Biochem Cell Biol. 2017;88:220–5.

15. Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. J Ethnopharmacol. 2018;210:296–310.

16. Chen N, Bezzina R, Hinch E, Lewandowski PA, Cameron-Smith D, Mathai ML, et al. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. Nutr Res. 2009;29(11):784–93.

17. Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. Mutat Res. 1999;436(1):69–97.

18. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 1997;2(4):152–9.

19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 65064, (-)-Epigallocatechin gallate . 2021. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epigallocatechin-gallate

20. Thangapazham RL, Passi N, Maheshwari RK. Expre-Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2007;6(12):1938–43.

21. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. Nucleic Acids Res. 2011;39(Database issue):D32-7.

22. Rodriguez JM, Rodriguez-Rivas J, Di Domenico T, Vázquez J, Valencia A, Tress ML. APPRIS 2017: principal isoforms for multiple gene sets. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D213–7.

23. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-jarreta J, et al. Ensembl 2020. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D682–8.

24. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D733-45.

25. Broxmeyer HE, Mor-Vaknin N, Kappes F, Legendre M, Saha AK, Ou X, et al. Concise review: role of DEK in stem/progenitor cell biology. Stem Cells. 2013;31(8):1447–53.

26. Privette Vinnedge LM, Kappes F, Nassar N, Wells SI. Stacking the DEK: from chromatin topology to cancer stem cells. Cell Cycle. 2013;12(1):51–66.

27. Boer J, Mahmoud H, Raimondi S, Grosveld G, Krance R. Loss of the DEK-CAN fusion transcript in a child with t(6;9) acute myeloid leukemia following chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation. Leukemia.

1997;11(2):299–300.

28. Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, Aihara T, Horiuchi S, et al. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. Cancer Res. 1999;59(19):4990–6.

29. Riveiro-Falkenbach E, Ruano Y, García-Martín RM, Lora D, Cifdaloz M, Acquadro F, et al. DEK oncogene is overexpressed during melanoma progression. Pigment Cell Melanoma Res. 2017;30(2):194–202.

30. Sun J, Bi F, Yang Y, Yuan Z, Jin A, Li J, et al. DEK protein overexpression predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncol Rep. 2017;37(2):857–64.

31. Ying G, Wu Y. DEK: A novel early screening and prognostic marker for breast cancer. Mol Med Rep. 2015;12(5):7491–5.

32. Ou Y, Xia R, Kong F, Zhang X, Yu S, Jiang L, et al. Overexpression of DEK is an indicator of poor prognosis in patients with gastric adenocarcinoma. Oncol Lett. 2016;11(3):1823–8.

33. Briknarová K, Takayama S, Homma S, Baker K, Cabezas E, Hoyt DW, et al. BAG4/SODD protein contains a short BAG domain. J Biol Chem. 2002;277(34):31172–8.

34. Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, Berner A, Gius D, Tchabo N, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(22 Pt 1):6585–92.

35. Reuland SN, Smith SM, Bemis LT, Goldstein NB, Almeida AR, Partyka KA, et al. MicroRNA-26a is strongly downregulated in melanoma and induces cell death through repression of silencer of death domains (SODD). J Invest Dermatol. 2013;133(5):1286–93.

36. Cisterne A, Baraz R, Khan NI, Welschinger R, Basnett J, Fung C, et al. Silencer of death domains controls cell death through tumour necrosis factor-receptor 1 and caspase-10 in acute lymphoblastic leukemia. PLoS One. 2014;9(7):e103383–e103383.

37. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends Pharmacol Sci. 2011;32(3):125–30.

38. Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. Nat Rev Cancer. 2009;9(6):429–39.

39. Liao S, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. Cancer Lett. 1995;96(2):239–43.

40. Tyagi T, Treas JN, Mahalingaiah PKS, Singh KP. Super/Expre/Meti(ind)-Potentiation of growth inhibition and epigenetic modulation by combination of green tea polyphenol and 5-aza-2'-deoxycytidine in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2015;149(3):655–68.

41. Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. Food Chem Toxicol.

2008;46(4):1271–8.

42. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols : a role in cancer prevention. Arch Biochem Biophys. 2010;501(1):65–72.

43. Sur S, Pal D, Roy R, Barua A, Roy A, Saha P, et al. Tea polyphenols EGCG and TF restrict tongue and liver carcinogenesis simultaneously induced by N-nitrosodiethylamine in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;300:34–46.

44. Hu F, Wei F, Wang Y, Wu B, Fang Y, Xiong B. EGCG synergizes the therapeutic effect of cisplatin and oxaliplatin through autophagic pathway in human colorectal cancer cells. J Pharmacol Sci. 2015;128(1):27–34.

45. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Lett. 2007 Jan 8;245(1–2):232–41.

46. Cerezo-Guisado MI, Zur R, Lorenzo MJ, Risco A, Martín-Serrano MA, Alvarez-Barrientos A, et al. Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. Food Chem Toxicol. 2015;84:125–32.

47. Mittal A, Pate MS, Wylie RC, Tollefsbol TO, Katiyar SK. Super-EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. Int J Oncol. 2004;24(3):703–10.

48. Singh T, Katiyar SK. Green tea polyphenol, (−)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in human skin cancer cells by targeting β-catenin signaling. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;273(2):418–24.

49. Ko H, So Y, Jeon H, Jeong MH, Choi HK, Ryu SH, et al. TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in Human A549 lung cancer cells. Cancer Lett. 2013;335(1):205–13.

50. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics . 2012;13:134. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

51. Nucleotide. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 1988; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/

52. Kumaki Y, Oda M, Okano M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. Nucleic Acids Res . 2008/05/16. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W170–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18487274

53. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–22.

54. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs.

Bioinformatics . 2002;18(11):1427–31. Available from: https://www.urogene.org/methprimer/

55. Dreos R, Ambrosini G, Groux R, Perier RC, Bucher P. The eukaryotic promoter database in its 30th year: Focus on non-vertebrate organisms. Nucleic Acids Res . 2017;45(D1):D51–5. Available from: https://epd.epfl.ch//index.php

56. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res . 2001 May 1;29(9):e45–e45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886

57. Tyagi T, Treas JN, Mahalingaiah PKS, Singh KP. Potentiation of growth inhibition and epigenetic modulation by combination of green tea polyphenol and 5-aza-2'-deoxycytidine in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2015 Feb;149(3):655–68.

58. Shin YS, Kang SU, Park JK, Kim YE, Kim YS, Baek SJ, et al. Anti-cancer effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in head and neck cancer through repression of transactivation and enhanced degradation of β-catenin. Phytomedicine. 2016;23(12):1344–55.

59. Cerezo-Guisado MI, Zur R, Lorenzo MJ, Risco A, Martín-Serrano MA, Alvarez-Barrientos A, et al. Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. 2015 Oct;84:125–32.

60. Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang Y Bin, Bai Y, Shen HF, et al. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2007;354(4):852–7.

61. Xie C, Li X, Geng S, Wu J, Zhong C, Li X, et al. Wnt/β-catenin pathway mediates (−)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells. Biochem Biophys Res Commun . 2017;482(1):15–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.038

62. Hsu YC, Liou YM. Super/Expre(ind)-The anti-cancer effects of (-)-Epigalocathine-3-gallate on the signaling pathways associated with membrane receptors in MCF-7 cells. J Cell Physiol. 2011;226(10):2721–30.

63. Hong OY, Noh EM, Jang HY, Lee YR, Lee BK, Jung SH, et al. Super-Epigallocatechin gallate inhibits the growth of MDA-MB-231 breast cancer cells via inactivation of the β-Catenin signaling pathway. Oncol Lett. 2017;14(1):441–6.

64. Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1973 Nov;51(5):1409–16.

65. Atcc.org. MCF7 ATCC® HTB-22™ . 2020. Available from: https://www.atcc.org/products/all/htb-22.aspx

66. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J Natl Cancer Inst. 1974 Sep;53(3):661–74.

67. Atcc.org. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) . 2020. Available from: https://www.atcc.org/products/all/htb-26.aspx

68. Stuart EC, Larsen L, Rosengren RJ. Super-Potential mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by 4-hydroxytamoxifen and epigallocatechin gallate in MDA-MB-231 cells. Int J Oncol. 2007;30(6):1407–12.

69. Farabegoli F, Papi A, Bartolini G, Ostan R, Orlandi M. Super-(-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifen resistant MCF-7 cell line. Phytomedicine . 2010;17(5):356–62. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2010.01.001

70. Farabegoli F, Barbi C, Lambertini E, Piva R. Super-(-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates estrogen receptor alpha function in MCF-7 breast carcinoma cells. Cancer Detect Prev. 2007;31(6):499–504.

71. Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, et al. Super-Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. J Cell Biochem. 2001;82(3):387–98.

72. Jin X, Liu M, Chen Z, Mao R, Xiao Q, Gao H, et al. Separation and purification of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from green tea using combined macroporous resin and polyamide column chromatography. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci . 2015;1002:113–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.055

73. Pianetti S, Guo S, Kavanagh KT, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. Cancer Res. 2002;62(3):652–5.

74. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R. Super/Expre/Meti-INT-Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. J Breast Cancer. 2013;16(1):23–31.

75. Khodadoust MS, Verhaegen M, Kappes F, Riveiro-Falkenbach E, Cigudosa JC, Kim DSL, et al. Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene. Cancer Res. 2009;69(16):6405–13.

76. Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, Berner A, Gius D, Tchabo N, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(22 Pt 1):6585–92.

77. Bigelow RLH, Cardelli JA. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. Oncogene. 2006;25(13):1922–30.

78. Rahnasto-Rilla M, Tyni J, Huovinen M, Jarho E, Kulikowicz T, Ravichandran S, et al. Natural polyphenols as sirtuin 6 modulators. Sci Rep. 2018 Mar;8(1):4163.

79. Gianfredi V, Nucci D, Vannini S, Villarini M, Moretti M. In vitro Biological Effects of Sulforaphane (SFN), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and Curcumin on Breast Cancer Cells: A Systematic Review of the Literature. Nutr Cancer . 2017;69(7):969–78. Available from: https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1359322

80. Qiao M, Li C, Zhang A, Hou L, Yang J, Hu H. Regulation of DEK expression by AP-

2 α and methylation level of DEK promoter in hepatocellular carcinoma. 2016;6(21):2382–90.

81. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. Nat Rev Genet. 2016 Aug;17(9):551–65.