



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: ASHOUR FERNÁNDEZ, NADIA
D.N.I./PASAPORTE: ****6210Z

PROGRAMA DE DOCTORADO: D425-SEÑALIZACIÓN CELULAR
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA DE SISTEMAS
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 05/10/2017, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de SANTIAGO ROPERO SALINAS.

Sobre el siguiente tema: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS GENES METILADOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares 5 de OCTUBRE 2017

EL PRESIDENTE

Signature of President and name: JAVIER MUGULO

EL SECRETARIO

Signature of Secretary and name: ANTONIO CHILCECHES

EL VOCAL

Signature of Vocal and name: Fco. Javier Rodriguez

Con fecha 31 de Octubre de 2017, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

Signature of the Secretary of the Delegated Commission

FIRMA DEL ALUMNO,

Signature of the student

Fdo.: NADIA ASHOUR FERNÁNDEZ

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 31 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *ASHOUR FERNÁNDEZ, NADIA*, el día 5 de octubre de 2017, titulada *IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS GENES METILADOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA*, para determinar si a la misma se le concede la mención “cum laude”, arrojando como resultado, 2 votos a favor y 1 en contra.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve no otorgar la Mención de “cum laude”** a dicha Tesis.

Alcalá de Henares, 2 de noviembre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: *ASHOUR FERNÁNDEZ, NADIA*

Secretario del Tribunal: *ANTONIO CHILOECHES GÁLVEZ.*

Director de Tesis: *SANTIAGO ROPERO SALINAS*



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Señalización Celular

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL DE NUEVOS GENES
METILADOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA**

Tesis Doctoral presentada por

NADIA ASHOUR FERNÁNDEZ

Director:

Dr. Santiago Roper Salinas

Alcalá de Henares, 2017

Santiago Roperó Salinas, Profesor Titular del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado: "*Identificación y caracterización funcional de nuevos genes metilados en cáncer de próstata*", ha sido realizado por **D^a Nadia Ashour Fernández**, en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, bajo mi dirección, dentro del programa de Doctorado en Señalización Celular de este Departamento, y, a su juicio, cumple todos los requisitos para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 12 de junio de 2017

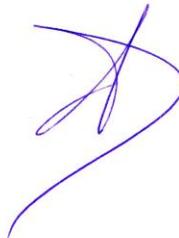


Alberto Domingo Galán, Coordinador del programa de Doctorado en Señalización Celular de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado: "*Identificación y caracterización funcional de nuevos genes metilados en cáncer de próstata*", ha sido realizado por **D^a Nadia Ashour Fernández**, bajo la dirección del doctor D. Santiago Roper Salinas, dentro del programa de Doctorado en Señalización Celular del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, y, a su juicio, cumple todos los requisitos para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 12 de junio de 2017



AGRADECIMIENTOS

Durante este tiempo han sido muchas las personas que se han cruzado en mi vida, tanto en lo profesional como en lo personal y sin su apoyo no hubiese logrado llegar hasta aquí. A todos vosotros os doy las gracias.

Debo un especial reconocimiento a la Universidad de Alcalá por la confianza que demostró en mí al concederme la beca FPI.

Quiero dar las gracias a mi director de tesis el Dr. Santiago Roperro por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por sus sugerencias e ideas, consejos y paciencia. Muchas gracias Santiago.

Al Dr. Javier Angulo sin cuya colaboración parte de esta tesis no se hubiera podido llevar a cabo. A la Dra. M Val Toledo por su aporte y participación en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Al Dr. Till Bartke, por haberme acogido en su grupo de investigación en el MRC Clinical Scences Centre (Londres) durante tres meses.

A todo el profesorado del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, en especial a los Dres. Antonio Chilioeches, Begoña Colás, Pilar López Ruíz, María José Toro y Antonio Jiménez.

A Pilar y Olga de la Unidad de Biología Molecular. Muchas gracias Pilar por la paciencia que tuviste con las cuantitativas y conmigo. A Luis y Miguel, a Isabel, Cristina y todos los que han pasado por cultivos por vuestra ayuda. A Angélica, por tu apoyo, consejos y por facilitarnos a todos el papeleo.

A Pablo, Irene, y David, por todo lo que aprendí de vosotros, por animarme, por apoyarme, por vuestros consejos, por los buenísimos momentos que hemos vivido dentro y fuera del laboratorio, por vuestra amistad. Muchas gracias.

A mis tres Irenes y a Carlos Mario por estar en los buenos y en los malos momentos. A Irene Gañán por creer en mí. A Irene Mazo por ser mi psiquiatra particular no colegiada. A Irene Cuesta por ser mí loca preferida. A Carlos Mario por comprenderme. Muchas gracias.

A Ceci, Lili, Eva, Lisandro y Elenita porque disfruto de todos los momentos que pasamos juntos. Soy muy afortunada por haberos conocido.

A Leidy por nuestras conversaciones y los buenos momentos que hemos compartido. A Toño por su alegría y por ser mi guardaespaldas. A Ágata y Héctor por los buenos momentos que hemos pasado juntos. A las pasilleras por dar alegría al pasillo y especialmente a "la Pasi", tranquila que no estás en mi lista negra.

A todos los compañeros que han pasado por el departamento estos años porque de todos he aprendido algo (Ana, Raúl, Cris, Elia, Miguel, Cristina, Arancha, Julia, Claire, Juan, Eva Rico, Ylenia, Anusca, Laura, Patri, Eva Vacas, Borja, Kilian, Mercedes, Susi,

Agradecimientos

Carlos). A todos los pollitos, Chus, Yelina, Ashley, María, Bea, Paula y especialmente a Adri, te mereces que todo te vaya muy bien. A Volmir, mi italiano favorito y no lo digo solo porque seas el único que conozco.

A mis amigos, en especial a Marta, Blanca y Carol por todas esas tardes de terapia. Muchas gracias.

A mi familia, mis abuelos, Julián y Sofía; mis tías, Pacita y Charo; mi tío Víctor y mi prima Sofía, por todo lo que han hecho por mí y por su apoyo. Muchas gracias. Por último quiero darle las gracias y dedicarle esta tesis a mi madre, porque sin su ayuda nunca hubiera llegado hasta aquí, por su incondicional apoyo, por su comprensión, por estar ahí en los buenos y sobre todo en los malos momentos, por creer siempre en mí. Muchas gracias. Te quiero.

A mis amigos,
a mi familia,
a mi madre

“Somos arquitectos de nuestro propio destino”

Albert Einstein

RESUMEN

En la actualidad, uno de los grandes retos de la ciencia es determinar las alteraciones moleculares responsables del desarrollo del cáncer en general y del de próstata en particular. El conocimiento de estas alteraciones posibilita por un lado el desarrollo de terapias cada vez más específicas y personalizadas; y, por otro lado, el uso de estas alteraciones como biomarcadores en el manejo clínico de los pacientes con cáncer de próstata (CP). Son diversos los factores de riesgo que pueden favorecer la aparición del CP. Entre ellos encontramos la edad avanzada, la raza, la localización geográfica, la alimentación o los antecedentes familiares. En este sentido, el estudio de cambios epigenéticos asociados al desarrollo del CP resulta especialmente interesante ya que es bien conocido que con la edad se produce una acumulación de cambios en las modificaciones epigenéticas. Además, existen un gran número de trabajos que indican que la exposición a determinados factores ambientales también provoca cambios en las modificaciones epigenéticas. La principal modificación epigenética y la más estudiada en humanos es la metilación del DNA. Los estudios realizados en las últimas décadas indican que alteraciones en esta modificación juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer en general y del de próstata en particular. Por ello, en este trabajo nos hemos centrado en el papel que desempeña la metilación del DNA en el desarrollo del CP y en la búsqueda de nuevos marcadores para el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad.

En concreto, en la presente Tesis Doctoral hemos definido el perfil de metilación en CP y hemos identificado por primera vez que los genes *GSTM2* y *PENK* están frecuentemente metilados en los tumores de próstata. Pero quizás el dato más interesante para nuestro estudio es que la metilación conjunta de *GSTM2* y *PENK* se produce en un alto porcentaje de los tumores analizados, por lo que se podría utilizar como un nuevo biomarcador para el diagnóstico de CP. También hemos demostrado que la metilación de estos dos genes provoca su pérdida de expresión, lo que dada su función, aporta nuevos datos sobre la etiología de esta enfermedad. Además, hemos seleccionado los genes *CFTR* y *HTR1B* como biomarcadores prometedores para distinguir entre CP agresivos e indolentes ya que su frecuencia de hipermetilación es mayor en los pacientes con elevado índice de Gleason y con altos niveles de Ki-67 y que por tanto presentan un peor pronóstico de la enfermedad. Además, en los pacientes que tenían estos dos genes metilados tanto la supervivencia global como el tiempo libre de progresión clínica fueron menores.

Por otro lado, hemos identificado a *Gfi1* como un gen frecuentemente metilado en CP y mama y hemos demostrado por primera vez que *Gfi1* se comporta como un gen supresor de tumores en estos dos tejidos ya que su reexpresión en las líneas en las que está silenciado por metilación provoca una disminución de la viabilidad y proliferación celular, en la formación de colonias e inhibe el crecimiento de tumores inducidos en ratones desnudos. Además, *Gfi1* podría estar ejerciendo este efecto mediante el

control de la expresión de genes con importantes funciones en el desarrollo tumoral como son AAT, ACT y Neurog3.

ABREVIATURAS

5caC: 5-carboxicitosina

5fC: 5-formilcitosina y

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

AAT: α 1-antitripsina

ACT: α 1-antiquimotripsina

AEM: Agencia Europea del Medicamento

AML: Leucemia Mieloide Aguda

AR: receptor de Andrógenos

As: Arsénico

BPH: Hiperplasia Benigna de Próstata

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CLL: Leucemia Linfocítica Crónica

CML: Leucemia Mieloide Crónica

CMML: Leucemia Mielomonocítica Crónica

CP: Cáncer de Próstata

CTCL: Linfoma Cutáneo de Células T

DNMT: DNA metiltransferasa

DRE: Examen Rectal Digital

EZH2: *Enhancer of Zeste homolog 2*

FDA: *Food and Drug Administration*

GAPDH: Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa

Gfi1: *Growth factor Independence 1*

GSTM2: Glutathion S-transferasa de clase mu

GSTP1: Glutathion S-transferasa pi 1

H3K27me3: Lisina 27 de la histona H3 trimetilada

H3K4me2: Lisina 4 de la histona H3 dimetilada

H3K4me3: Lisina 4 de la histona H3 trimetilada

H3S10: Fosforilación de la Serina 10 de la histona H3

HAT: Histona acetiltransferasa

HDAC: Histona desacetilasa

HDACi: Inhibidor de las HDACs

HDM: Histona desmetilasas

hESC: Células Troncales Embrionarias humanas

HGPIN: Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado

HMT: Histona metiltransferasas

HP1: Proteína de la heterocromatina 1

HTR1B: *5-hydroxytryptamine receptor 1B*

IAP: *Intracisternal A Particle*

IVD: Linfocitos Normales Metilados *in vitro*

K16H4ac: Lisina 16 de la histona H4 acetilada

LINE-1: *Long Interspersed Nuclear Element type 1*

LOI: Pérdida del Imprintado Genómico

MBD: Proteína de Unión a DNA Metilado

MGMT: O⁶ Metilguanina DNA metiltransferasa

miRNA: microRNA

MSP: PCR Específica de Metilación

Neurog3: Neurogenina 3

NL: Linfocitos Normales

NSCLC: Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas

PENK: Proencefalina

PIA: Atrofia Inflamatoria Prostática

PIN: Neoplasia Intraepitelial Prostática

PSA: Antígeno Prostático Específico

Rb: Retinoblastoma

RISC: Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

SCLC: Carcinoma de Células Pequeñas de Pulmón

SNC: Neutropenia Congénita Grave

TDG: Timidina Glicosilasa de DNA

TET: *Ten-eleven translocation*

TLPC: Tiempo Libre de Progresión Clínica

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Próstata	1
1.1. Función y anatomía	1
1.2. Cáncer de próstata	1
1.3. Epidemiología del cáncer de próstata.....	3
2. Epigenética	4
2.1. Metilación del DNA	5
2.2. Desmetilación del DNA.....	12
2.3. Modificaciones postraduccionales de las histonas	13
2.4. miRNA.....	16
2.5. Interrelación entre metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas	16
3. Epigenética y cáncer	18
3.1. Metilación del DNA en cáncer.....	18
3.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas en cáncer.....	24
3.3. miRNAs en cáncer	25
3.4. La epigenética como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer	26
4. Epigenética y cáncer de próstata	27
4.1. Hipermetilación del DNA en cáncer de próstata.....	27
4.2. Hipometilación en cáncer de próstata	29
4.3. Modificaciones postraduccionales de las histonas en cáncer de próstata	30
4.4. Terapia epigenética en el cáncer de próstata	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Líneas celulares y muestras humanas	39
1.1. Líneas celulares humanas de cáncer	39
2.2. Muestras humanas.....	40

2. Extracción de DNA de líneas celulares.....	41
3. Extracción de DNA de tejidos.....	41
4. Análisis de metilación del DNA	41
4.1. Modificación del DNA con bisulfito sódico	41
4.2. PCR específica de metilación (MSP)	42
4.3. Secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito sódico	44
4.4. Sequenom EpiTyper	46
4.5. Array de metilación	46
5. Análisis de expresión génica	48
5.1. Extracción de RNA	48
5.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y qRT-PCR	48
6. Análisis de la expresión proteica.....	50
6.1. Obtención de extractos proteicos	50
6.2. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i>	50
7. Ensayos funcionales in vitro	51
7.1. Transfección con vector de expresión	51
7.2. Ensayos de viabilidad celular.....	53
7.3. Ensayos de formación de colonias	53
7.4. Ensayos de Migración en cámaras <i>transwells</i>	53
7.5. Ensayos de Invasión	54
7.6. Ensayo de incorporación de [³ H]-timidina	54
8. Determinación del crecimiento tumoral in vivo	55
9. Inmunohistoquímica	55
10. Análisis bioestadístico	56
RESULTADOS.....	59
1. Análisis del perfil de metilación en pacientes con cáncer de próstata	61

2. Identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata	65
2.1. Validación de los datos de metilación de GSTM2 y PENK.....	66
2.2. Correlación entre el estado de metilación y los niveles de expresión de PENK Y GSTM2 en líneas celulares de cáncer de próstata.....	68
2.3. Asociación entre el perfil de metilación del DNA y el pronóstico del cáncer de próstata	74
3. Papel de la metilación de Gfi1 en cáncer.....	78
3.1. Identificación de Gfi1 como un nuevo gen hipermetilado en cáncer de próstata	78
3.2. Silenciamiento de Gfi1 por hipermetilación de su región promotora en líneas celulares de cáncer próstata	80
3.3. Silenciamiento epigenético de Gfi1 en cáncer de mama	82
3.4. Estudio de la relevancia funcional de la pérdida de expresión de Gfi1 en cáncer de próstata y mama	86
3.5. Relación entre la hipermetilación de Gfi1 y el pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata	95
DISCUSIÓN	99
1. Perfil de metilación en cáncer de próstata	101
2. Identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata	103
3. Relevancia funcional de la pérdida de expresión de Gfi1 por metilación.....	106
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXO.....	¡Error! Marcador no definido.
PUBLICACIONES	143

INTRODUCCIÓN

1. Próstata

1.1. Función y anatomía

La próstata es una glándula del aparato genitourinario masculino con forma de castaña, ubicada delante del recto, debajo y a la salida de la vejiga urinaria que interviene en la producción del líquido seminal que protege y nutre a los espermatozoides.

El modelo anatómico de la próstata más aceptado es el propuesto por McNeal en 1968 (1) en el que se distinguen tres zonas glandulares y una zona no glandular o estroma fibromuscular anterior:

- **Zona periférica:** forma la parte posterior, lateral y apical de la glándula prostática, llegando por la parte anterior hasta fusionarse con el estroma fibromuscular anterior. Constituye el 70% del tejido glandular prostático y es la zona en la que se generan el mayor número de los adenocarcinomas de próstata.
- **Zona Central:** forma la base de la glándula prostática y constituye aproximadamente el 25% del tejido glandular de la próstata.
- **Zona periuretral de transición:** constituye aproximadamente el 5% del tejido glandular prostático. La proliferación de las células que la componen es la responsable de la hiperplasia prostática benigna (BPH) y en ella se producen el 20% de los tumores de próstata.
- **Estroma fibromuscular:** constituye aproximadamente el 33% del volumen total de la próstata. Es la zona no glandular que constituye la superficie anterior de la próstata.

Estas zonas tienen un origen embrionario diferente y pueden ser distinguidas por su histología, sus marcas anatómicas más relevantes, sus funciones biológicas y su susceptibilidad para sufrir trastornos patológicos (2).

1.2. Cáncer de próstata

La mayoría de los cánceres de próstata (CP) tienen su origen en la zona periférica, conservan alguna estructura glandular y son clasificados como adenocarcinomas, constituyendo el 70% de las neoplasias malignas encontradas en la próstata (2, 3). En 1999 De Mazo y col. propusieron que la lesión denominada atrofia inflamatoria prostática (PIA) era un precursor de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y del CP (4). El PIN es el primer precursor del CP detectado histológicamente, caracterizado por un engrosamiento de la capa epitelial y una pérdida de diferentes capas basales y

secretoras, aunque las células alteradas no invaden otras partes de la próstata como si lo harían las células cancerosas. A día de hoy, es aceptado que la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIIN) es una lesión precursora del carcinoma prostático (5) (**Figura 1**).

Una característica del CP es su íntima relación con el envejecimiento. Aunque las lesiones preneoplásicas puedan aparecer en varones de edades comprendidas entre los 20 y 50 años, la mayoría de los tumores de próstata no suelen manifestarse hasta edades más avanzadas (entre los 60 o 70 años) (6). La naturaleza heterogénea y multifocal del CP dificulta a los investigadores el estudio de las alteraciones moleculares responsables de su desarrollo. El índice de Gleason es el método más usado por los patólogos en la clasificación del CP. Se basa en el grado de diferenciación de la arquitectura glandular existente entre el tejido normal y el del CP (7, 8).

En estadios iniciales, cuando el carcinoma está confinado en la glándula prostática, es potencialmente curable por intervención quirúrgica y/o radioterapia. Sin embargo, si no es detectado de manera temprana, el carcinoma puede avanzar a estadios caracterizados por una invasión local, seguido por metástasis ósea, que conducen generalmente a la muerte del paciente (7).

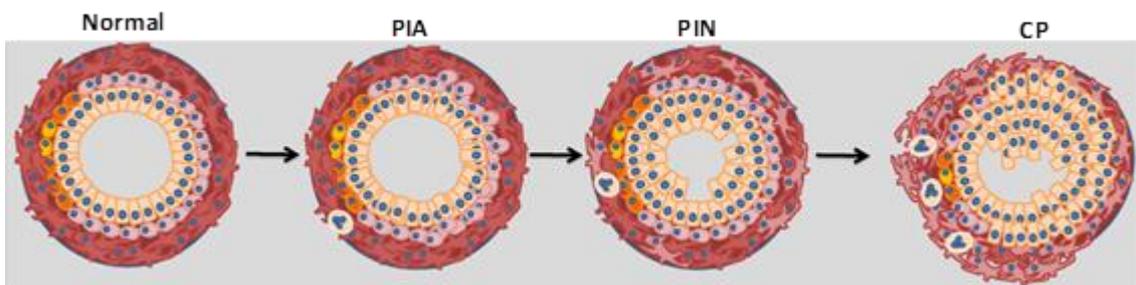


Figura 1. Representación esquemática de la progresión del cáncer de próstata. Transformación del epitelio normal a PIA, PIN y CP (Adaptado de (9)).

Los andrógenos son esenciales en el normal crecimiento, desarrollo y función de la próstata. La mayoría de los CP dependen inicialmente de los andrógenos (andrógeno-dependientes), por lo que la deprivación o ablación androgénica (*Androgen deprivation therapy*, ADT) es el principal tratamiento paliativo en el caso de tumores de próstata recurrentes, localmente avanzados y metastásicos (10). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos la respuesta inicial positiva es seguida de una progresión del cáncer hacia un estado resistente a estos tratamientos y mucho más agresivo, a través del crecimiento selectivo de células andrógeno-independientes que coexisten dentro de la población de células andrógeno-dependientes previa a la terapia de deprivación androgénica (11).

1.3. Epidemiología del cáncer de próstata

El CP ocupa el segundo lugar en cuanto a incidencia y es la quinta causa más común de muerte por cáncer entre los hombres a nivel mundial. En el año 2012 se registraron 1,1 millones de nuevos casos y se produjeron 300 000 muertes por este tipo de tumor en todo el mundo (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>).

Es el cáncer no cutáneo más común en los países occidentales, donde 1 de cada seis hombres serán diagnosticados con CP en el transcurso de su vida (12). Sin embargo, para muchos hombres que desarrollan la enfermedad el impacto en la supervivencia es menor, especialmente en aquellos que sufren tumores de bien a moderadamente diferenciados, dada la progresión lenta natural de la enfermedad (13). Los porcentajes de fallecimiento han disminuido significativamente desde mediados de 1990 (14), debido probablemente al resultado de las mejoras en el diagnóstico temprano y tratamiento de la enfermedad.

La incidencia y mortalidad del CP varía entre las diferentes regiones del mundo. Mientras que en los Estados Unidos (EEUU) y Europa del Norte la incidencia es elevada, ésta disminuye en el sudeste de Asia (15, 16). Es especialmente agresivo en la población Afroamericana quienes lo pueden desarrollar a edades muy tempranas (14).

En Europa en 2012 hubo 3,4 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados, ocupando el CP el cuarto lugar por incidencia con 417 000 casos (12,1%), por detrás del cáncer de mama, pulmón y colorrectal (17). Su incidencia es mayor en la Europa septentrional y occidental (>200 por cada 100.000 hombres), mientras que las tasas en la Europa oriental y meridional han mostrado un aumento continuo (18).

En España la tendencia es la misma que en Europa, siendo el CP el más frecuente, por detrás del cáncer de pulmón y con una tasa de mortalidad del 15,2%, (17).

Por tanto, el CP es un importante problema de salud que afecta especialmente a los países desarrollados y que provoca grandes costes, tanto personales como económicos. Un buen conocimiento de los factores de riesgo en la carcinogénesis prostática permite la detección temprana de la enfermedad y el desarrollo de terapias dirigidas. Durante mucho tiempo se han establecido como principales factores de riesgo de la enfermedad la edad avanzada, el estilo de vida, el origen étnico y la predisposición genética. Pero a día de hoy, sabemos que además de los factores citados anteriormente, las modificaciones epigenéticas pueden ser actores determinantes en la aparición y progresión del CP.

2. Epigenética

La teoría de la epigénesis (del griego epi: sobre; génesis: generación, origen, creación) postula que el embrión se desarrolla a partir de un cigoto que no se ha diferenciado. Aunque parece que los orígenes de la epigenética se remontan a pocas décadas atrás, debido al creciente número de publicaciones existentes en la literatura y al gran interés que suscitan estas investigaciones en la actualidad, nada más lejos de la realidad ya que fue Aristóteles el primer autor conocido que definió la epigénesis como “el mecanismo mediante el cual los organismos surgen a partir de un material amorfo y gradualmente se van desarrollando con el tiempo”. Esta teoría se oponía a la teoría de la “preformación” según la cual los órganos se encontraban presentes en forma de miniatura dentro de alguno o de los dos gametos.

William Harvey, seguidor de las teorías de Aristóteles, definió la epigénesis en su obra “*Exercitationes de generatione animalium*,” 1651, como “el proceso a través del cual el huevo es una nueva formación y el embrión se desarrolla de la homogeneidad del primordio a la heterogeneidad del adulto a través del florecimiento y la subdivisión”. Sin embargo, fue C.H. Waddington quien introdujo el término epigenética y la definió como “la rama de la biología que estudia las interacciones entre los genes y sus productos que dan al fenotipo” (19), sentando las bases para un mejor estudio de este campo.

Han sido muchos los avances logrados desde entonces y de ahí la necesidad de redefinir el concepto de la epigenética como el estudio de los cambios en la función génica que son mitótica y/o meióticamente heredables y que no implican cambios en la secuencia de DNA (20). En el año 2003, el DNA fue completamente secuenciado y publicado en el Proyecto del Genoma Humano propiciando un gran avance en el desarrollo de tecnología para el estudio de la información genética y epigenética a gran escala. Gracias a estos estudios, sabemos que no todo el DNA se expresa, que los genes no siempre se expresan, que no todos los RNAs son traducidos a proteínas, y también nos ha permitido identificar un gran número de secuencias reguladoras y la función de regiones intergénicas cuyo papel no ha sido determinado hasta los últimos años. La epigenética nos ayuda a entender este mecanismo complejo de regulación de la expresión génica. En 2007 A. Bird intenta unificar el concepto de epigenética definiéndolo como el conjunto de marcas y mecanismos que registran, señalizan y perpetúan los estados de actividad funcional de los cromosomas (21). La epigenética puede ser entendida entonces como los mecanismos que inician y mantienen los patrones de expresión y función del material genético de manera heredable sin cambios en la secuencia del genoma. A pesar de ser heredables, son potencialmente reversibles y pueden ser influenciados por factores ambientales. Por ejemplo, la exposición de ratones Agutí a Bisfenol A está asociada a la aparición de pelaje amarillo y a un aumento de la obesidad a través de la hipometilación de secuencias específicas,

como el retrotrasposón IAP (*Intracisternal A Particle*) situado aguas arriba del gen Agutí, poniendo de manifiesto que la exposición a determinados agentes puede alterar las modificaciones epigenéticas produciendo cambios en el fenotipo (22). Además, los cambios epigenéticos están asociados a procesos de envejecimiento (23, 24, 25).

Por tanto, la epigenética aporta la mejor explicación de cómo un mismo genotipo puede dar lugar a diferentes fenotipos. Un ejemplo de ello son las diferencias en los patrones de metilación observadas en gemelos monozigóticos. Estas diferencias aumentan con la edad de los individuos correlacionándose con diferencias fenotípicas e incluso con la diferente susceptibilidad a padecer una enfermedad (26, 27). Por tanto, los mecanismos epigenéticos son esenciales en la regulación de la expresión génica y en el mantenimiento de la integridad genómica en las células normales, por lo que es lógico pensar que las alteraciones en la función normal de la maquinaria epigenética están involucradas en el desarrollo y progreso de diferentes enfermedades entre las que se encuentra el cáncer. De ahí, que el estudio de las modificaciones epigenéticas y de sus alteraciones en los procesos patológicos sean de vital importancia en el desarrollo de nuevas terapias que tengan como diana este tipo de modificaciones.

Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas, los complejos remodeladores de la cromatina y los RNAs no codificantes, siendo las dos primeras las más ampliamente caracterizadas.

2.1. Metilación del DNA

A pesar de que en la década de los 40 ya se había detectado la presencia de la 5-metilcitosina (5mC) en el DNA del timo de ternero (28), no fue hasta 1975 cuando dos estudios demostraron el importante papel que desempeña esta modificación epigenética en la regulación de la expresión génica y, por tanto, en la biología de los organismos eucariotas (29, 30).

A día de hoy, la metilación del DNA es probablemente la modificación epigenética más ampliamente estudiada y mejor conocida (23). En mamíferos esta modificación epigenética tiene lugar casi exclusivamente en las citosinas que forman parte del dinucleótido CpG (5'CG 3') (31), y consiste en la adición covalente de un grupo metilo, procedente de la S-adenosilmetionina (SAM), al carbono 5 (C⁵) del anillo pirimidínico de la citosina. Esta modificación postranscripcional no interfiere con el apareamiento de bases propuesto por Watson y Crick. En organismos procariotas, la metilación se produce sobre residuos de adeninas y citosinas y su función es proteger a la célula del material genético foráneo, como es el caso de genomas víricos y bacterianos (32). En eucariotas, la metilación de citosinas fuera del contexto CpG (CpH; H=A, T, C) es frecuente en plantas y hongos, y recientemente se ha descrito en mamíferos, pero su función sigue siendo desconocida. Se ha observado la presencia de la 5mCpA en

células troncales embrionarias humanas (hESC) indiferenciadas, que van desapareciendo tras el proceso de diferenciación celular (33). Además, diferentes estudios muestran que la metilación de residuos no CpG no solo está restringida a células pluripotentes, si no que existe una elevada metilación de residuos no CpG en células neuronales durante el desarrollo cerebral y después de la neurogénesis (34).

En mamíferos, aproximadamente el 70-80% de las citosinas que forman parte del dinucleótido CpG están metiladas (35). La frecuencia del dinucleótido CpG en el genoma es más baja de lo esperado debido a la desaminación espontánea de la 5mC a timidina, lo que ha conducido a una pérdida de este dinucleótido a lo largo de la evolución (36). Sin embargo, existen regiones con una elevada concentración de los dinucleótidos CpG denominadas islas CpG (37) las cuales tienen un tamaño aproximado de 1 kb y se encuentran en aproximadamente el 70% de los promotores de los genes conocidos. En vertebrados, la mayoría de las islas CpG de estos promotores no están metiladas permitiendo la expresión de los genes a los que regulan (38) (**Figura 2**). Entre los genes que contienen islas CpG en sus regiones promotoras encontramos los de expresión constitutiva y algunos genes específicos de tejido (39). Esta distribución refuerza la importancia que tienen estas islas en la regulación de la expresión génica. Por tanto, de acuerdo a la distribución de las CpGs en los promotores podemos decir que existen dos tipos de genes, los que contienen islas CpG, principalmente los genes de expresión constitutiva y genes sin islas CpG, con una expresión más débil y restringida (40). Los promotores no metilados, pueden ser transcripcionalmente activos o inactivos, dependiendo de otros factores entre los que se incluyen las modificaciones postraduccionales de las histonas y la actividad de factores de transcripción específicos del tipo celular (41).

Por otro lado, como parte de la programación epigenética durante el desarrollo, la metilación del DNA es un mecanismo imprescindible para inhibir la expresión de manera estable y a largo plazo de determinados genes: en la impronta génica se requiere la metilación del promotor de uno de los dos alelos para establecer una expresión monoalélica (42), los genes que se localizan en el cromosoma X inactivado en mujeres también están metilados (43, 44), así como algunos genes específicos de tejido (45). Por tanto, esta modificación del DNA juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y en la determinación del fenotipo de los individuos, pero también en otras funciones del DNA como los procesos de reparación, recombinación y en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

El genoma de los mamíferos es complejo y está compuesto no solo de secuencias codificadoras, sino que también contiene otras que no codifican para proteínas como transposones y otros elementos endoparásitos que se han adquirido a lo largo de la evolución. Estos elementos deben y son silenciados por metilación del DNA, ayudando

de este modo a preservar la integridad y la estabilidad genómica (46).

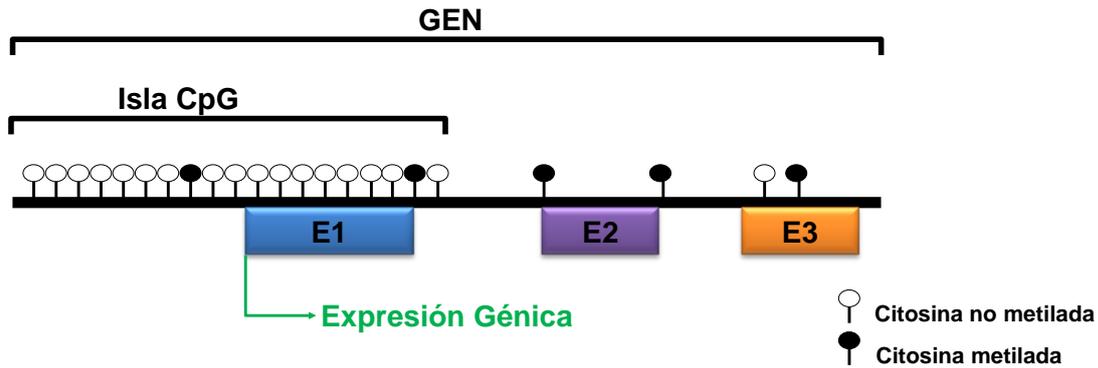


Figura 2. Representación esquemática de una isla CpG no metilada en la región promotora de un gen en una célula normal. La línea verde indica el inicio de transcripción y las cajas E1-E3 representan los exones.

En el pasado, la mayoría de los trabajos en torno a la metilación del DNA se han centrado en el estudio de la función que desempeña esta modificación en las islas CpG asociadas a los promotores génicos que hemos descrito. Sin embargo, los estudios realizados en la última década han puesto de manifiesto el papel que desempeña esta modificación epigenética en el resto del genoma, como por ejemplo en el cuerpo de los genes, en las secuencias amplificadoras y en los promotores sin islas CpG, entre otros (47). En concreto, es cada vez más evidente que la metilación del DNA en el cuerpo de los genes no es un mero testigo pasivo en la regulación de la expresión, si no que parece estar implicada activamente en este proceso (48). Las técnicas de alcance genómico han permitido determinar que la metilación del DNA en el cuerpo de los genes se correlaciona positivamente con la expresión génica (49).

En leucemia linfocítica crónica (CLL), el estado de metilación de las CpGs de regiones intragénicas de alrededor de 900 genes estudiados muestran una correlación significativa con la expresión del gen en el que se encuentran localizadas en ausencia de cambios en la metilación de las regiones promotoras (50). Las regiones intragénicas de los genes del cromosoma X activo, y que por tanto se expresan, están metiladas, mientras que los promotores no lo están (51). La metilación en el cuerpo de los genes está asociada con un mejor posicionamiento nucleosomal que, en este caso, favorece la elongación durante la expresión (52). Además, se ha comprobado que las DNA metiltransferasas (DNMTs) se encuentran fuertemente ancladas a los nucleosomas (53), lo que demuestra la asociación entre el posicionamiento nucleosomal y la metilación del DNA.

2.1.1. DNA metiltransferasas

La metilación del DNA es un proceso dinámico, y por tanto su función está íntimamente ligada a los procesos que la establecen y la mantienen. La adición del

grupo metilo en la posición 5' de la citosina está catalizada por las DNMTs que, como describimos anteriormente, utilizan la SAM como donante de grupos metilo (**Figura 3**).

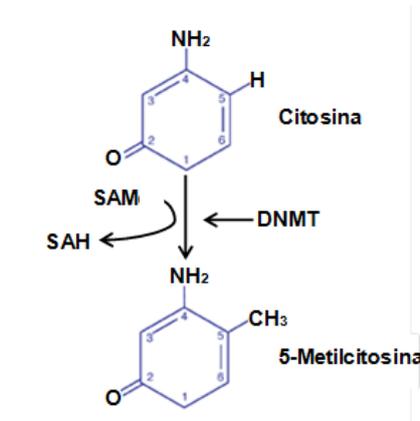


Figura 3. Reacción de metilación del DNA. SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, DNMT: DNA metiltransferasa

En mamíferos se han descrito cinco DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L.

La DNMT1 tiene mayor afinidad por el DNA hemimetilado y es, por tanto, la principal responsable del mantenimiento de los patrones de metilación tras la división celular. En las fases G1 y G2 del ciclo celular muestra una localización nuclear difusa, siendo en la fase S del ciclo cuando se asocia a los focos de replicación del DNA metilando la nueva cadena de DNA sintetizada (54, 55) (**Figura 4**).

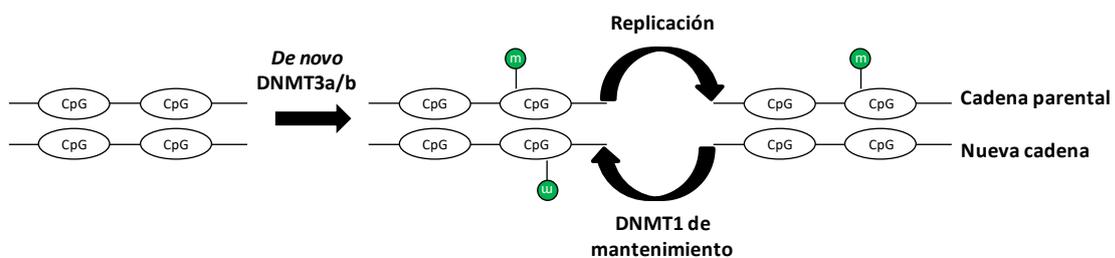


Figura 4. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación. La metilación de *de novo* del DNA en células troncales embrionarias y en cáncer está catalizada principalmente por la DNMT3A y la DNMT3B. Después de cada ronda de replicación, la DNMT1 restablece el patrón de metilación de la cadena parental en la nueva cadena sintetizada (Adaptado de (56)).

Las DNMT3A y 3B presentan la misma afinidad por el DNA hemimetilado y sin metilar y son las principales responsables de la metilación de *de novo* (57) (**Figura 4**). Por tanto, juegan un papel fundamental en el establecimiento de los patrones de metilación del DNA durante el desarrollo embrionario. De hecho, sus niveles de expresión son más elevados durante esta fase, produciéndose una disminución en la mayoría de los tejidos adultos.

Aunque durante mucho tiempo se ha aceptado esta estricta separación de funciones, existen un gran número de evidencias que indican que las DNMTs *de novo* juegan también un papel muy importante en el mantenimiento de los patrones de metilación. La pérdida de expresión conjunta de la DNMT1 y 3B en células de cáncer de colon induce una mayor pérdida de metilación de DNA que la pérdida de expresión de la DNMT1 o 3B (58). Los niveles de metilación encontrados en las células somáticas de adenocarcinomas en las que se inactivó la DNMT1 mediante ensayos *Knockout* se mantuvieron en torno al 80%, dato que indica que las DNMT3s pueden ser capaces de actuar como enzimas de mantenimiento en determinadas situaciones, compensando así la pérdida de DNMT1 (59). Estudios con *Knockout* en células troncales embrionarias de ratón han demostrado que es necesaria la cooperación de las DNMT3s y DNMT1 en el mantenimiento de las regiones de heterocromatina (60).

La DNMT3L carece de actividad catalítica, pero es necesaria para la metilación *de novo* ya que interacciona con las DNMT3s y las recluta a las regiones que han de ser metiladas (61, 62). Para ello, la DNMT3L reconoce los nucleosomas que tienen la lisina 4 de la histona H3 sin metilar, una marca de histonas que como veremos más adelante es característica de promotores transcripcionalmente activos. Esta DNMT es necesaria en el proceso de impronta génica, de hecho, sus niveles de expresión son elevados durante la gametogénesis, momento en el que tiene lugar dicho proceso. Además, es capaz de reclutar histonas desacetilasas (HDACs) a promotores previamente metilados como mecanismo para reprimir la expresión génica (63, 64).

La DNMT2 pertenece a la familia de las DNA metiltransferasas pero carece de esta actividad enzimática y su actividad está relacionada con la metilación de tRNAs (65, 66).

Recientemente, se ha identificado una nueva DNMT *de novo* denominada DNMT3C en células germinales de ratón. Esta enzima parece estar especializada en la metilación de retrotransposones (67).

2.1.2. Regulación de la transcripción por metilación del DNA

Como ya hemos descrito anteriormente, la metilación del DNA en la región promotora de los genes y secuencias repetitivas se relaciona con la pérdida de expresión de los genes adyacentes. Sin embargo, esta modificación por sí sola no es capaz de reprimir la expresión génica. Se han propuesto dos posibles mecanismos a través de los cuales la metilación del DNA contribuye a dicho silenciamiento (68):

- Un primer mecanismo implica la interferencia directa de las citosinas metiladas con la unión de factores de transcripción. Este es el caso de AP-2, c-Myc/Myn, CREB, E2F y NF- κ B que reconocen secuencias que contienen CpGs y cuya unión se ha visto inhibida cuando estas están metiladas (69, 70, 71, 72, 73). Pero

existen otros factores de transcripción cuya secuencia de reconocimiento también contiene CpGs, pero su unión no se ve afectada por la metilación como es el caso de SP1 por lo que no es un mecanismo generalizado (74).

- Un segundo mecanismo, y el mejor caracterizado, implica el reconocimiento del DNA metilado por las proteínas de unión a DNA metilado (MBDs). En mamíferos, estas proteínas se dividen en tres familias: familia con dominio de unión a DNA metilado (MBDs), proteínas Kaiso y *Kaiso-like* y proteínas con dominio SRA (75). En general, estas proteínas contienen un dominio de unión a DNA metilado y un dominio represor con el que interaccionan con otras proteínas epigenéticas como las HDACs y los complejos remodeladores de la cromatina que en conjunto provocan el silenciamiento génico (**Figura 5**). En particular, MeCP2, que fue el primer miembro caracterizado de la familia MBD, interactúa con Sin3A, un complejo del que forman parte las histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2, que provocan la desacetilación de las histonas y que, como veremos más adelante, conducen a un estado condensado de la cromatina impidiendo el acceso de la maquinaria transcripcional (76, 77). MeCP2 también interacciona con complejos que contienen proteínas con actividad histona metiltransferasa (SuvarH1, SuvarH2, G9a, ESET y Eu-HMTasa 1) que metilan la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), una marca de histonas asociada al silenciamiento génico (78). Por otro lado, el silenciamiento génico por metilación de la γ -globina en los eritrocitos es mantenido por la acción de la proteína MBD2 (79).

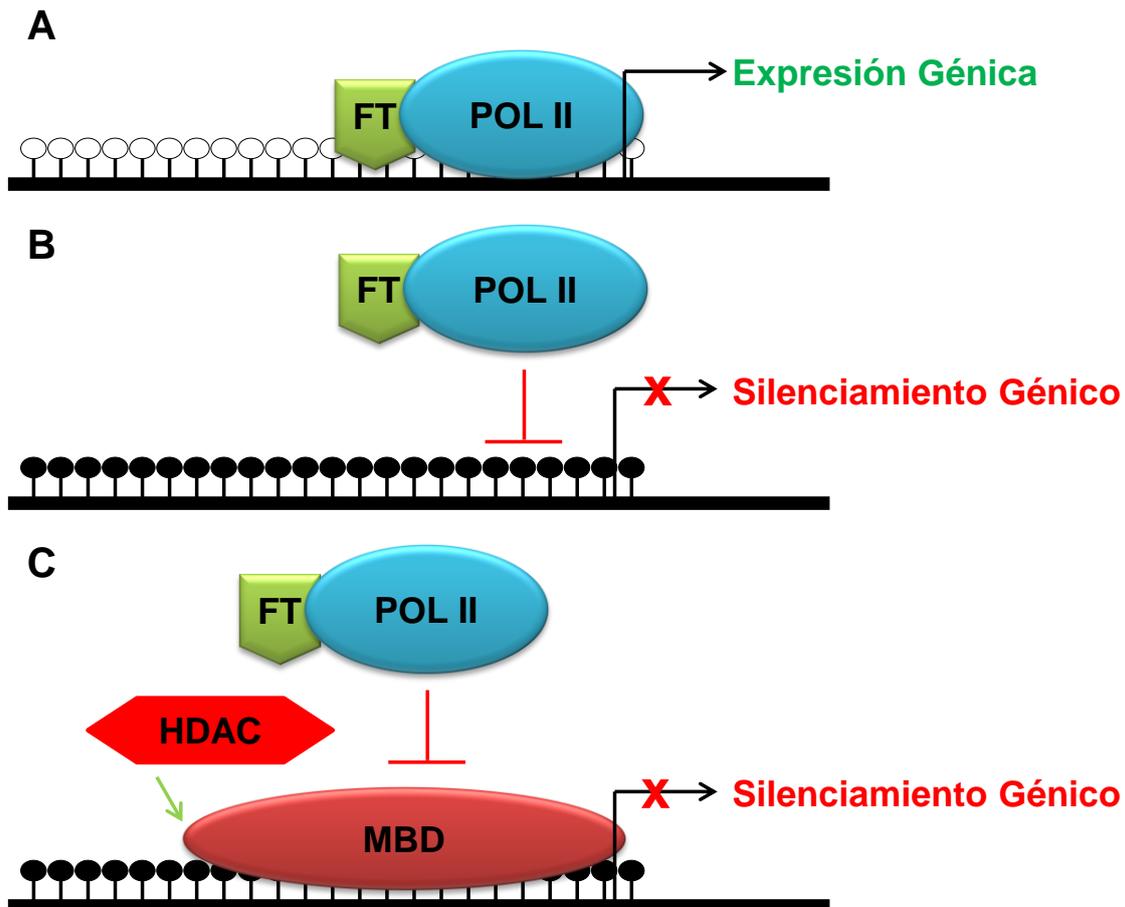


Figura 5. Mecanismos de represión transcripcional mediante la metilación de las islas CpG. (A) Representación de una isla CpG libre de metilación (bolas blancas) y que permite el acceso de la maquinaria transcripcional. **(B)** Silenciamiento génico debido a la presencia de metilación en la isla CpG (bolas negras) que impide directamente el acceso a la maquinaria transcripcional. **(C)** Silenciamiento génico mediado por las proteínas con dominio de unión a DNA metilado (MBD) y que es capaz de atraer complejos represores de la transcripción. FT: Factor de transcripción; PoL II: Polimerasa II; HDAC: Histona desacetilasa; MBD: Proteína de unión a DNA metilado. (Adaptado de (80)).

Por tanto, es indiscutible que la metilación de las islas CpG en los promotores de los genes impide su expresión. Sin embargo, si ha existido un amplio debate sobre que evento ocurre en primer lugar, el silenciamiento o la metilación del DNA. Durante mucho tiempo se asumió que el evento director era la metilación del DNA, como hemos descrito en el párrafo anterior, el DNA metilado es reconocido por proteínas que atraen complejos que son los responsables últimos del silenciamiento, pero los trabajos publicados en los últimos años indican que el DNA libre de nucleosomas no es sustrato para las DNMTs de *novo* ya que estas son reclutadas al DNA mediante su interacción con la DNMT3L, que a su vez, interacciona con el extremo amino terminal de la histona H3 cuando la lisina 4 está libre de marca (81). Por tanto, las DNMTs solo pueden metilar aquellos promotores ocupados por nucleosomas y en ausencia de marcas de histonas que facilitan la expresión. Por otro lado, la metilación del gen Hprt situado en el cromosoma X inactivado en mujeres tiene lugar después de que el

cromosoma X haya sido inactivado. Es decir, la metilación parece que actúa como un refuerzo a genes previamente silenciados, como los asociados al cromosoma X inactivo (82).

2.2. Desmetilación del DNA

La metilación del DNA es un proceso reversible en el que la pérdida de metilación o desmetilación puede ser pasiva o activa. Como ya hemos descrito, los patrones de metilación del DNA son mantenidos de células madre a hijas por la DNMT1, por lo que la ausencia de DNMT1 funcional puede conducir a una desmetilación pasiva del DNA tras sucesivas rondas de replicación. Por otro lado, existen evidencias que indican que esa pérdida de 5mC también puede ser llevada a cabo de forma activa e independiente de la replicación del DNA. No fue hasta el año 2009 cuando se llega a un consenso sobre el mecanismo de desmetilación activa. Las claves fueron la identificación, por un lado, de la 5-hidroximetilcitosina (5hmC), un derivado oxidado de la 5mC (83, 84), y por otro lado, la de una familia de dioxigenasas de DNA (TET1, 2 y 3 (*ten-eleven translocation*)) (85, 86). Estas enzimas catalizan la conversión de la 5mC a 5hmC produciendo en última instancia la desmetilación de la citosina a través de sucesivas oxidaciones y reparación por escisión de bases mediado por una timidina glicosilasa de DNA (TDG) (84). Estudios posteriores han demostrado que las proteínas TET pueden oxidar, además, la 5hmC a 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC) (87, 88, 89) (**Figura 6**). Además de ser un intermediario en la desmetilación activa del DNA, la 5hmC puede constituir, per se, una marca epigenética. Esta modificación es muy abundante en células troncales embrionarias y en neuronas de Purkinje lo que indica que está presente de manera estable en el genoma de mamíferos y, aunque no se conoce con exactitud su función, parece ser importante en la regulación de la expresión (83). No existen evidencias claras de una correlación entre la presencia de 5hmC en los promotores génicos y transcripción, aunque si se ha demostrado que la 5hmC puede evitar el efecto silenciador de la 5mC al impedir la unión de las MBDs. De hecho, MeCP2 no es capaz de unirse a su diana cuando la 5mC es convertida a 5 hmC (90).

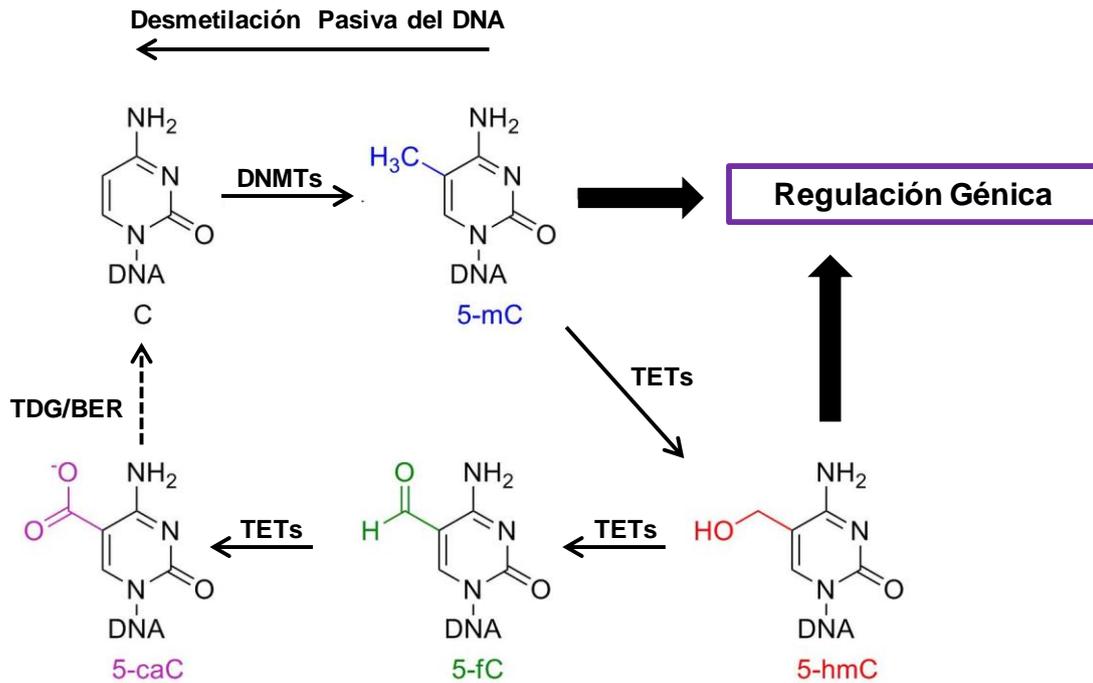


Figura 6. Representación esquemática de la metilación y desmetilación del DNA. La metilación del DNA es llevada a cabo por las DNMTs. La desmetilación del DNA tiene lugar de forma pasiva o activa. En este último caso está mediado por las proteínas TET que oxidan la 5- metilcitosina (5mC) a 5- hidroximetilcitosina (5hmC). La 5hmC puede ser convertida a citosina mediante una serie de reacciones enzimáticas y posterior reparación de DNA por escisión de bases (TDG/BER).

2.3. Modificaciones postraduccionales de las histonas

El material genético de los organismos eucariotas está empaquetado en una estructura denominada cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma que está compuesto por un octámero de histonas formado por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y rodeado por un fragmento de DNA de 147 pb. Los nucleosomas están unidos entre sí por un fragmento de DNA de tamaño variable y por la histona H1. En el núcleo celular la cromatina no está organizada de una manera uniforme, si no que la podemos distinguir en dos estados funcionales, una cromatina altamente condensada y, por lo tanto, inaccesible para la maquinaria transcripcional denominada heterocromatina, y otra poco condensada y, por tanto, accesible a dicha maquinaria denominada eucromatina.

Las histonas son proteínas muy conservadas evolutivamente en los organismos eucariotas que se caracterizan porque el extremo N-terminal es rico en aminoácidos básicos (lisina y arginina). Este extremo protruye del nucleosoma pudiendo contactar con otros nucleosomas. Durante muchos años se pensó que la función de las histonas era de mero soporte estructural para permitir la compactación del DNA en el núcleo. Sin embargo, hacia la mitad de los años 80 del siglo pasado este planteamiento fue reconsiderado a la luz de los estudios que demostraron que las modificaciones

postraduccionales que sufren los aminoácidos situados en el extremo N-terminal son fundamentales no sólo en el mantenimiento de los diferentes estados funcionales de la cromatina (heterocromatina y eucromatina) sino también en la regulación de la expresión, replicación, recombinación y reparación del DNA (91). Entre las numerosas modificaciones que pueden sufrir las histonas encontramos la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación y la ADP-ribosilación. La información acumulada por la diferente combinación de estas modificaciones es conocida como el “código de histonas” (92). Las modificaciones mejor conocidas son la acetilación y metilación de los residuos de lisina y arginina del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4.

2.3.1. La acetilación de histonas

La primera modificación de histonas descrita fue la acetilación (93). Pronto, los trabajos revelaron la asociación entre la acetilación de histonas y genes transcripcionalmente activos, indicando el papel de esta modificación en la regulación de la transcripción. Esta modificación epigenética es un proceso altamente dinámico, regulado por dos familias de enzimas denominadas histonas acetiltransferasas (HATs) e histonas desacetilasas (HDACs). Las HATs catalizan la transferencia de un grupo acetilo al grupo ϵ -amino de las lisinas, neutralizando la carga positiva de este residuo y debilitando su interacción con las cargas negativas del DNA. Como consecuencia se produce un estado más relajado de la cromatina que permite el acceso de la maquinaria transcripcional. Por el contrario, la desacetilación de histonas incrementa las interacciones iónicas entre estas y el DNA, conduciendo a un estado más condensado de la cromatina e inhibiendo la transcripción al limitar el acceso de la maquinaria transcripcional (94).

Además de regular la expresión controlando el estado de compactación de la cromatina, las lisinas acetiladas generan sitios de unión para proteínas que contienen los denominados bromodominios y que actúan como reguladores de la transcripción. Entre las proteínas con bromodominios encontramos las HATs PCAF y GCN5, coactivadores de la transcripción (CBP, *CREB-binding protein*), factores de transcripción (BPTF) y complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF) (95).

2.3.2. La metilación de histonas

La metilación de las histonas está relacionada con los procesos de regulación de la estructura de la cromatina, la transcripción y la reparación del DNA. Tiene lugar en los residuos de lisina y arginina del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4 y al igual que la acetilación es un proceso reversible regulado por las histonas metiltransferasas (HMT) y las histonas desmetilasas (HDM). Las lisinas pueden ser mono-, di- y trimetiladas, mientras que las argininas pueden estar mono- y dimetiladas, pero en ningún caso esta modificación altera la carga de las histonas. Así

como la acetilación de las lisinas está ligada a la activación de la transcripción, su metilación puede estar asociada a la activación o la represión transcripcional en función del residuo modificado y el grado de metilación sufrido por cada residuo (96). De modo que mientras la metilación de las lisinas 4, 36 y 79 de la histona H3 (H3K4, H3K36 y H3K79, respectivamente) se relaciona con regiones transcripcionalmente activas, la de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 (H3K9 y H3K27, respectivamente) y lisina 20 de la histona H4 (H4K20) están relacionadas con regiones silenciadas (91). Por ejemplo, la metilación de la H3K27 está implicada en el silenciamiento de genes HOX (codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario temprano), en la inactivación del cromosoma X y en el proceso de impronta génica (97). Además, el grado de metilación también va a determinar la función y localización de cada marca de histonas. Así, las formas di- y trimetiladas de H3K4 (H3K4me3) son características de genes transcripcionalmente activos, pero la forma dimetilada (H3K4me2) está distribuida a lo largo del cuerpo de genes activos, mientras que la forma trimetilada lo es de regiones promotoras (98). A diferencia de la acetilación y la fosforilación, la metilación es más estable lo que la convierte en una modificación epigenética de larga duración ligada a la conformación de la cromatina (99).

Dado que esta modificación no altera la carga neta de las lisinas, el efecto sobre la actividad transcripcional no depende del cambio de interacción de las histonas con el DNA. En este caso, las histonas metiladas son reconocidas por proteínas con cromodominios que bien directamente o mediante el reclutamiento de otras proteínas modifican la estructura de la cromatina y/o sus estados transcripcionales. Por ejemplo, la H3K9 metilada es reconocida por la proteína de la heterocromatina 1 (HP1) y las dos cooperan en el establecimiento de las regiones de heterocromatina (100, 101). La metilación de la H3K4 es reconocida por HATs y complejos remodeladores de la cromatina, entre otros, e impide el reclutamiento de las DNMTs favoreciendo de este modo la transcripción (102, 103).

2.3.3. Fosforilación de histonas

La fosforilación de histonas tiene lugar en los residuos de serina, treonina y tirosina y también es un proceso altamente dinámico regulado por proteínas quinasas y fosfatasas. Las quinasas de histonas transfieren un grupo fosfato procedente del ATP al grupo hidroxilo del residuo diana, aumentando la carga negativa de las histonas. La fosforilación de histonas está implicada predominantemente en la remodelación de la cromatina y en la regulación de la expresión génica. En función del contexto en el que tenga lugar, la fosforilación de histonas puede tener efectos significativamente divergentes en la estructura de la cromatina. En este sentido, la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10) se asoció inicialmente con la condensación de la cromatina durante la mitosis (104, 105), pero también se ha demostrado que favorece un estado relajado de la misma y la activación de la transcripción durante la interfase

celular en eucariotas (106, 107). Esto puede ser debido, al igual que ocurre en el caso de otras modificaciones postraduccionales, a que la fosforilación de un único residuo, no deba ser considerado como un evento independiente, si no que dependiendo del contexto celular en el que tenga lugar, su relación con otras modificaciones de histonas y su interacción con complejos reguladores de la transcripción, el efecto final será diferente.

2.4. miRNA

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA, entre 18 y 25 nucleótidos, muy conservadas evolutivamente, que no codifican para proteínas y cuya función principal es la regulación postranscripcional de la expresión. Fueron descritos por primera vez en 1993, en un estudio que identificó a lin-14 como un RNA de pequeño tamaño que regulaba la expresión del gen lin-4 de *Caenorhabditis elegans* (108). Estudios posteriores demostraron que los miRNAs inhiben la expresión mediante su unión a secuencias complementarias en la región 3'UTR de los mRNA que codifican para los genes que regulan. Actualmente, se estima que los miRNAs representan aproximadamente el 5% de todo el genoma de las diferentes especies y que el 60% de los genes que codifican para proteínas están regulados por al menos un miRNA. De hecho, los miRNAs regulan casi todas las funciones celulares como la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (109, 110, 111).

En mamíferos, los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II como una molécula de RNA denominada pri-miRNAs. Este pri-miRNA es procesado, en primer lugar, por una RNasaIII denominada Drosha que produce un pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos. Este pre-miRNA es exportado al citoplasma celular y una vez allí es hidrolizado de nuevo por otra RNasaIII denominada Dicer dando lugar a una molécula de RNA de doble cadena. A continuación, las cadenas de este miRNA se separan y una de ellas da lugar al miRNA maduro que se incorpora a un complejo denominado Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) (112, 113). El miRNA incorporado al complejo RISC reconoce e interacciona con la secuencia del extremo 3'UTR del RNA diana y reprime su expresión mediante la inhibición de la traducción o induciendo la degradación del mRNA dependiendo del grado de complementariedad con la secuencia diana.

2.5. Interrelación entre metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas

Las modificaciones epigenéticas no deben ser consideradas individualmente, ni como meros compartimentos estancos, sino que interactúan unas con otras en la regulación de la estructura y función de la cromatina, y es la combinación de estas modificaciones lo que podríamos denominar como "código epigenético". Por ejemplo, la metilación del DNA en las islas CpG de los promotores de los genes silenciados es acompañada de

una pérdida en la acetilación de las histonas y de la metilación de la H3K9, mientras que en los promotores transcripcionalmente activos, el DNA no está metilado, las histonas están acetiladas y la H3K4 está metilada.

Es particularmente interesante la relación entre la metilación del DNA y la metilación de las histonas en el restablecimiento del patrón epigenético durante el desarrollo embrionario. El patrón de metilación del DNA es borrado tras la fecundación y debe establecerse de nuevo aproximadamente en el momento de la implantación del embrión. Es en ese momento cuando se produce la metilación indiscriminada de todo el DNA salvo los promotores de los genes, proceso catalizado por la DNMT3A y DNMT3B. Este proceso puede ser explicado, al menos en parte, mediante la acción conjunta de las DNMTs y las modificaciones de histonas. La RNA polimerasa II se une al inicio de transcripción de los genes que se deben expresar y recluta proteínas con actividad HMT responsables de la metilación de la H3K4. Para el restablecimiento del patrón de metilación durante el desarrollo, las DNMT3A y B son reclutadas mediante la interacción con la DNMT3L, que reconoce el extremo aminoterminal de la histona H3, siendo esta interacción inhibida por la metilación de la H3K4. Por ello, la metilación de *novo* durante el desarrollo embrionario tiene lugar en la mayoría de los sitios CpG del genoma, exceptuando los promotores debido a la presencia de la forma metilada de la H3K4. (52, 81, 114).

Durante el desarrollo se produce la represión de los genes encargados de mantener la pluripotencialidad de las células embrionarias en los primeros estadios. Este es el caso del gen Oct 3/4 que se expresa en las primeras etapas y debe ser silenciado al inicio de la gastrulación. Este proceso comprende varios pasos en los que se establece una cooperación entre diferentes modificaciones epigenéticas. En primer lugar, se produce el reclutamiento de factores de transcripción que interaccionan con un complejo del que forman parte, entre otros, la histona metiltransferasa G9a e histonas desacetilasas, que desacetilan y metilan la H3K9. Esta modificación hace posible la unión de la proteína HP1 que facilita la heterocromatinización del promotor. Además, G9a interacciona con DNMT3A y DNMT3B que metilan el promotor y cooperan en la represión estable de Oct 3/4 durante el desarrollo (114, 115).

Por otro lado, las proteínas MBDs interaccionan con diferentes enzimas modificadoras de la cromatina entre las que se incluyen las HDACs y las lisinas metiltransferasas (116). Por ejemplo, MeCP2 se asocia con Suv39h 1/2, una histona metiltransferasa que metila H3K9, y por tanto, cooperan en el silenciamiento génico (78).

Además, existen mecanismos adicionales mediante los que se establece esta conexión entre las diferentes modificaciones epigenéticas. Por ejemplo, EZH2 (*Enhancer of Zeste homolog 2*), que es una HMT que forma parte del complejo Polycomb y es la encargada de metilar la H3K27, es capaz de unirse a las DNMTs y dirigir la metilación

del DNA a los promotores de determinados genes tanto en condiciones fisiológicas normales como en procesos patológicos como el cáncer (117, 118).

Por tanto, el correcto establecimiento, regulación y mantenimiento del patrón epigenético de cada tipo celular es fundamental para el funcionamiento normal de la célula y el mantenimiento de la homeostasis del organismo por lo que las alteraciones en dichos patrones dan lugar al desarrollo de diferentes patologías entre las que se encuentra el cáncer.

3. Epigenética y cáncer

El cáncer es una enfermedad o grupo de enfermedades con una etología muy diferente y en la que confluyen un gran número de factores. Durante décadas, los estudios en torno a las alteraciones moleculares responsables del desarrollo del cáncer se centraron en la búsqueda de alteraciones genéticas (mutaciones, translocaciones, etc.) que condujeran a cambios en la expresión y/o actividad de proteínas que regulan procesos importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular, como el ciclo celular y los procesos de muerte celular programada. Esta búsqueda ha producido notables resultados con el hallazgo de un gran número de mutaciones que, además de aportar una valiosa información sobre la etiología de cada tumor en particular, han sido decisivas para la selección de biomarcadores y el desarrollo de terapias. Sin embargo, no todas las alteraciones moleculares asociadas al cáncer pueden ser explicadas desde el punto de vista de la genética, sino que también son debidas a alteraciones epigenéticas (119).

Las alteraciones en las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante en el inicio y progresión del cáncer. El epigenoma del cáncer se caracteriza por cambios en los patrones de metilación del DNA y en las modificaciones postraduccionales de las histonas, así como cambios en la expresión y/o actividad de las enzimas que regulan estas modificaciones y en las proteínas encargadas de leerlas e interpretarlas. Todos estos cambios tienen como resultado una desregulación de la expresión génica que conducen al desarrollo y progresión de la enfermedad (119, 120). Al igual que las mutaciones, las alteraciones epigenéticas son mitóticamente heredables y seleccionadas durante el rápido desarrollo del cáncer confiriéndole una ventaja adaptativa a las células tumorales y dando como resultado un crecimiento celular descontrolado (121). Sin embargo, una ventaja de los cambios epigenéticos asociados al desarrollo tumoral es que son fáciles de detectar y potencialmente reversibles, lo que permite su uso como biomarcadores y posibles dianas terapéuticas.

3.1. Metilación del DNA en cáncer

Aunque hay cierto debate sobre si las alteraciones en los patrones de metilación del DNA durante la tumorigénesis son eventos conductores, es decir, si son requeridos

para la transformación y mantenimiento de la célula tumoral, o bien, son eventos pasajeros, lo que es indiscutible es que estos cambios contribuyen al fenotipo tumoral.

Una célula cancerosa se caracteriza por una pérdida de metilación global o hipometilación, a la vez que se produce la hipermetilación de las islas CpG de algunos promotores génicos (122) (Figura 7).

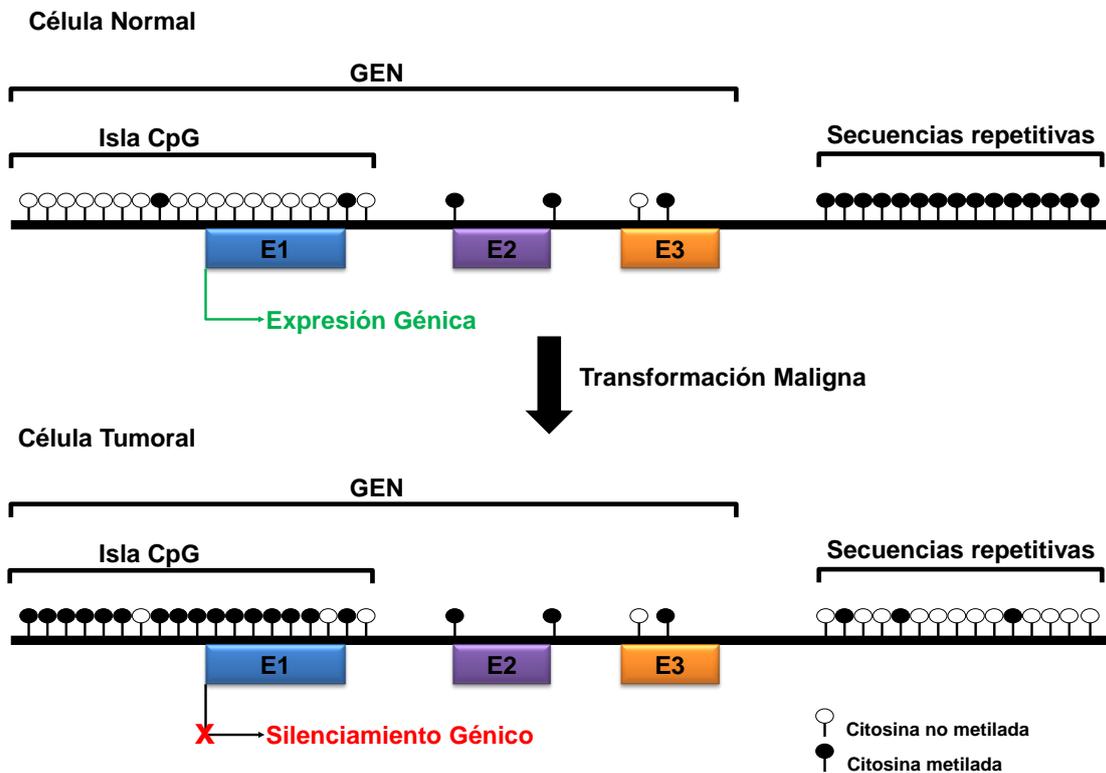


Figura 7. Perfil de metilación en una célula normal y en una célula tumoral. En la célula tumoral se produce una hipermetilación de los promotores génicos y una hipometilación global del DNA que conduce a una inestabilidad genómica.

3.1.1. Hipometilación del DNA en cáncer

Los primeros estudios que evidenciaron una relación entre la epigenética y el cáncer se publicaron en 1983 y mostraron una disminución en los niveles de metilación global en las células cancerosas en comparación con células normales. Desde entonces han sido numerosos los estudios que han demostrado una estrecha relación entre la disminución en los niveles de metilación del DNA y la progresión tumoral (123, 124). La hipometilación global del DNA tiene lugar principalmente en secuencias repetitivas, elementos transponibles y retrovirales integrados en el genoma (47). Esta alteración epigenética se ha observado tanto en las primeras etapas del desarrollo (125, 126) como en la progresión tumoral (127, 128). La hipometilación del retrotransposon LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element type 1*) está fuertemente asociada con la progresión de la leucemia mieloide crónica (CML) sugiriendo que LINE-1 puede ser un marcador de la progresión de esta patología (127).

Se han propuesto tres mecanismos para explicar la contribución de la hipometilación en el proceso de carcinogénesis:

- a) La disminución en los niveles de metilación en las secuencias repetitivas puede favorecer la recombinación dando lugar a reordenamientos cromosómicos, que en última instancia, promueven la inestabilidad genómica, predisponiendo la aparición de mutaciones, deleciones, amplificaciones, inversiones y translocaciones cromosómicas (129, 130, 131). De hecho, hay una relación directa entre la hipometilación y la aparición de alteraciones cromosómicas en pacientes con cáncer de colon (132) que, además, se asocia con un peor pronóstico de estos pacientes (133). La hipometilación de retrotransposones produce su activación y translocación a otras regiones genómicas contribuyendo a la inestabilidad observada durante el proceso tumoral (134). Siguiendo con el ejemplo anterior, LINE-1 se encuentra hipometilado en un amplio rango de tumores, entre los que se incluyen el de mama (135), hígado (136) y próstata (137).
- b) La hipometilación del DNA en los promotores de oncogenes puede conducir a un aumento en su expresión, como son los casos de R-Ras, la ciclina D2 y MASPIN en cáncer gástrico, MAGE en melanoma y S100P en cáncer de páncreas (138, 139, 140).
- c) Una disminución en la metilación puede inducir la pérdida del imprintado genómico (LOI). Un claro ejemplo, es el caso de IGF2, un factor de crecimiento que regula la proliferación celular. En células normales se expresa solo un alelo permaneciendo el otro inactivado por metilación del promotor. La hipometilación conduce a un aumento en la expresión de IGF2 provocando un aumento de la proliferación celular en tumores de mama, hígado, pulmón y colon (141, 142).

Hasta el momento no se ha descrito el mecanismo por el que se produce la hipometilación del DNA en cáncer. Sin embargo, diferentes estudios han puesto de manifiesto que diferentes factores ambientales y hábitos alimenticios pueden modificar la actividad de las enzimas responsables del mantenimiento de los estados de metilación del DNA. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado como la exposición a Arsénico (As) induce una hipometilación global dependiente de la dosis. La detoxificación del As es llevada a cabo por SAM, donador universal de grupos metilo y sustrato de las DNMTs. La exposición a As conlleva a una disminución de SAM y la actividad de las DNMTs (143, 144, 145, 146). Por otro lado, una dieta deficiente en folatos produce una atenuación en el ciclo de la metionina, aumentando los niveles de S-adenosilhomocisteina (SAH) y disminuyendo los de SAM, lo que conduce a una hipometilación del DNA recién sintetizado (147).

3.1.2. Hipermetilación del DNA en cáncer

De modo paralelo a la pérdida de metilación global, en cáncer se produce la hipermetilación de las islas CpG situadas en algunos promotores de genes con importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular. El primer gen supresor de tumores cuya hipermetilación se describió en cáncer fue el gen del retinoblastoma (Rb) que codifica para una proteína implicada en la regulación del ciclo celular (148). En las décadas posteriores, y gracias, en gran parte, a las técnicas de alcance genómico se ha producido un espectacular aumento en el número de genes inactivados por metilación en los diferentes tipos tumorales. Entre los genes silenciados por metilación en cáncer encontramos un gran número de genes supresores de tumores que regulan funciones directamente implicadas en el desarrollo tumoral como son el ciclo celular, la reparación del DNA, la adhesión celular, la apoptosis y la angiogénesis (**Tabla 1**). Como ejemplo, el silenciamiento de genes implicados en la reparación del DNA provoca que las células acumulen lesiones genéticas asociadas al desarrollo del cáncer, como sucede en el caso de la enzima O⁶ Metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT), cuya hipermetilación se asocia con la acumulación de mutaciones (G → A) en el gen KRAS en tumores colorrectales (149). La hipermetilación también puede regular de manera indirecta la expresión génica al producir el silenciamiento de factores de transcripción, como RUNX3, que está metilado en cáncer de esófago (150) y GATA-4 y GATA-5 en cáncer de colon y gástrico (151).

Tabla 1. Genes hipermetilados en cáncer y las funciones que regulan

Gen	Función	Tipo de Cáncer
Reparación del DNA		
hMLH1	Reparación de bases desapareadas	Colon, endometrio, estómago
MGMT	Reparación de O6-alkil-guanina	Múltiples tipos
WRN	Exonucleasa de DNA	Múltiples tipos
BRCA1	Reparación del DNA, Transcripción	Mama, ovario
Ciclo celular		
p16^{INK4a}	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina	Múltiples tipos
p15^{INK4b}	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina	Leucemia
Rb	Inhibidor del ciclo celular	Retinoblastoma
Vía p53		
p14^{ARF}	Inhibidor de MDM2	Colon, estómago, riñón
p73	Homólogo de p53	Linfoma
HIC-1	Factor de Transcripción	Múltiples tipos
Respuesta Hormonal		
ER	Receptor de estrógenos	Mama
PR	Receptor de progesterona	Mama
AR	Receptor de andrógenos	Próstata
PRLR	Receptor de prolactina	Mama
Respuesta vitamínica		
RAR	Receptor del ácido retinoico	Colon, pulmón, cabeza y cuello
Señalización de Ras		
RASSF1A	Efector homólogo de Ras	Múltiples tipos
NORE1A	Efector homólogo de Ras	Pulmón
Adhesión e Invasión celular		
CDH1	E-cadherina, adhesión celular	Mama, estómago, leucemia
CDH13	H-cadherina, adhesión celular	Mama, pulmón
FAT	Cadherina, supresor tumoral	Colon
EXT1	Síntesis de heparán sulfato	Leucemia, piel
EMP3	Interacciones célula-célula	Glioma, neuroblastoma
Apoptosis		
DAPK	Pro-apoptótico	Linfoma, pulmón, colon
TMS1	Pro-apoptótico	Mama
SFRP1	Secreted Frizzled-related protein 1	Colon
Cascada Tirosina Quinasa		
SOCS-1	Inhibidor de la vía JAK/STAT	Hígado, mieloma
SOCS-3	Inhibidor de la vía JAK/STAT	Pulmón
SYK	Tirosina quinasa	Mama
Factores de Transcripción		
GATA-4	Factor de Transcripción	Colon, estómago
GATA-5	Factor de Transcripción	Colon, estómago
Otras Vías		
GSTP1	Conjugación de glutation	Próstata, mama, riñón
LKB1/STK1	Serina/threonina quinasa	Colon, mama, pulmón
VHL	Componente de la Ubiquitina ligasa	Riñón, hemangioblastoma
THBS-1	Trombospondina-1, anti-angiogénica	Glioma
APC	Inhibidor de β -catenina	Tracto aerodigestivo
COX-2	Ciclooxygenasa-2	Colon, estómago
SRBC	Proteína de unión a BRCA1	Mama, pulmón
RIZ1	Metiltransferasa de Histona/proteína	Mama, hígado
Lamin A/C	Proteína estructural	Leucemia, linfoma

La hipermetilación del DNA es un evento temprano en el proceso tumorigénico, desempeñando, muy probablemente, un papel fundamental en su iniciación y progresión y creando un escenario propicio para la acumulación de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas. A pesar del gran número de datos que muestran una clara asociación entre las alteraciones en los patrones de metilación del DNA y el cáncer, aún no está claro si este es un evento conductor en el desarrollo tumoral. En este sentido, un estudio publicado recientemente demostró que la hipermetilación de p16 induce la formación de tumores y la progresión de la enfermedad en ratones (152).

Son muchos los estudios que han encontrado un aumento de la expresión de las DNMTs en diferentes tejidos y líneas celulares cancerígenas (153, 154, 155), lo que podría explicar, en parte, la hipermetilación observada en cáncer. Sin embargo, este aumento no explicaría la hipometilación global del DNA que se produce de modo paralelo. Otras de las incógnitas sin resolver es el por qué unos genes son más susceptibles a esta hipermetilación y cuáles son los mecanismos exactos que definen el que unas secuencias sean metiladas y otras no. En este sentido, se han propuesto varias teorías:

- El silenciamiento de determinados genes aportaría una ventaja en el crecimiento celular, dando como resultado su selección y proliferación clonal (156). Esta hipermetilación específica podría ser debida a un mecanismo mediante el cual las DNMTs son dirigidas a determinados genes mediante su interacción con factores de transcripción oncogénicos. En leucemia promielocítica aguda la proteína de fusión PML-RAR es capaz de reclutar las DNMTs a los promotores de los genes que tienen la secuencia de reconocimiento para este factor de transcripción e inducir de este modo la hipermetilación y el silenciamiento génico (157).
- Otra de las posibilidades, y la más aceptada, es aquella en la que determinadas modificaciones de histonas podrían actuar como dianas o marcadores para la metilación de *ново*. A menudo, regiones hipermetiladas en cáncer están marcadas por la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 en ESC y en algunos casos por la presencia de marcas bivalentes como H3K27me3 y H3K4me3 lo que sugiere un vínculo entre la regulación del desarrollo y la tumorigénesis (118). Las células ESC mantienen genes implicados en el desarrollo silenciados durante el proceso de diferenciación gracias a la existencia de los llamados dominios bivalentes de la cromatina que son regiones en las que solapan marcas de histonas que favorecen la activación transcripcional (H3K4me) y otras, que por el contrario, favorecen la represión (H3K27me3). Estas marcas permiten mantener silenciados determinados genes, como los genes de la familia HOX durante el desarrollo embrionario, a la

vez que permiten su posicionamiento hacia la activación cuando son necesarios. La hipermetilación de estos dominios bivalentes conduce al silenciamiento permanente de genes necesarios durante el proceso de diferenciación conduciendo a las ESC a un estado de continua autorrenovación y a una predisposición al desarrollo del cáncer (118, 158, 159, 160).

La hipermetilación de genes supresores de tumores es específica del tipo tumoral (161). Esto no quiere decir que cada gen está hipermetilado específicamente en un solo tipo tumoral, sino que existe un perfil específico para cada tumor, es decir, hay combinaciones de genes cuyo estado de metilación es exclusivo para cada tipo tumoral (130, 161). Mientras que algunos genes como el inhibidor del ciclo celular p16INK4a está hipermetilado en muchos tipos tumorales, entre los que se encuentran el colorrectal, el de pulmón, el carcinoma de mama, el de vejiga y el melanoma (162), la hipermetilación de otros genes como EXT1 es característica de leucemias y cáncer de piel (163). Esto, junto con la reversibilidad de esta modificación epigenética, y la disponibilidad de métodos rápidos y sensibles para su detección hacen de la metilación del DNA una excelente herramienta para el diagnóstico, pronóstico y su uso como diana terapéutica.

3.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas en cáncer

Los avances tecnológicos han hecho posible un mejor conocimiento de las alteraciones de las modificaciones de histonas asociadas al desarrollo tumoral. Dichas alteraciones representan otro mecanismo epigenético que ayuda a explicar el comportamiento de la célula cancerosa. De igual modo a como sucede con la metilación del DNA, en las últimas décadas han aparecido un gran número de trabajos en los que se han comparado los patrones de las modificaciones de histonas entre células normales y tumorales. Uno de los primeros estudios demostró que la pérdida de acetilación de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) y de la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3) en secuencias repetitivas es un evento común en las células de cáncer humano, que además, va asociado a la pérdida de metilación del DNA en estas regiones. Además, estos cambios en las histonas tienen lugar en etapas tempranas del desarrollo de esta patología (164).

Los cambios en los niveles de acetilación de histonas observados en cáncer pueden ser debidos a cambios en la expresión y/o actividad de las HDACs y las HATs. En cuanto al papel que desempeñan las HDACs en cáncer, un gran número de estudios han evidenciado como la alteración en sus niveles de expresión están implicados en diferentes tipos de cáncer. Así, se han encontrado aumentos de expresión de HDAC1 en tumores gástricos, de próstata y colon; de HDAC2 en cáncer cervical y gástrico y de HDAC3 y HDAC6 en cáncer de colon y mama, respectivamente (94). El aumento en la expresión de las HDACs tiene como resultado una disminución en los niveles de

acetilación de las histonas y, por tanto, la represión de genes supresores del crecimiento promoviendo la proliferación de células cancerosas. En este sentido, HDAC2 esta habitualmente sobreexpresada en carcinomas colorrectales, displasias cervicales, sarcomas del estroma endometrial y carcinomas gástricos (165). Sin embargo, otros estudios han encontrado que la pérdida de función de HDAC2 puede tener un papel relevante en el desarrollo de tumores con inestabilidad de microsatélites (166, 167).

Por otro lado, las HATs también se encuentran alteradas en diferentes patologías incluido el cáncer. Se han observado translocaciones de las HAT CBP y MOZ en leucemia mieloide aguda (AML) (168). En cánceres colorrectales y gástricos se han identificado mutaciones en p300 (169).

En cuanto a los cambios en la metilación de histonas en cáncer, al igual que ocurre con los cambios en la acetilación, pueden ser debidos a alteraciones en la expresión y/o actividad de las HMTs y HDMs. Los cambios en la expresión y/o actividad de las HMTs son frecuentes en cáncer, asociándose, además, en algunos casos con un aumento de su agresividad. Así, los niveles de expresión de EZH2, además de ser un biomarcador de progresión en CP, se ha asociado con una mayor agresividad del cáncer de mama y con la progresión del cáncer de vejiga (170).

De igual manera a como sucede con las HMT, también se han descrito un gran número de alteraciones que provocan cambios en la actividad de las HDMs en cáncer como mutaciones, translocaciones y cambios de su expresión (171). Como ejemplo, los niveles de expresión de LSD1 están aumentados en cáncer de vejiga, próstata, pulmón y cáncer colorrectal (172). JARID1B está sobreexpresada en cánceres de mama ductales y, además, esta alteración está asociada a un fenotipo más agresivo en cánceres de mama y próstata (173).

3.3. miRNAs en cáncer

Los miRNAs regulan la expresión de una creciente lista de genes implicados en procesos biológicos tan importantes como el desarrollo, diferenciación, regulación del metabolismo y el ciclo celular (109). La desregulación de estos miRNAs está implicada en el desarrollo de un gran número de patologías entre las que se incluye el cáncer. En función de cuales sean sus dianas, los miRNAs pueden actuar bien como supresores de tumores o bien como oncogenes. En el caso de que el miRNA regule la expresión de un oncogén se comportaría como un supresor de tumores, mientras que si lo que regula es un gen supresor de tumores se estará comportando con un oncogén. Muchos miRNAs supresores de tumores están reprimidos en cáncer, como es el caso de mir-15 y 16, dos miRNAs que tienen como diana el gen antiapoptótico BCL2 y cuya expresión está disminuida en pacientes con leucemia linfocítica (CLL) (174). Por el contrario, la expresión de miRNAs oncogénicos esta aumentada en cáncer, como es el caso de miR-

21, que tiene como diana PTEN, y para el que se ha descrito un aumento de expresión en glioblastoma (175).

Los cambios en la actividad de los miRNAs se pueden producir por una desregulación transcripcional, mutaciones, o por defectos en la maquinaria responsable de su procesamiento (176). Los cambios epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones en las histonas también pueden ser responsables de la desregulación transcripcional de los miRNAs. En este sentido, la hipermetilación de miR-124a produce un aumento en la expresión del oncogén CDK6 (177).

3.4. La epigenética como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer

Un aspecto tremendamente atractivo de las modificaciones epigenéticas es que son heredables y potencialmente reversibles, características que hacen de ellas excelentes candidatas para su uso como dianas terapéuticas (178). Así, gran parte de los esfuerzos en las últimas décadas se han centrado en el descubrimiento y desarrollo de compuestos que contrarresten los cambios en la metilación del DNA y las modificaciones de histonas descritas hasta el momento, siendo las enzimas que catalizan estas modificaciones (DNMTs, HDACs, HMTs y HDMs) las dianas para una posible intervención farmacológica.

Como hemos descrito anteriormente, las alteraciones en los patrones de metilación del DNA son cruciales en el desarrollo del cáncer, por lo que se ha prestado especial atención al desarrollo de moléculas capaces de inhibir la actividad de las DNMTs. Los inhibidores de las DNMTs se pueden dividir en dos clases: análogos de nucleósidos (5-azacitidina y 5'aza-2' deoxicitidina) y no análogos de nucleósidos. La 5-azacitidina y 5'aza-2' deoxicitidina son análogos de la citosina que son incorporados al DNA durante la replicación y forman uniones covalentes con las DNMTs inhibiendo su actividad e impidiendo que se establezca el patrón de metilación en la nueva hebra de DNA, lo que conduce a una desmetilación pasiva del DNA (179). El uso del 5'aza-2' deoxicitidina y del 5-Azacitidina, conocidos comercialmente como Dacogen® y Vidaza®, respectivamente, ya ha sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y por la AEM (Agencia Europea del Medicamento) para el tratamiento de pacientes con AML, leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y síndromes mielodisplásicos (180). Sin embargo, los mayores problemas que presentan este tipo de fármacos es su alta inestabilidad *in vivo* y una alta toxicidad secundaria, ya que al incorporarse de forma masiva al DNA provocan la parada del ciclo celular (181). Además, presentan una menor efectividad en tumores sólidos, por lo que los esfuerzos de los últimos años se han centrado en la búsqueda de otro tipo de moléculas que tengan una mayor efectividad y una menor toxicidad (182, 183, 184). Este es el caso de la curcumina, la procaína, la procainamida y la hidralacina que también son inhibidores de DNMTs, pero no son análogos de nucleósidos. Estos compuestos tienen la ventaja de que son

capaces de unirse a las DNMTs sin incorporarse al DNA. Sin embargo su aplicación clínica no ha progresado tan rápidamente (185, 186).

Por otro lado, las HDACs son también unas dianas atractivas para una intervención farmacológica. Los inhibidores de las HDACs (HDACi) son un grupo de compuestos que reconocen el dominio catalítico de estas enzimas bloqueando el reconocimiento de su sustrato e inhibiendo su actividad. El tratamiento con estos compuestos restaura la expresión de genes involucrados en la parada del ciclo celular, en la inducción de la diferenciación y en la apoptosis, inhibiendo el crecimiento tumoral (187). De hecho, dos HDACi, *vorinostat* (SAHA, Merck & Co., Inc.) y *depsipeptide* (Romidepsin, FK-22, Gloucester Pharmaceutical Inc.) fueron aprobados por la FDA en 2006 y 2009, respectivamente, para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (CTCL) (188).

Un gran número de genes silenciados en cáncer por metilación del promotor se caracterizan, además, por la pérdida de acetilación de las histonas, por lo que el uso combinado de inhibidores de la metilación del DNA e inhibidores de las HDACs es una terapia prometedora por sus efectos sinérgicos en el restablecimiento de la expresión de genes supresores de tumores. El uso combinado de 5-azacitidina y *entinostat*, un HDACi, mostró resultados prometedores en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (189). El tratamiento combinado con 5'-aza-2' deoxicitidina y SAHA inhibió el crecimiento celular en cáncer de ovario e indujo apoptosis, parada del ciclo celular y autofagia *in vitro* e *in vivo* (190).

4. Epigenética y cáncer de próstata

El CP es una enfermedad heterogénea cuyos factores de riesgo son la edad avanzada, el estilo de vida, el ambiente, los factores genéticos y los factores epigenéticos. Dado que tanto el ambiente, como la edad influyen de modo decisivo en la epigenética, es lógico pensar que se pueda establecer una correlación entre estos factores de riesgo y las alteraciones epigenéticas que se producen en el inicio y progresión del CP. Aunque no se conocen los mecanismos exactos por los que se producen estas alteraciones, el hecho de que se produzcan con mayor frecuencia que las mutaciones y que sean más comunes en etapas premalignas de la enfermedad, hacen que sean unos atractivos biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento del CP (191).

4.1. Hipermetilación del DNA en cáncer de próstata

El silenciamiento génico por hipermetilación de los promotores se ha observado en lesiones precursoras (PIN) y en estadios tempranos del desarrollo del CP, sugiriendo que esta alteración epigenética puede tener un papel determinante en el proceso de transformación maligna (192). Además, los cambios en la metilación del DNA también aparecen durante la progresión y metástasis del CP, lo que indica que esta alteración

puede actuar también como un evento conductor durante la expansión clonal y diseminación metastásica (193).

La hipermetilación del DNA es la alteración epigenética más estudiada en CP (194). Son muchos los estudios que se han centrado en su potencial papel como biomarcador por varias razones: el DNA es más estable que el RNA o las proteínas, tanto *in vitro* como *ex vivo* (195); el DNA puede ser extraído fácilmente de muestras embebidas en parafina, usadas rutinariamente en clínica; al contrario de lo que sucede con las alteraciones genéticas, la metilación del DNA generalmente ocurre en regiones concretas (hipermetilación de las islas CpG) de un gen, lo que simplifica la realización del ensayo (196); los niveles de metilación pueden ser determinados por métodos sensibles, rápidos y baratos como la PCR específica de metilación (MSP), que pueden ser implantados fácilmente en la práctica clínica (197). Además, la hipermetilación del DNA se puede detectar tanto en sangre como en orina de los pacientes con CP, permitiendo de esta manera el desarrollo de test diagnósticos poco o nada invasivos (198, 199, 200).

Sin embargo, el estudio del perfil de metilación del DNA en estos tumores es complicado ya que algunos de los cambios que se producen son debidos a influencias ambientales y a la acumulación de cambios durante el envejecimiento celular normal sin que exista relación con el inicio y progresión del CP. Para que resulten útiles como biomarcadores, las alteraciones epigenéticas, y en este caso la metilación del DNA, deben ser distinguidas de aquellos cambios asociados exclusivamente al envejecimiento celular.

Hasta el momento, se han identificado más de 50 genes hipermetilados en CP que están implicados en el control del ciclo celular (CDKN2A, CDKN1A), reparación del DNA (GSTP1, MGMT), adhesión celular (CD44, EDNRB, CDH13, APC), crecimiento celular, invasión y metástasis (TIMP2, TIMP3), apoptosis (DAPK) y señalización hormonal (AR) (195, 201). De estos, el más ampliamente estudiado es GSTP1, implicado en el metabolismo, detoxificación y eliminación de compuestos exógenos potencialmente genotóxicos (202). La hipermetilación de GSTP1 (Glutati6n S-transferasa pi 1) es el biomarcador epigenético mejor establecido por diferentes motivos: su alta especificidad, está metilado en más del 90% de los casos de pacientes con CP, (203); los niveles de metilación de GSTP1 permiten diferenciar entre CP, BPH y HGPIN (204); su metilación está asociada a la recurrencia del CP después del tratamiento (202, 205); y se puede determinar su estado de metilación en fluidos corporales como suero, plasma y orina (206, 207).

Sin embargo, aunque la metilación de GSTP1 sea mucho más específica que la determinación de los niveles de PSA (Antígeno Prostático Específico) en suero, no es 100% específico de próstata ya que también está hipermetilado en otros tipos de

cáncer como el de mama e hígado (208, 209, 202). Por ello, la mejor opción para mejorar la especificidad y sensibilidad es la selección de paneles de genes cuya metilación conjunta sirva como biomarcador para este tipo de tumores (210, 211). Los estudios realizados en este sentido indican que las diferentes combinaciones de la metilación de GSTP1, RASSF1, CDH1, APC, DAPK, MGMT, p14, P16INK4a, RARβ2 y TIMP3 permiten discriminar entre individuos sanos y pacientes con CP, aumentando la sensibilidad y la especificidad (212, 213).

El uso de perfiles de metilación también ha demostrado ser una herramienta muy útil como biomarcador de pronóstico de la enfermedad. Así, la inactivación por metilación de RASSF1 es un evento común en CP que, además, se correlaciona con tumores con un elevado índice de Gleason (214). De igual modo a como sucede con el diagnóstico, la selección de grupos de genes metilados mejora la correlación entre los patrones de metilación y las características clinicopatológicas como el estadio, el grado tumoral y recurrencia de la enfermedad (215, 216, 217). Así, la metilación de la glicoproteína CD44 y de PTGS2 predice la recurrencia bioquímica en pacientes con CP que han sufrido una prostatectomía radical e identifica aquellos con tumores más agresivos (218). Nuestros datos indican que la hipermetilación simultánea de ETV1 y ZNF215 podría ser utilizada como biomarcador para predecir el desarrollo de resistencia de los tumores de próstata frente a los tratamientos hormonales (219). También hemos encontrado que la hipermetilación de GSTM2 y MYCL2 son buenos marcadores para predecir la recurrencia bioquímica de los pacientes tratados con prostatectomía radical (220). Por tanto, es necesaria la búsqueda de grupos de genes para su uso como nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del CP que permitan discriminar entre tumores indolentes o agresivos.

4.2. Hipometilación en cáncer de próstata

Como ya describimos, la hipometilación del DNA fue una de las primeras alteraciones epigenéticas descritas en cáncer que, además, se produce en los primeros estadios del desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, en CP se ha demostrado que la hipometilación global del DNA es un evento tardío en la progresión de la enfermedad, asociada a una etapa metastásica avanzada, por lo que esta marca epigenética podría estar involucrada en la progresión y propagación de la enfermedad (221). Un estudio reciente asoció la hipometilación del DNA con el diagnóstico y el pronóstico en CP demostrando que esta alteración juega un papel importante tanto en el desarrollo como en la progresión de esta patología (222). Entre los genes cuya expresión parece estar aumentada en CP debido a la hipometilación de su promotor encontramos un miembro de la familia del citocromo P450 (CYP1B1) (223), la heparanasa (HPSE) (224), un miembro de la familia wnt (WNT5A) (225) y la uroquinasa activadora del plasminógeno (PLAU) (226).

Por último, en estos tumores se ha observado que junto con la hipermetilación de los genes COX2, RASSF1A y GSTP1, entre otros, se produce la hipometilación de las secuencias repetitivas Alu y LINE-1. Además, estas modificaciones se han asociado con diferentes características clinicopatológicas, lo que sugiere que la hipermetilación de promotores y la hipometilación de secuencias repetitivas podrían estar contribuyendo de manera simultánea en la progresión del CP (227).

4.3. Modificaciones postraduccionales de las histonas en cáncer de próstata

Hay muy pocos estudios sobre la relevancia de los cambios en las modificaciones de histonas en el desarrollo del CP y su posible papel como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico (228, 229, 230, 231). Entre estos estudios, uno correlacionó los niveles globales de la acetilación de H3K18 y de H4K12 y la metilación de H3K9 y H4R3 con el estadio tumoral. Además, demostró que la combinación de la acetilación de H3K18 y metilación de H3K4 eran indicativas de la recurrencia en pacientes con tumores de próstata de bajo grado (228). Por otro lado, se ha demostrado la relación entre la metilación de H3K27 con el estadio tumoral, la penetración capsular, la infiltración en las vesículas seminales y con el índice de Gleason en el CP localizado, lo que puede ser indicativo de un pronóstico adverso de la enfermedad (232). En este sentido, los tumores de próstata localizados que expresan niveles más elevados de EZH2, la HMT encargada de metilar la H3K27, muestran un peor pronóstico de la enfermedad (233). Del mismo modo que en otros tipos de cáncer, los niveles de expresión de las HDACs están aumentados en CP. En particular, el aumento de expresión de HDAC1 es común en estos tumores y sus niveles se ven incrementados en la fase de la enfermedad resistente al tratamiento hormonal (234). Otro estudio encontró una elevada expresión de las HDACs de clase I (1,2 y 3) en la mayoría de los tumores analizados y en las lesiones PIN correspondientes, lo que indica que este es un evento temprano en el desarrollo de esta patología (235).

4.4. Terapia epigenética en el cáncer de próstata

En relación a la terapia epigenética en CP, aunque hay evidencias de la eficacia de los inhibidores de las DNMTs 5-azacitidina y 5'aza-2' deoxicitidina en líneas celulares de CP, los ensayos clínicos han mostrado un beneficio limitado en pacientes con tumores avanzados y resistentes a la terapia hormonal (236, 237). RG108 es un inhibidor no nucleósido de las DNMTs que ha demostrado ser un eficaz supresor del crecimiento en líneas celulares de CP, efecto asociado, probablemente, a la reexpresión de genes silenciados por metilación. (238).

OBJETIVOS

El CP es uno de los tipos de tumores cuyo desarrollo está íntimamente relacionado con la edad y los hábitos de vida, dos factores que, además, se han asociado con cambios en las modificaciones epigenéticas. Entre las modificaciones epigenéticas, la metilación del DNA es la más ampliamente estudiada y de la que mejor se conoce su relación con el desarrollo de cáncer. Por ello, en este trabajo nos planteamos realizar un análisis masivo que nos permitiera definir el perfil de metilación característico de este tipo de tumores para identificar genes cuya inactivación por metilación esté implicada en el desarrollo del CP. Además, el análisis de la relación entre la metilación de los genes seleccionados y los diferentes parámetros clinicopatológicos nos permitiría determinar su valor como posibles biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico.

El objetivo principal de esta tesis es la búsqueda nuevos genes hipermetilados en CP para determinar su papel en el desarrollo de estos tumores y su posible uso como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de esta patología. Los objetivos concretos han sido:

1. Identificar genes metilados en CP comparando el estado de metilación de un gran número de genes en una amplia muestra de tumores y de tejido prostático normal mediante el uso de arrays de metilación de DNA.
2. Estudiar las consecuencias de los cambios de expresión de los genes seleccionados en el desarrollo y progresión del CP.
3. Analizar el posible uso de los genes seleccionados como biomarcadores en la detección de la enfermedad y en la progresión de la misma comparando neoplasias precoces y avanzadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y muestras humanas

1.1. Líneas celulares humanas de cáncer

Para la realización de este trabajo se han utilizado, principalmente, las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145 y la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. A continuación, se describen las características de dichas líneas celulares:

- **LNCaP (*lymph node cancer prostate*):** línea celular aislada de una biopsia procedente de un ganglio linfático con lesión metastásica en un hombre de 50 años de raza blanca. Esta línea celular expresa el receptor de andrógenos (RA) y es dependiente de andrógenos.
- **PC3:** línea celular derivada de una metástasis ósea en la vértebra lumbar de un hombre de raza blanca de 62 años. Estas células no expresan el RA y son independientes de andrógenos.
- **DU145:** células epiteliales derivadas de una masa tumoral extraída del cerebro de un hombre de raza blanca de 69 años con CP y leucemia linfóide. Al igual que las PC3, no expresan el RA y son independientes de andrógenos.
- **MDA-MB-231:** células epiteliales derivadas de un derrame pleural de una paciente con cáncer de mama. Estas células expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α).

Todas las líneas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células de CP se crecieron en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) y las MDA-MB-231 en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementados con 4,5 g/l de glucosa, 1 mM de glutamina (Gibco-BRL), 1% de antibióticos (Penicilina, Estreptomina, Fungizona, *Gibco*) y 10% de suero fetal bovino (FBS, *Gibco*). Las células se mantuvieron en un incubador *Forma Scientific* a 37 °C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. El medio de cultivo se renovó cada tres días hasta alcanzar el 80% de confluencia, momento en el que las células se despegaron del soporte mediante la incubación con una solución de tripsina-EDTA (0,5 g/l de tripsina y 0,2 g/l de EDTA en PBS, *Gibco*) a 37 °C durante aproximadamente 5 min, dependiendo de la línea celular. La tripsina se neutralizó con medio completo y las células se sembraron en nuevos frascos de cultivo a una dilución entre 1/10 y 1/5, según la línea celular.

Para los tratamientos con el agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina (*Sigma*) las células se sembraron en placas p100 a una densidad entre 1 y 2 x 10⁶ células por placa, según la línea celular. Tras 24 horas de incubación, las células se trataron con 2 y 5 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina durante 72 horas, repitiéndose el tratamiento cada 24 horas.

2.2. Muestras humanas.

Para el estudio del perfil de metilación en CP se obtuvieron 83 muestras de tumores de próstata y 10 muestras de tejidos normales de próstata procedentes de pacientes tratados en el Servicio de Urología del Hospital Universitario de Getafe. Para la obtención de las muestras se siguieron los protocolos estandarizados y se respetó el código ético correspondiente. Las características de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 2, en los que están representados de forma equilibrada: enfermedad localizada, enfermedad localmente avanzada y enfermedad diseminada. La media de edad fue de 66,4±7,5 (46-85) años y la media de los niveles de PSA fue de 46,5±119,3 (80,3-820,2) ng/ml. El seguimiento medio fue de 62,3 (95% CI, 53,5-71,1, rango de 10-166) meses.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Parámetros clínicos	N (%)
Edad, años	
<65	39 (47)
>65	44 (53)
Grado Gleason total	
6	4 (4.8)
7	32 (38.6)
8	25 (30.1)
9	19 (22.9)
10	3 (3.6)
Categoría T	
T1	12 (14.5)
T2	23 (27.7)
T3	36 (43.4)
T4	12 (14.5)
Categoría M	
M0	72 (86.7)
M1	11 (13.3)
Ki-67 (%)	
0-5	48 (60)
6-12	14 (17.5)
13-25	8 (10)
>25	10 (12.5)
Muerte por cáncer de próstata	
Si	26 (31.3)
No	57 (68.7)

Para el análisis de la metilación de Gfi1 se obtuvieron, además, muestras de DNA de tumores de mama y colon. En todos los casos, las muestras tumorales fueron obtenidas siguiendo los procedimientos estandarizados y respetando los códigos éticos correspondientes.

2. Extracción de DNA de líneas celulares

Para la extracción de DNA las células se resuspendieron en 5 ml de tampón proteinasa K (50 mM Tris pH 8,8; 100 mM NaCl; 5mM EDTA y 1% SDS) al que se añadió 0,1 mg/ml de proteinasa K (*Roche*) y se incubaron toda la noche a 37°C. A continuación, se añadió 1,5 M NaCl y tras mezclarlo vigorosamente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se mezcló con isopropanol al 100% en una proporción 1:1 y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Finalmente, el DNA se resuspendió en agua miliQ estéril y la concentración se determinó en un espectrofotómetro (*NanoDrop*, de *Thermo Scientific*) a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras de DNA se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

3. Extracción de DNA de tejidos

Dado que todos los tejidos de los que partíamos estaban incluidos en parafina, el primer paso fue desparafinar las muestras para lo que se añadió 1ml de Xilol a cada muestra y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. El precipitado se lavó con etanol absoluto, centrifugando de nuevo a 12000 rpm durante 15 min. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón proteinasa K al que se añadió 0,1 mg/ml de proteinasa K y se incubó toda la noche a 58 °C. Transcurrida la incubación, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico en una proporción 24:1:1 (*Sigma*), se agitó fuertemente y se centrifugó a 10000 rpm. A continuación, se recogió la fase acuosa y el DNA se precipitó durante toda la noche a -20°C con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y acetato sódico 3M, pH 5,5. Para recuperar el DNA se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min, tras lo que se lavó con etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 13000 rpm durante 30 min. Finalmente, el DNA se resuspendió en agua miliQ estéril y la concentración se determinó en un espectrofotómetro (*NanoDrop*) a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras de DNA se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

4. Análisis de metilación del DNA

4.1. Modificación del DNA con bisulfito sódico

En presencia de bisulfito sódico, las citosinas no metiladas se convierten en uracilos por desaminación oxidativa, mientras que las citosinas metiladas permanecen insensibles a este tratamiento. Tras la amplificación por PCR, los uracilos se sustituyen por timinas en la nueva hebra sintetizada, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas permitiendo de esta manera diferenciar entre las citosinas metiladas y no metiladas en la secuencia original (**Figura 8**).



Figura 8. Esquema de la modificación del DNA con bisulfito sódico

Para la modificación del DNA con bisulfito sódico se siguió el protocolo descrito por Herman y col. (197). Se partió de 1 µg de DNA en 50 µl de agua miliQ al que se añadieron 5,7 µl de NaOH 3 M y se incubó a 37°C durante 15 minutos para desnaturalizar el DNA y originar de esta manera un DNA sensible a la reacción con bisulfito. A continuación, se añadieron 33 µl de hidroquinona 20 mM (*Sigma*), un antioxidante que previene la oxidación de intermediarios formados durante el tratamiento con bisulfito, y 530 µl de bisulfito sódico 4,3 M pH 5 (*Sigma*) y se incubó a 50°C durante 16-17 horas en oscuridad. Tras la incubación, el DNA modificado se purificó con el Kit *DNA clean-up* (*Promega*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, el DNA se precipitó con 450 µl de etanol absoluto frío, 17 µl de acetato amónico 10 M (*Sigma*) y 1 µl de glucógeno 10 mg/ml (*Roche*), y se dejó a -80° toda la noche. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó en las mismas condiciones. El DNA obtenido en el precipitado se resuspendió en agua miliQ esteril y se guardó a -20°C hasta su uso.

4.2. PCR específica de metilación (MSP)

La PCR específica de metilación (MSP, *Methylation-specific PCR*) permite amplificar selectivamente los alelos metilados y no metilados tras la modificación previa del DNA con bisulfito sódico (197). Para ello, se diseñaron dos pares de cebadores específicos, uno que amplifica la muestra en el caso de que las citosinas no estén metiladas (U) y el otro que amplifica si la muestra está metilada (M) (**Figura 9**) y se realizaron dos reacciones de PCR bajo las mismas condiciones:

7 minutos a 95 °C
35 ciclos
30 segundos a 95 °C
30 segundos a X °C (X= temperatura de anillamiento)
30 segundos a 72 °C
7 minutos a 72 °C

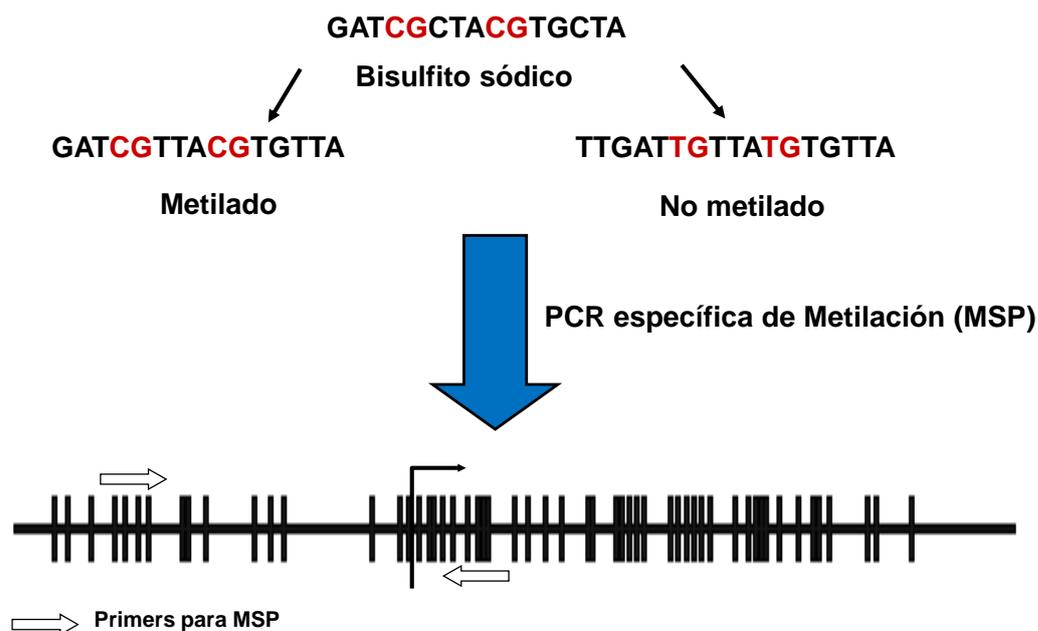


Figura 9. PCR específica de metilación (MSP, *Methylation-specific PCR*). Técnica que permite amplificar selectivamente alelos metilados y no metilados tras la modificación del DNA con bisulfito sódico. Las líneas verticales representan CpGs. Las flechas de color blanco representan los cebadores diseñados para la reacción de la PCR.

Los cebadores se diseñaron mediante el programa *Methyl Primer Express[®] Software v1.0* de *Applied Biosystems*, garantizando la especificidad para la secuencia de DNA modificada (**Tabla 3**). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 15 µl que contenían 1,5 µl de DNA modificado con bisulfito, tampon 1x (*Ecogen*), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM oligonucleótidos y Taq polimerasa (1,5 U) (*Ecogen*). Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% en TBE (0,089 M Ácido Bórico y 1 mM pH 8 EDTA).

Tabla 3. Cebadores usados en la MSP

Gen de interés	Cebador Antisentido	Cebador Sentido	Reacción
Gfi1	5' CTACAAAATTA AAAACCGCG 3'	5' TTATGGCGTTTTATTGTTTTTC 3'	M
	5' ACTACAAAATTA AAAACACACA	5' TTTTATGGTGTTTTATTGTTTTT 3'	U
GSTM2	5' AAACCTAAAACGCGCTCATA 3'	5' ATTTAGAGGTAGCGGCGC 3'	M
	5' AAACCTAAAACACACTCATAAAA 3'	5' TTAATTTAGAGGTAGTGGTGT 3'	U
PENK	5' CCGACCGACAACCTTTTAAAT 3'	5' AATTTTGT TTTGGGTCGC 3'	M
	5' CCAACCAACAACCTTTTAAATA 3'	5' GGAATTTGT TTTGGGTTGT 3'	U
CFTR	5' CAAATCCGTATCCTTACCGC 3'	5' TAGGAAGTTTTTCGGGAGTC 3'	M
	5' CCAATCCATATCCTTACCACC 3'	5' GTTTAGGAAGTTTTTTGGGAG 3'	U
HTR1B	5'CGATCGCAAATTTATCCC 3'	5'AGGAATAATTATAGACGCGC 3'	M
	5'AACAATCACAATTTATCCCC 3'	5'GAGAGGAATAATTATAGATGT 3'	U

Como control positivo de la reacción de no metilación se utilizó DNA de linfocitos normales (NL) modificados con bisulfito sódico. Como control positivo de la reacción de metilación se utilizó DNA de linfocitos normales metilados *in vitro* (IVD). Para obtener IVD se partió de 50 µg de DNA genómico de linfocitos normales en un volumen final de 220 µl de agua y se añadieron 25 µl de tampón (*NE buffer 10 X New England Biolabs*), 2,5 µl de SAM 32 mM (S-adenosilmetionina, *New England Methyonine*) y 6,25 µl (25 U) de la metilasa Sssl (Sssl) y se incubó 4 horas a 37 °C. A continuación, se añadieron 5 µl de SAM 32 mM y 3,1 µl de Sssl y se incubó otras 4 horas a 37°C. Una vez terminada la reacción el DNA se purificó siguiendo el protocolo de extracción de DNA explicado anteriormente. El DNA metilado se modificó con bisulfito sódico para su posterior uso en las reacciones de MSP.

4.3. Secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito sódico

Esta técnica nos permite obtener información acerca del estado de metilación de todas las citosinas comprendidas en la secuencia amplificada por los cebadores (239). Estos cebadores no deben contener dinucleótidos CpG, por lo que amplificarán la secuencia de interés independientemente de su estado de metilación (**Figura 10**).

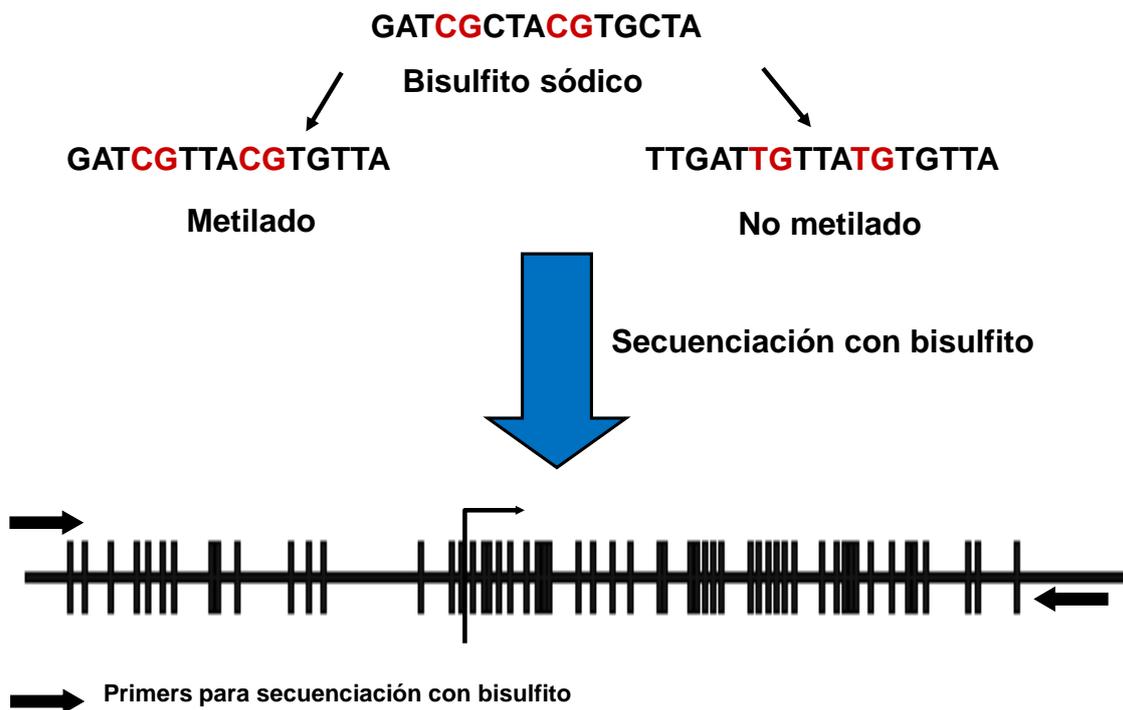


Figura 10. Esquema de la secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito sódico. Las líneas verticales representan CpGs. Las flechas de color negro representan los cebadores diseñados para la PCR.

Tras modificar el DNA con bisulfito sódico, la zona de interés se amplificó mediante una PCR en la que empleamos 1,5 µl de DNA modificado en un volumen final de 25 µl, con los mismos reactivos y concentraciones descritas para la MSP. Los cebadores se

diseñaron mediante el programa *Methyl Primer Express® Software v1.0* de *Applied Biosystems* (Tabla 4). Las condiciones de la PCR fueron:

7 minutos a 95 °C
40 ciclos
30 segundos a 95 °C
30 segundos a X °C (X= temperatura de anillamiento)
30 segundos a 72 °C
7 minutos a 72 °C

Tabla 4. Cebadores usados en la secuenciación genómica

Gen de interés	Cebador Antisentido	Cebador Sentido
Gfi1	5' ATTACTCATTTCCTTCRAAT 3'	5' AGTGTTTGGGTATGATTTTAGG 3'
GSTM2	5' CTACAACACTCCACACTTCCC 3'	5' AGGTGGGAGGAGATTTTATTT 3'
PENK	5' AACAAACAACAACCAATACAAAA 3'	5' TTAGGAAAAGAGTYGGGTGT 3'

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en TBE y el DNA se purificó mediante el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de *GE Healthcare*. A continuación, los fragmentos amplificados se clonaron en el vector *pGEM-TEasy (Promega)* (Figura 11). Para ello se mezclaron 5 µl de *Rapid Ligation Buffer 2X*, 1 µl de DNA ligasa T4, 1 µl de vector (50 ng/ µl) y 3 µl de inserto y se incubaron toda la noche a 4 °C. A continuación, se transfectaron bacterias competentes *Escherichia coli* con el producto de la ligación. Para ello se mezclaron 50 µl de bacterias con el vector durante 20 min a 4 °C. A continuación, se realizó un choque térmico durante 1 min a 42 °C para desestabilizar la membrana bacteriana, y otra vez a 4 °C durante 2 min. Se añadieron 800 µl de LB (*Luria Broth*) y se dejó una hora en agitación a 37 °C. Posteriormente, se sembraron en placas de agar-LB con ampicilina (50 µg/ml), ya que el vector presenta esta resistencia, a las que previamente se les añadieron 60 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y 6 µl de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) que es un inductor de la expresión de LacZ. El sistema X-Gal permite seleccionar los clones positivos para el inserto según el color de las colonias. Las bacterias que contienen el plásmido sin el inserto expresan el gen LacZ transformando el sustrato X-Gal en un compuesto azulado que da color a las colonias mientras que, en las bacterias positivas, la ligación del inserto en el sitio de clonaje (MCS) interrumpe la secuencia del gen LacZ, por lo que se generan colonias blancas. Las bacterias se dejaron crecer entre 16-20 horas a 37 °C, se seleccionaron 10 colonias positivas (blancas) para cada gen/muestra y se crecieron durante toda la noche en 5 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C en agitación a 150 rpm. El DNA plasmídico se extrajo utilizando el Kit *de Qiagen* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez extraído el DNA plasmídico, el estado de metilación de los distintos promotores se determinó mediante secuenciación, utilizando los cebadores para T7 Y

SP6 contenidos en el vector. La secuenciación automática se llevó a cabo en el Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá y las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

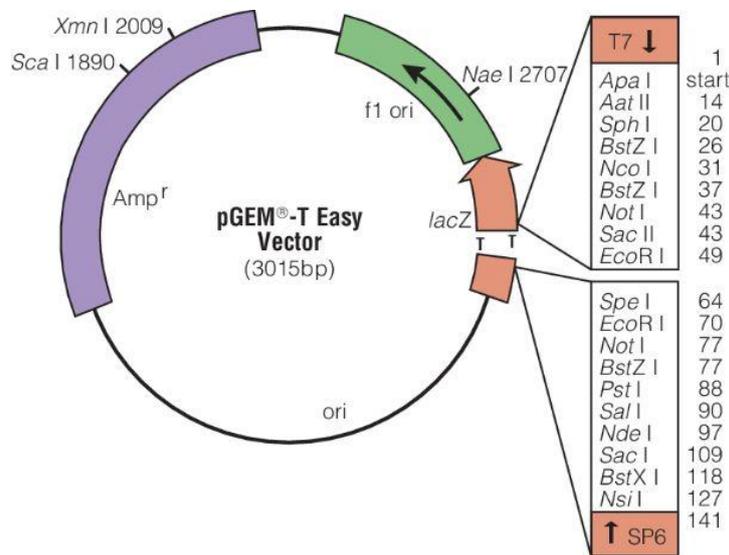


Figura 11. Mapa del vector pGEM-TEasy (Promega)

4.4. Sequenom EpiTyper

Este ensayo permite cuantificar la metilación de varias CpGs de la región promotora de genes sin comprometer la precisión, sensibilidad o reproducibilidad. Se realizó en el Servicio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valencia siguiendo los protocolos estándar (240). Se basa en la conversión del DNA mediante bisulfito sódico seguido de una PCR y de un proceso de escisión específico de base. El patrón resultante depende de la presencia o no de citosinas metiladas en el DNA genómico original. Los productos de escisión son analizados por espectrometría de masas *MALDI-TOF* de forma cuantitativa y automática.

4.5. Array de metilación

Para analizar el perfil de metilación del DNA en tumores de próstata se utilizó el array de metilación *GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina)* (Figura 12).

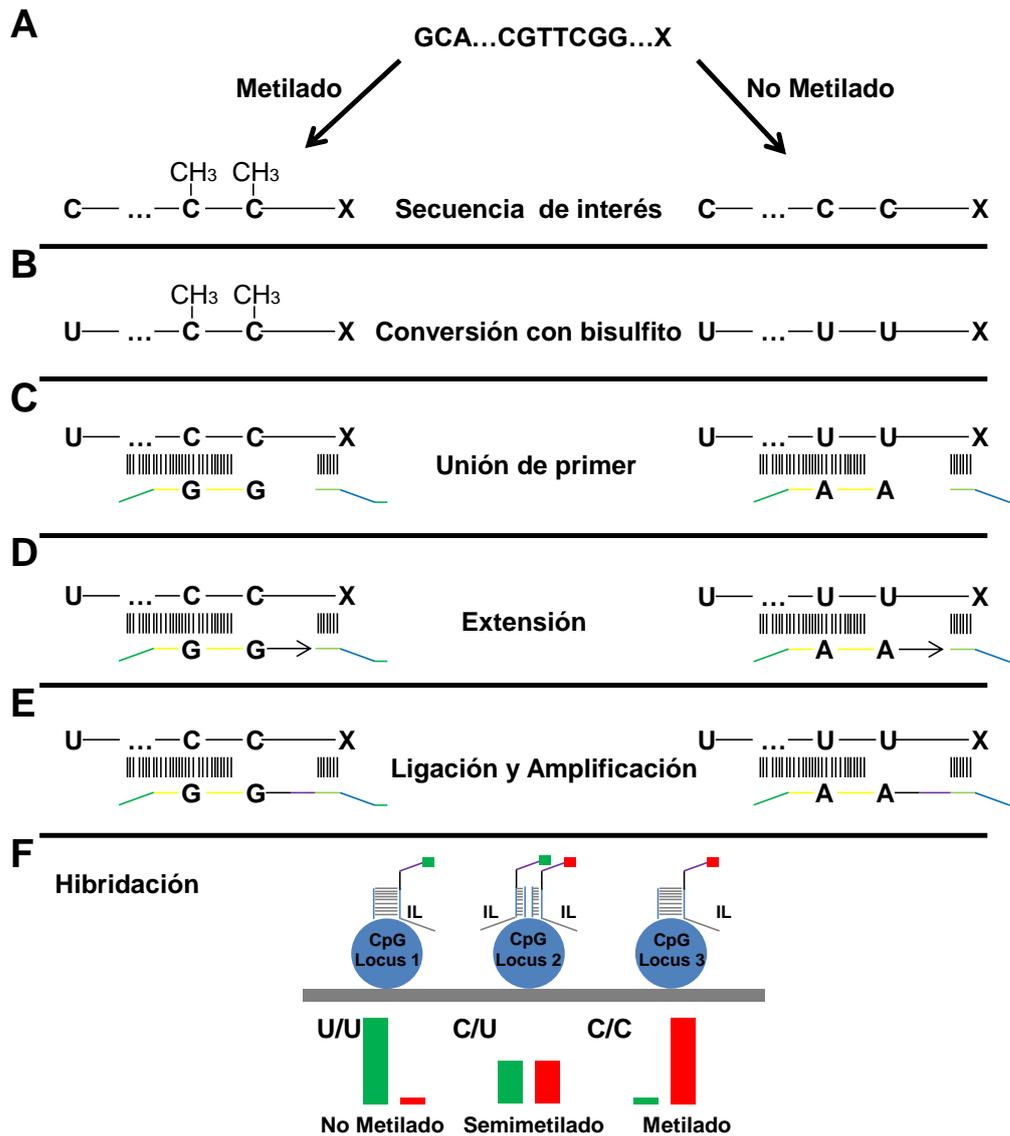


Figura 12. Array de metilación *GoldenGate Methylation*. (A) Muestra sólo la secuencia 5' → 3' del fragmento de interés. Si existen otros sitios CpG en las cercanías del sitio CpG diana se supone que tienen el mismo estado de metilación del sitio de interés. (B) A través de un paso de conversión con bisulfito sódico las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas. (C) Para cada sitio CpG se diseñan dos pares de sondas: un oligo específico de alelo (ASO en amarillo) y un oligo específico del locus (LSO en verde claro) para el sitio CpG metilado y un correspondiente par ASO-LSO para el sitio CpG no metilado. Los oligos hibridan con la secuencia diana. Todos los loci se realizan simultáneamente. (D) La extensión se produce desde el ASO hacia el LSO. (E) La ligación (púrpura) de la ASO a LSO crea moldes de PCR. Los productos ligados se amplifican por PCR usando cebadores marcados con fluoróforos comunes y se hibridó a una matriz que lleva las secuencias de dirección complementaria a los moldes. (F) El código ilumina (IL, azul) contenido en la LSO hibrida con una secuencia complementaria en la matriz. Se utilizan dos fluoróforos para distinguir entre el loci metilado y no metilado. El locus 1 muestra un sitio no metilado, el locus 2 semimetilado y el locus 3 metilado (adaptado de *Illumina*).

Esta plataforma permite analizar el estado de metilación de 1505 CpGs presentes en la región promotora de 807 genes entre los que se incluyen oncogenes, genes supresores

de tumores, genes implicados en reparación del DNA, control del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. Las combinaciones posibles entre cuatro sondas, dos específicas de alelo y dos específicas de locus para cada sitio CpG, permite diferenciar el estado metilado (M) o no metilado (U) de las CpGs analizadas.

El valor de metilación (β) es una ratio que comprende a la señal de fluorescencia del locus metilado con respecto la suma de las señales del locus metilado y del no metilado:

$$\beta = \text{Max}(M,0) / (\text{Max}(U,0) + \text{Max}(M,0)) \times 100$$

Por tanto, el valor β es una medida cuantitativa del estado de metilación de cada sitio CpG y sus valores oscilan entre 0 (nada metilado) y 1 (totalmente metilado). El programa *Genome Studio (Illumina)* permite calcular estos valores y revisar los controles internos del proceso de hibridación.

Antes de la realización del análisis estadístico de los datos proporcionados por el array, se procedió a un filtrado de posibles variabilidades debidas al procedimiento. Se emplearon controles para su normalización y se compararon los valores de intensidades detectadas frente al umbral de detección, excluyendo las sondas con un valor de $p > 0,01$ en más del 10% de las muestras.

5. Análisis de expresión génica

5.1. Extracción de RNA

El RNA de las líneas celulares se extrajo empleando Trizol (*Invitrogen*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el RNA se resuspendió en agua DEPC (dietilpirocarbonato 0,1%, *Ambion*), se determinó su concentración en un espectrofotómetro (*NanoDrop*) a una longitud de onda de 260 nm y se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y qRT-PCR

Para determinar los niveles de mRNA de los genes de interés se usó RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa (qRT-PCR). Para la obtención del cDNA, el RNA se retrotranscribió utilizando el kit *Superscript[™] III (Invitrogen)* partiendo de 4 μg de RNA y siguiendo el protocolo del fabricante.

5.2.1. Análisis de la expresión génica por RT-PCR

En este caso el cDNA se amplificó mediante PCR utilizando unos cebadores específicos para los genes de interés y para la gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se utilizó como control endógeno. Las reacciones de PCR se realizaron en un

volumen final de 25 µl que contenían 1 µl de cDNA, tampón 1x (*Ecogen*), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM oligonucleótidos y Taq polimerasa (*Ecogen*). Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% en TBE (0,089 M Ácido Bórico y mM pH 8 EDTA 1). Los cebadores se diseñaron sobre exones consecutivos con el fin de diferenciar la amplificación del DNA genómico (**Tabla 5**). Las condiciones de la PCR fueron:

7 minutos a 95 °C
35 ciclos
30 segundos a 95 °C
30 segundos a X °C (X= temperatura de anillamiento)
30 segundos a 72 °C
7 minutos a 72 °C

Tabla 5. Cebadores utilizados en el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y qRT-PCR

Gen de interés	Cebador Antisentido	Cebador Sentido
Gfi1	5' CACACGGTCCGGTAGCTCTG 3'	5' CGGAGTTTGAGGACTTCTGG 3'
GSTM2	5' AATGTCTTCGCGAATCTGCT 3'	5' TTCCAATCTGCCCTACTTG 3'
PENK	5' CTTCTGGCTCCATGGGATAA 3'	5' GCTGTCCAAACCAGAGCTTC 3'
AAT	5' TACCCAGCTGGACAGCTTCTTAC 3'	5' GCCAAGAAACAGATCAACGATTA 3'
ACT	5' TCTTGATCAGGGAGGATGAAGAG 3'	5' ATGGAAGTGGGGGAAAAATCACA 3'
Neurog 3	5' CTATTCTTTTGCGCCGGTAG 3'	5' CTTCGTCTCCGAGGCTC T 3'
GAPDH	5' GGCAGAGATGATGACCCTTTT 3'	5' TCCACTGGCGTCTTCACC 3'

5.2.2. Análisis de la expresión génica por qRT-PCR

El cDNA utilizado para estos experimentos se obtuvo como se describió en el apartado anterior. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, que incluía entre 1 y 2 µl del cDNA previamente diluido 1:10, los cebadores específicos para cada gen (**Tabla 5**) y 2x *SYBER Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). Para la interpretación de los valores se realizó una curva de calibrado para cada uno de los genes de interés. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo de PCR cuantitativa a tiempo real *7500 Fast* (*Applied Biosystems*). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

10 minutos a 95 °C
40 ciclos
30 segundos a 95 °C
30 segundos a 61 °C
30 segundos a 72 °C
10 minutos a 72 °C

Para cuantificar de forma relativa la expresión de los genes de interés se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizando los datos en cada caso respecto al gen de expresión constitutiva GAPDH.

6. Análisis de la expresión proteica

6.1. Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de los extractos proteicos las células se lisaron con tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet NP40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS) al que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Una vez resuspendidas, las muestras se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 13000 rpm, 20 min a 4° C. Se recogió el sobrenadante que contenía el extracto proteico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford utilizando el *Bio-Rad Protein Assay Kit* (BioRad). Las muestras se conservaron a -80° C hasta su utilización.

6.2. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*.

En primer lugar, los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE) a 150 V, en presencia de tampón 25 mM Tris pH 8,3, 190 mM glicina y 0,1% SDS. Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga (0,25 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0,5 β -mercaptoetanol, 20% glicerol y azul de bromofenol) e hirviéndolas 5 min a 96 °C. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia en húmedo durante 75 min a 400 mA en un tampón que contenía 25 mM Tris pH 8.3, 190 mM glicina, 0,01% SDS y 20% de metanol. Al finalizar la transferencia, la membrana se tiñó con el colorante Rojo *Ponceau* (0,5% Rojo *Ponceau*, 5% ácido acético) para comprobar que las proteínas se habían transferido correctamente.

Una vez transferidas las proteínas y con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía TTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20) y 5% de leche desnatada. La inmunodetección se llevó a cabo incubando la membrana toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TTBS y las membranas se incubaron una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TTBS con 1% de leche. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 min con TTBS y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia en películas fotográficas de alta resolución.

7. Ensayos funcionales in vitro

7.1. Transfección con vector de expresión

El primer paso fue clonar el cDNA que codifica para Gfi1 en el vector de expresión pCMVTag 3B que contiene el gen de resistencia a Kanamicina para su posterior selección en bacterias competentes. Para ello, en primer lugar se amplificó la región codificante del transcrito empleando cebadores específicos y usando como molde el cDNA de la línea de fibroblastos normales embrionarios MRC5. El cebador directo contiene el fragmento Kozak y ambos cebadores contienen una cola con 8 bases de adeninas para el correcto posicionamiento de las enzimas de restricción y sus dianas. Para la amplificación se utilizó una polimerasa de alta eficiencia, la *Phusion enzyme* (FINNZYME) siguiendo las siguientes condiciones:

30 segundos a 98 °C

30 ciclos

5 segundos a 98 °C

8 segundos a 59 °C

30 segundos a 72 °C

2 minutos a 72 °C

El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % en TBE a 100 V. La banda correspondiente al tamaño se cortó y se purificó el DNA. De acuerdo con el sitio de clonaje múltiple (MCS) del vector pCMVTag 3B, las enzimas de restricción para llevar a cabo el clonaje fueron EcoRI (*New England Biolabs*) (directa) y HindIII (*New England Biolabs*) (inversa) garantizando la correcta orientación del inserto. Ambas enzimas requieren el mismo tampón de reacción por lo que el plásmido se cortó en una reacción que requirió las siguientes condiciones:

- 6 µg de plásmido
- 1 µl de la enzima 1 (HindIII)
- 1 µl de la enzima 2 (EcoRI)
- 2 µl de buffer

La digestión se realizó a 37°C durante 2h.

Para la digestión del inserto se utilizó el producto de la PCR purificado, las mismas enzimas de restricción y las mismas condiciones.

La ligación del vector cortado y el inserto se llevó a cabo durante toda la noche 4°C con la enzima T4 ligasa (400.000 U/ µl, *New England Biolabs*).

A continuación, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* con el producto de ligación siguiendo el protocolo ya mencionado, y se sembraron en placas de agar con kanamicina de forma que únicamente crezcan aquellas bacterias que hayan incorporado el vector.

Para comprobar que el clonaje se había producido correctamente y seleccionar los clones que no contenían errores se establecieron tres puntos de control:

1. PCR directa de las colonias, empleando el cebador directo del promotor del vector y un cebador inverso interno. Para ello, las colonias se resuspendieron en 50 μ l de PBS y se usaron 1,5 μ l para la PCR. De esta forma se asegura que el inserto se haya ligado con el vector y de que lo haya hecho en el sentido correcto. Aquellas colonias que resultaron positivas se expandieron en cultivo en SOC a 37 °C durante toda la noche y al día siguiente se aisló el plásmido mediante minipreps.
2. Mapa de restricción. El DNA extraído de las minipreps se digirió con las enzimas que se utilizaron en el clonaje y se separó el producto por electroforesis en un gel de agarosa. La obtención de las bandas en los tamaños esperados confirmó el correcto desarrollo del protocolo. A continuación, se hicieron maxipreps empleando el *Plasmid Maxi kit (QIAGEN)*, siguiendo las indicaciones del fabricante y se purificó el vector de expresión. El vector vacío se purificó siguiendo los mismos pasos para utilizarlo como control.
3. Secuenciación del inserto. Para comprobar la fidelidad de la amplificación del cDNA se diseñaron cebadores internos que permitieron la secuenciación de fragmentos de 400 pb consecutivos y solapantes, desde el principio al final del inserto, descartando así la presencia de mutaciones u otras alteraciones en su secuencia.

7.1.1. Electroporación

Se electroporó una suspensión de 10 millones de células con 40 μ g del vector correspondiente. Este proceso se llevó a cabo en un electroporador bajo unas condiciones de 250 V y 975 μ F. Posteriormente las células electroporadas se sembraron en placas con medio de cultivo suplementado de la forma anteriormente descrita al que se añadió el antibiótico Geneticina como medio de selección del vector de expresión pCMV en células eucariotas. La eficiencia de la transfección se determinó mediante qRT-PCR y *Western blot*.

7.2. Ensayos de viabilidad celular

Para estos experimentos se sembraron 500 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se determinó la viabilidad celular a los 15 días mediante un ensayo con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol). El MTT es una sal que es transformada por las oxido-reductasas mitocondriales a un compuesto denominado formazán que absorbe a 595 nm, por lo que la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia a esta longitud de onda. El MTT se añadió a una concentración de 0,5 mg/ml y se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 3 horas. Posteriormente se retiró el medio, se añadieron 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán, producto de la reacción, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm.

7.3. Ensayos de formación de colonias

Estos ensayos se realizaron para comparar la capacidad tumorigénica de las células que no expresan Gfi1 frente a las que se ha inducido su expresión. Para ello, las células se sembraron a una densidad de 1.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en medio de selección durante 15 días. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con 10% ácido tricloroacético (TCA) durante 15 min a temperatura ambiente, se tiñeron con una solución compuesta por 0,5% cristal violeta en 25% de metanol durante 1 hora a temperatura ambiente, y finalmente, se fotografiaron. Los experimentos compararon en paralelo la capacidad tumorigénica de las células transfectadas con el vector de expresión de Gfi1 frente a las mismas células transfectadas con el vector vacío.

7.4. Ensayos de Migración en cámaras *transwells*

Las cámaras *transwell* constan de dos compartimentos: uno superior (inserto) cuya base es una membrana de policarbonato con poros de 8 µm que se recubrió con fibronectina (SIGMA) para favorecer la adhesión celular y la activación de los mecanismos responsables de la motilidad celular; y otro inferior, donde se añadió el medio correspondiente con 10% de FBS. El día antes del ensayo los *transwell* se recubrieron con 50 µl fibronectina a una concentración final de 0,1 mg/ml en ácido acético 0,1 N y se incubaron a 37 °C sin humedad durante 24h.

A continuación, las células se resuspendieron en 2 ml de medio sin suero y se contaron. En el compartimento superior se añadieron 200 µl de la suspensión celular que contenía 40000 células y en el inferior se añadieron 600 µl de medio completo como factor quimioatrayente. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se tiñeron con una solución compuesta por 0,5% cristal violeta en 25% de metanol durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células de la cara superior, que no atravesaron la membrana, se

eliminaron con un bastoncillo de algodón, mientras que las células de la cara inferior, que migraron, se fotografiaron (al menos 3 campos) para proceder a su cuantificación (**Figura 13**).

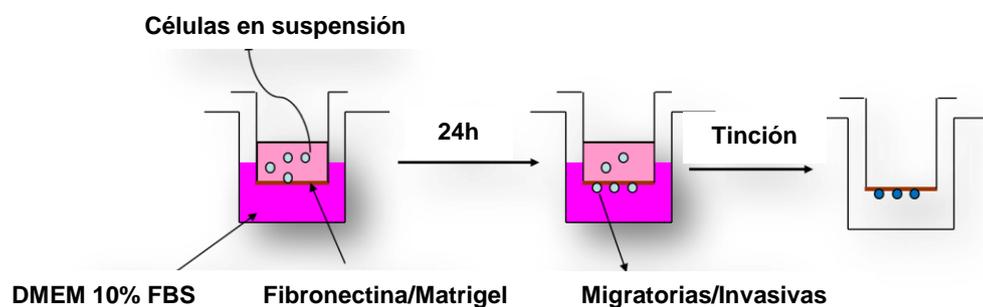


Figura 13. Ensayos de migración e invasión. Representación de las cámaras *transwell* tratadas con fibronectina para los ensayos de migración y las cámaras con *matrigel* en el caso de los ensayos de invasión. A las 24 h de incubación las células que atravesaron el inserto se tiñeron con cristal violeta, se fotografiaron y se cuantificaron.

7.5. Ensayos de Invasión

Para este tipo de ensayos se utilizaron cámaras similares a las descritas en el apartado anterior, pero con la diferencia de que la membrana está formada por una matriz artificial fabricada con componentes similares a los de la matriz extracelular (*Matrigel*). Antes del ensayo, las cámaras se atemperaron añadiendo el medio correspondiente libre de suero e incubándolos a 37°C durante al menos 1 hora antes de añadir las células.

En el compartimento superior se añadieron 200 µl de la suspensión celular que contenía 40000 células y en el inferior se añadieron 600 µl de medio completo como factor quimioatrayente. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas. A continuación, las células se fijaron y se tiñeron siguiendo el protocolo descrito en los ensayos de migración (**Figura 13**). Las células de la cara superior, que no atravesaron la membrana, se eliminaron con un bastoncillo de algodón mientras que las células de la cara inferior, que migraron, se fotografiaron (al menos 3 campos) para su cuantificación.

7.6. Ensayo de incorporación de [³H]-timidina

Para estos ensayos se sembraron 150000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y transcurridas 24 horas para permitir su adhesión, se sincronizaron mediante la incubación con medio sin suero durante 48 horas. A continuación, se indujo la proliferación durante 12 horas por la adición de medio completo y se determinó la incorporación de [³H]-timidina. Para ello se sustituyó el medio de cultivo por otro que

además contenía [³H]-timidina a una concentración de 0,4 µCi/ml y se incubó en condiciones normales de crecimiento durante 4 horas. A continuación, se retiró el medio, se lavó tres veces con PBS y se incubó con 1 ml de TCA (tricloroacético) al 5 % durante 15 min a 4 °C. Tras este período se retiró el TCA, se lavó tres veces con metanol y se dejó secar al aire. Posteriormente, las muestras se resuspendieron con 0,5 ml de una mezcla de NaOH 0,1 M y SDS al 1%, se transfirieron a un vial de centelleo, se añadieron 2,25 ml de *Optiphase Hisafe 3* y se midieron las desintegraciones por minuto (d.p.m.) en un contador de centelleo líquido tipo β (*Guardian 1414 de Wallac, Turku, Finland*). Los resultados se expresaron como porcentaje de incorporación de [³H]-timidina respecto al control.

8. Determinación del crecimiento tumoral in vivo

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos *in vitro*, se llevaron a cabo experimentos en ratones atómicos nu/nu. En la determinación del crecimiento tumoral en los modelos de CP y mama se utilizaron 7 machos y 7 hembras, respectivamente, de 6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones del animalario de la Universidad de Alcalá. Los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo a los criterios del comité ético. Se inyectaron subcutáneamente 6×10^6 células en ambos flancos de cada animal en un volumen total de 50 µl de PBS. En el flanco derecho se inyectaron las células transfectadas con el vector de expresión para Gfi1 (MDA-MB-231-Gfi1 o PC3-Gfi1) y en el izquierdo las células transfectadas con el vector de expresión vacío (MDA-MB-231-Mock o PC3-Mock) utilizadas como control. El desarrollo del tumor fue medido 2 veces por semana. Los ratones se sacrificaron a los 37 días. Los tumores se separaron, pesaron y fotografiaron.

9. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en el Dto. de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá por la Dra. M. Val Toledo Lobo. Las muestras de tejido embebidas en parafina se cortaron para obtener secciones de 5 µm de espesor y fueron tratadas con xileno y rehidratadas en una serie de lavados graduales con etanol para la recuperación del tejido. La recuperación del antígeno se llevó a cabo con un tampón citrato 10 mM durante 3 min. La fluorescencia endógena se inactivó mediante incubación con borohidruro de sodio 4% en una solución salina tamponada con Tris pH 7,6. Para evitar reacciones inmunes no específicas se incubaron previamente en una solución de bloqueo (3% de suero normal de burro, 0,05% de Triton X-100 en solución salina amortiguadora Tris, pH 7,5). Para la detección de GSTM2 y PENK se utilizaron anticuerpos específicos diluidos en la solución de bloqueo (ANTI-GSTM2, *Abnova*; ANTI-PENK, *Sigma-Aldrich*). Después del lavado, las muestras se incubaron durante 5 min con un anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa (*Mas Vision*,

Master Diagnostica, España) y se reveló usando como sustrato 3'-diaminobencidina. Para la tinción de los núcleos se utilizó hematoxilina de Caracci. Para la preparación de los controles negativos las muestras se incubaron con suero de conejo no inmune en lugar de anticuerpos primarios. Las secciones se cubrieron con un medio de montaje permanente (*Entellan, Merck*). La inmunohistoquímica se clasificó en cuatro categorías basadas en el patrón de tinción de la mayoría de las células tumorales presentes en la sección (0: negativo; 1: débilmente positivas; 2-3: moderadamente positiva, y 4: altamente positivo).

10. Análisis bioestadístico

Las secuencias de DNA y RNA en formato FASTA se obtuvieron de la página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

En el procesamiento de los datos de las funciones biológicas se han utilizado los programas *Microsoft Office Excel* y *GraphPadPrism5*. Para la comparación de medias entre muestras independientes se utilizó el test de t-Student (estadística paramétrica). El análisis de supervivencia fue realizado mediante el método de Kaplan-Meier.

El análisis bioestadístico de los datos del array de metilación se realizó con el programa *Genome Studio (V21010.3, Illumina)* y con el programa *Microsoft Office Excel*. Para la determinación de diferencias significativas se utilizaron los test de U de Mann-Whitney para variables continuas y el de contingencia Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

RESULTADOS

1. Análisis del perfil de metilación en pacientes con cáncer de próstata

Como ya hemos descrito, la metilación del DNA es la modificación epigenética mejor conocida y de la que más se ha estudiado su papel en la regulación de la expresión génica. Los cambios en el perfil de metilación característico de cada tipo celular están asociados al desarrollo de un gran número de patologías entre ellas el cáncer, lo que ha permitido determinar el patrón de metilación asociado a cada tipo tumoral. Estos hallazgos han permitido, por un lado, aproximarnos al conocimiento de los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de este grupo de patologías, y por otro, su uso en la clínica como biomarcadores.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue identificar el perfil de metilación específico de CP que además de ayudarnos a entender mejor cómo se desarrolla esta patología, pudiese ser utilizado para seleccionar un grupo de genes para ser utilizados como marcadores para el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad. Con este fin, hemos determinado el perfil de metilación de 83 muestras de tumores de próstata, 10 de tejido prostático normal y las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145. Las características de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 2, y están representados de forma equilibrada enfermedad localizada, enfermedad localmente avanzada y enfermedad diseminada.

Para analizar el perfil de metilación hemos utilizado un array de metilación de *Illumina* (*GoldenGate Methylation Panel I*) que nos ha permitido determinar el estado de metilación de 1505 CpGs presentes en la región promotora (-1500 y +800 bases en torno al inicio de transcripción) de 807 genes entre los que se incluyen oncogenes, genes supresores de tumores, genes implicados en la reparación del DNA, control del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. De todas las CpGs analizadas el 69% (n=1044) se localizan en islas CpG canónicas y el 31% restante (n=461) no.

El análisis que se representa en la figura 14 muestra, en primer lugar, que el perfil de metilación de los tejidos normales difiere del de las muestras de pacientes con CP. En segundo lugar, el perfil de metilación de las muestras tumorales es heterogéneo, mostrando en algunos casos similitudes con las muestras de tejido normal mientras que en otros casos exhiben grandes diferencias, lo que podría ser un reflejo de la diversidad clinicopatológica de las muestras incluidas en el estudio. También encontramos un grupo aislado de tejidos normales que comparten un patrón de metilación muy similar con algunas muestras tumorales, que podría ser debido a que estas muestras representan estadios muy tempranos en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, cuando analizamos las características clinicopatológicas de estos pacientes encontramos que estos eran muy heterogéneos por lo que no cabría esta explicación.

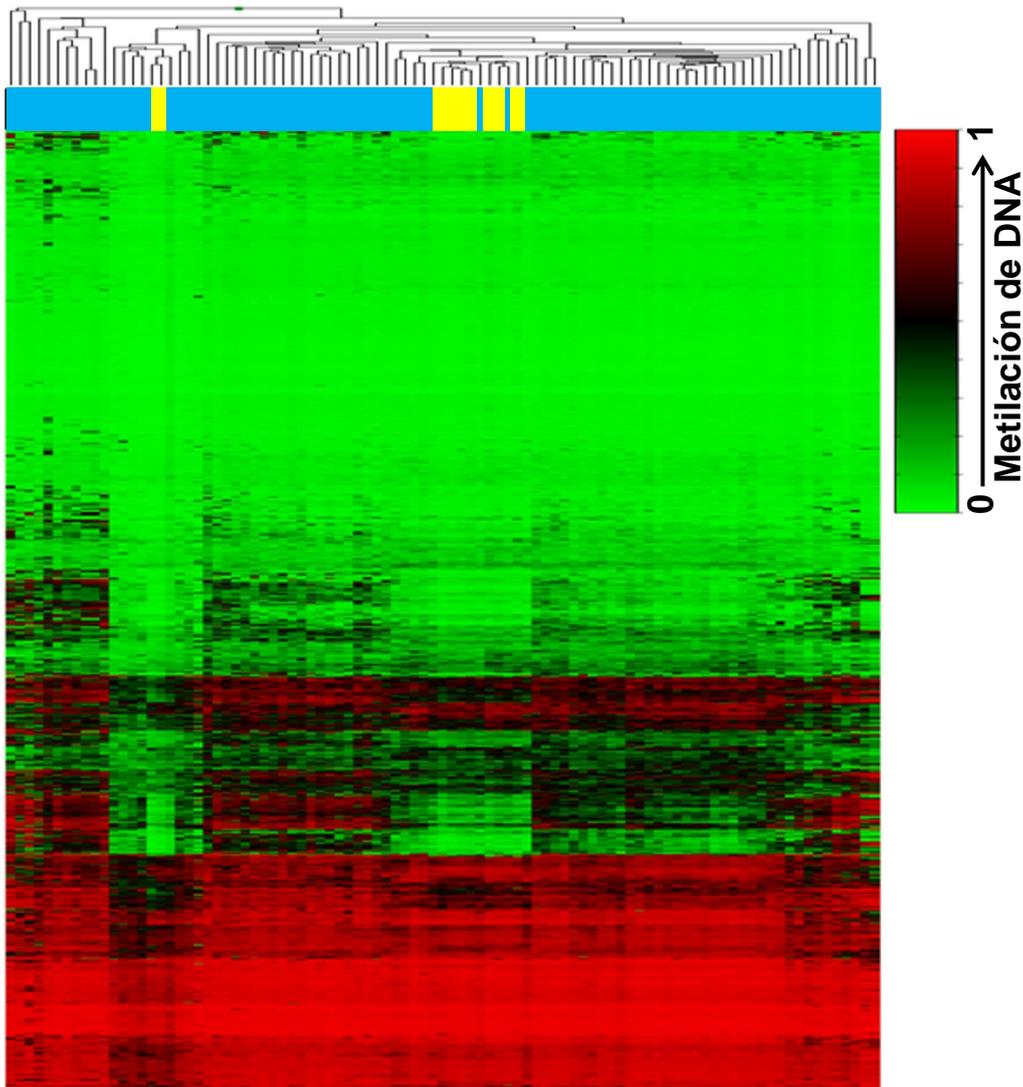


Figura 14. Análisis jerárquico no supervisado de los perfiles de metilación del DNA. Análisis de los perfiles de metilación de los 1505 sitios CpG en 83 muestras de CP (azul) y 10 tejidos de próstata normal (amarillo).

Como ya describimos en el apartado de materiales y métodos, el análisis de los datos obtenidos en el array nos proporciona un valor de metilación (β) comprendido entre 0 y 1, donde 0 es no metilado y 1 corresponde al valor máximo de metilación. El criterio que aplicamos para la selección de sondas metiladas en tumores de próstata fue seleccionar aquellas cuyo valor de β fuese $<0,2$ en los tejidos normales y $>0,6$ en los tumores. Siguiendo este criterio, encontramos 273 sondas que estaban hipermetiladas en al menos una muestra tumoral. De estas, seleccionamos 49 que se corresponden con 41 genes, por estar significativamente ($p < 0,01$) hipermetiladas en más del 20% ($n=17$) de los tumores analizados (**Tabla 6**). Entre estos genes encontramos algunos cuya metilación ya se ha descrito en CP como son GSTP1, RAR β 2, APC, SCGB3A1, RASSF1, CDH13, CAV1 y MDR1, lo que nos indica que este método es una buena herramienta para la búsqueda de nuevos genes hipermetilados en cáncer. Pero también hemos identificado genes cuya metilación aún no se ha descrito en CP como

es el caso de GSTM2, PENK y Gfi1 que se encuentran metilados en el 85,5% (n=71), 42,1% (n=35) y 37,3% (n=31) de los casos, respectivamente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Genes hipermetilados en más del 20% de los tumores de próstata

Sondas	Genes	Nombre	%	Valor p
GSTM2_E153_F	GSTM2	glutathione S-transferase mu 2	85.54	1.53E-06
GSTP1_E322_R	GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	63.86	2.19E-06
RARB_P60_F	RARB	retinoic acid receptor, beta	61.45	2.97E-06
ALOX12_E85_R	ALOX12	arachidonate 12-lipoxygenase	59.04	1.25E-05
APC_P14_F	APC	adenomatous polyposis coli	56.63	2.02E-05
PDGFRB_P273_	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta	54.22	4.66E-06
SCGB3A1_E55_	SCGB3A1	secretoglobin, family 3A, member 1	49.40	2.82E-06
CFTR_P372_R	CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	46.99	1.31E-05
MT1A_E13_R	MT1A	metallothionein 1A	43.37	1.03E-05
PENK_E26_F	PENK	Proenkephalin	42.17	5.69E-06
TERT_P360_R	TERT	telomerase reverse transcriptase	42.17	4.22E-06
CCNA1_E7_F	CCNA1	cyclin A1	40.96	3.09E-05
RARA_P176_R	RARA	retinoic acid receptor, alpha	40.96	2.82E-06
TAL1_P594_F	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	40.96	1.37E-05
ERG_E28_F	ERG	v-ets avian erythroblastosis virus e26 oncogene homolog	38.55	2.56E-05
MET_E333_F	MET	met protooncogene	38.55	5.16E-05
GFI1_E136_F	GFI1	growth factor independent 1 transcription repressor	37.35	4.90E-06
MYCL2_P19_F	MYCL2	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 2	37.35	1.59E-05
SEPT9_P374_F	sep-09	septin 9	37.35	4.29E-05
COL18A1_P494	COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	36.14	4.66E-06
KLK10_P268_R	KLK10	kallikrein-related peptidase 10	36.14	2.33E-05
MFAP4_P10_R	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	36.14	3.82E-06
MMP14_P13_F	MMP14	matrix metalloproteinase 14	36.14	1.92E-05
TBX1_P885_R	TBX1	T-box 1	36.14	3.73E-05
EYA4_E277_F	EYA4	eyes absent homolog 4	34.94	5.10E-04
NEU1_P745_F	NEU1	sialidase 1	34.94	8.94E-05
POMC_P400_R	POMC	Proopiomelanocortin	34.94	1.12E-04
GADD45A_P737	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	31.33	3.09E-05
HTR1B_P222_F	HTR1B	5-hydroxytryptamine	28.92	1.44E-05
RASSF1_E116_	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	27.71	4.01E-06
CDH13_P88_F	CDH13	cadherin 13, H-cadherin	26.51	7.80E-05
PDGFRA_P1429	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	26.51	7.12E-05
IRAK3_P185_F	IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	25.30	1.44E-05
ASCL2_P360_F	ASCL2	achaete-scute complex homolog 2	24.10	1.25E-03
ESR1_P151_R	ESR1	estrogen receptor 1	22.89	6.03E-04
HFE_E273_R	HFE	Hemochromatosis	22.89	2.56E-05
IGFBP7_P297_	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	22.89	5.15E-06
RARRES1_P426	RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	22.89	5.15E-06
CAV1_P130_R	CAV1	caveolin 1	21.69	2.44E-05
THY1_P149_R	THY1	Thy-1 cell surface antigen	21.69	1.02E-04
BMP4_P123_R	BMP4	bone morphogenetic protein 4	20.48	1.65E-03

Por otro lado, la hipometilación de oncogenes y genes imprintados es otra de las alteraciones epigenéticas asociadas al desarrollo de diferentes tipos de tumores, por lo que nos resultó interesante la búsqueda e identificación de genes que presentasen una pérdida de metilación en las muestras tumorales. Para ello seleccionamos aquellas sondas metiladas en las muestras de tejido normal $\beta > 0.8$ y con un $\beta < 0.4$ en las muestras tumorales. En este caso, encontramos 44 sondas que estaban hipometiladas en al menos 1 muestra tumoral y en solo 5 de ellas había pérdida de metilación en más del 5% de las muestras analizadas. En concreto, el más frecuentemente hipometilado fue el gen PGR, que codifica para el receptor de progesterona, que está hipometilado en el 9,6% (n=8) de las muestras analizadas. Dado que estos datos no eran significativos parecía poco probable que la pérdida de metilación de estos genes pueda tener un papel relevante en el desarrollo del CP por lo que decidimos continuar solo con el estudio de los genes hipermetilados.

Una vez definido el perfil de metilación, seleccionamos los genes GSTM2 (Glutation S-transferasa de clase mu), PENK (Proencefalina) y Gfi1 (*Growth factor Independence 1*) para su posterior estudio ya que su hipermetilacion no ha sido descrita hasta el momento en ningún tipo tumoral, están metilados en un alto porcentaje de los tumores (**Figura 15**) y por la relevancia que podría tener su pérdida de expresión por metilación en el desarrollo de esta patología.

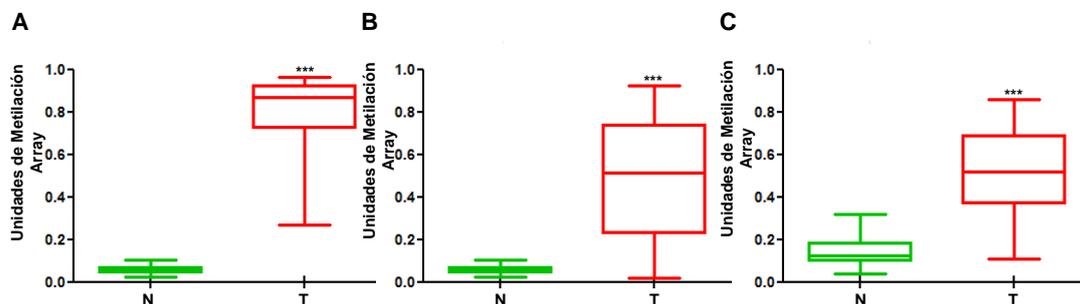


Figura 15. Representación de los valores de metilación del array para los genes GSTM2 (A), PENK (B) y Gfi1 (C) en las muestras de tejido normal (N) y CP (T). GSTM2, PENK y Gfi1 se encuentran diferencialmente metilados y de forma significativa en las muestras tumorales respecto a las muestras control. *** $p < 0,0001$

Aunque el estudio de los genes GSTM2, PENK y Gfi1 se ha realizado de modo simultáneo a lo largo del desarrollo de esta tesis, hemos dividido este trabajo en dos partes: por un lado la selección de genes implicados en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad y por otro lado, el estudio de la relevancia funcional de la pérdida de expresión por metilación de Gfi1 (**Figura 16**).

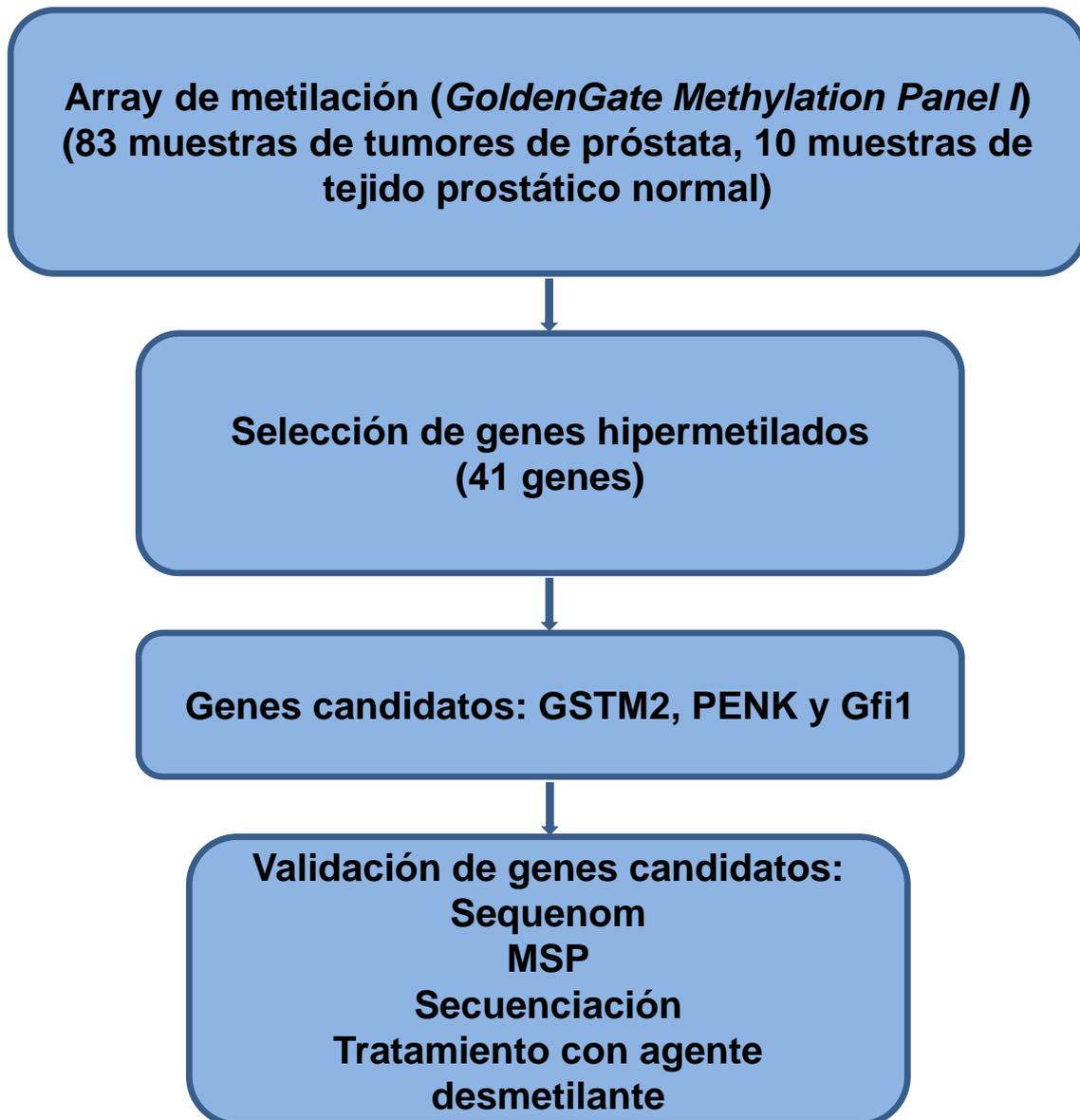


Figura 16. Esquema del procedimiento de selección y estudio de genes hipermetilados en CP.

2. Identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata

Una vez seleccionados los genes candidatos, el primer paso fue validar los datos obtenidos en el array. Para ello seleccionamos GSTM2 y PENK en primer lugar porque su metilación simultánea se da en el 40,9% de las muestras analizadas, y hasta el momento no se ha encontrado su metilación en CP por lo que la determinación conjunta de su metilación podría tener un papel relevante en el diagnóstico de esta patología. Además, la pérdida de función por metilación de estos dos genes podría jugar un papel importante en el desarrollo del CP. GSTM2 codifica para la glutatión S-transferasa de clase mu, una enzima implicada en los procesos de detoxificación por conjugación con glutatión de compuestos electrofílicos incluidos carcinógenos, drogas

terapéuticas, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo (241), mientras que PENK codifica para una proencefalina que está implicada en numerosas funciones como la percepción del dolor, la respuesta al estrés y en la inducción de la apoptosis mediada por p53 (242).

2.1. Validación de los datos de metilación de GSTM2 y PENK

En primer lugar, y para confirmar los datos obtenidos en el array, analizamos la metilación de GSTM2 y PENK mediante la técnica denominada Sequenom que nos permitió cuantificar la metilación de varias CpGs de la región promotora de estos dos genes que además incluía la CpG analizada en el array. Como muestra la figura 17, tanto para GSTM2 como para PENK, los valores de metilación obtenidos mediante esta técnica corroboran que los tumores de próstata presentan unos niveles de metilación significativamente más elevados que las muestras de tejido normal.

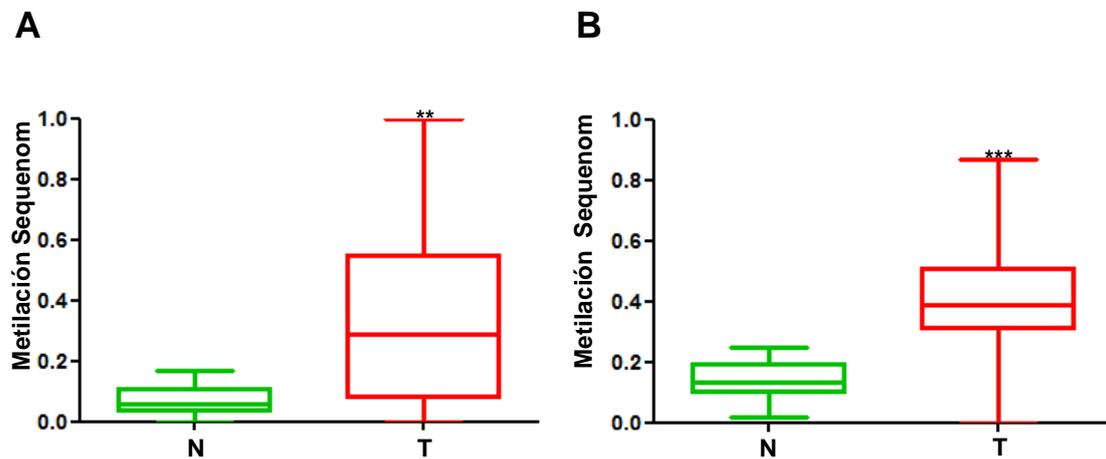


Figura 17. Valores de metilación de la CpG incluida en el array de metilación y analizada mediante la técnica Sequenom EpiTYPER para los genes GSTM2 (A) y PENK (B). Las figuras muestran como en ambos casos existen diferencias significativas en los valores de metilación de la CpG analizada entre las muestras de tejido normal (N) y las muestras tumorales (T). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

Aunque los valores de metilación obtenidos mediante esta técnica fueron inferiores a los del array, observamos una elevada correlación entre los valores obtenidos con el array y mediante Sequenom tanto para GSTM2 ($R=0,4917$, $p < 0,0001$) (**Figura 18A**) como para PENK ($R=0,6318$, $p < 0,0001$) (**Figura 18B**).

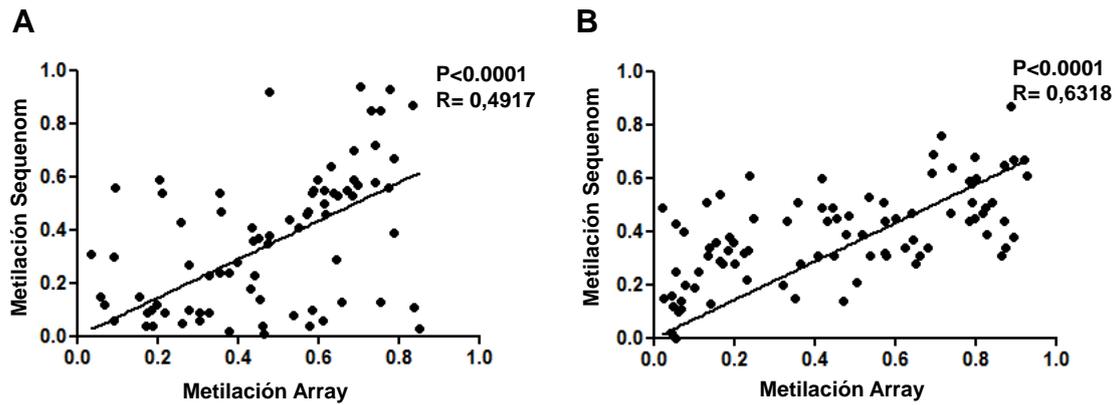


Figura 18. Correlación entre los valores de metilación obtenidos con el array de metilación y mediante Sequenom EpiTYPER de los genes GSTM2 (A) y PENK (B) en muestras de tejido prostático normal y tumoral. *** $p < 0,0001$

Por último, estos datos fueron confirmados también mediante MSP de la región correspondiente al inicio de transcripción que también incluye la CpG analizada en el array de metilación. Con esta técnica encontramos que GSTM2 (Figura 19A) y PENK (Figura 19B) se encuentran metilados en el 75 % y 57 % de los tumores analizados, respectivamente. En conjunto, estos datos indican que PENK y GSTM2 están metilados en CP y que su metilación simultánea se da en un alto porcentaje lo que supone una valiosa herramienta para el diagnóstico de esta enfermedad.

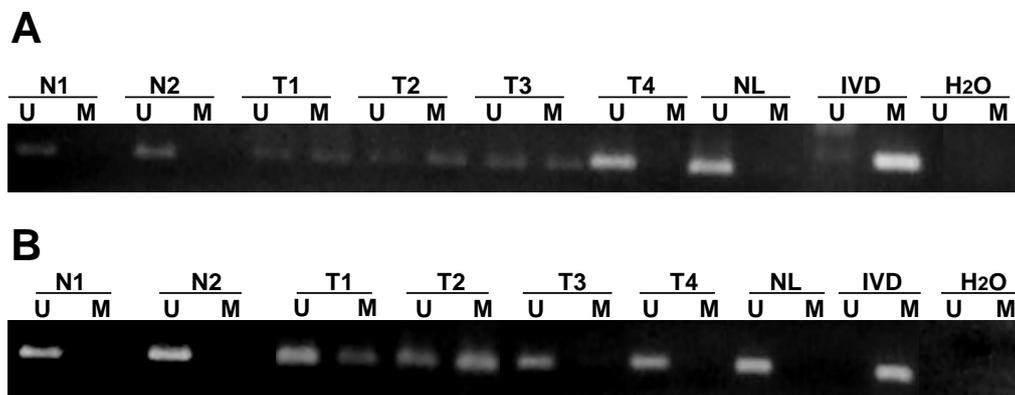


Figura 19. PCR específica de metilación (MSP) para GSTM2 y PENK. Análisis del estado de metilación de la región promotora de los genes GSTM2 (A) y PENK (B) mediante MSP en muestras de tejido normal (N) y tumoral (T). La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa muestra, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa muestra. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD).

2.2. Correlación entre el estado de metilación y los niveles de expresión de PENK Y GSTM2 en líneas celulares de cáncer de próstata

Como ya describimos en la introducción, la metilación del DNA en la región promotora de los genes codificantes es una modificación epigenética que se asocia a la pérdida de expresión. Dada la funcionalidad de estos genes, el siguiente paso fue determinar la correlación entre la metilación y los niveles de expresión de GSTM2 y PENK en las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145 que también fueron incluidas en el array y cuyos valores β fueron 0,69, 0,06 y 0,52 para GSTM2 y 0,01, 0,77 y 0,94 para PENK, respectivamente. En primer lugar, determinamos la metilación mediante MSP (**Figura 20A**) y secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito (**Figura 20B**). Ambas técnicas confirmaron los datos obtenidos en el array. Encontramos que GSTM2 está metilado en la línea celular LNCaP, que la línea DU145 presenta un menor grado de metilación y que la línea PC3 no está metilada. Además, estos resultados se correlacionan con los niveles de mRNA de GSTM2 determinados mediante qRT-PCR en los que observamos que la línea celular PC3 es la que presenta mayor nivel de expresión, unos niveles intermedios en la línea DU145 y la pérdida de expresión en la línea celular LNCaP (**Figura 20C**).

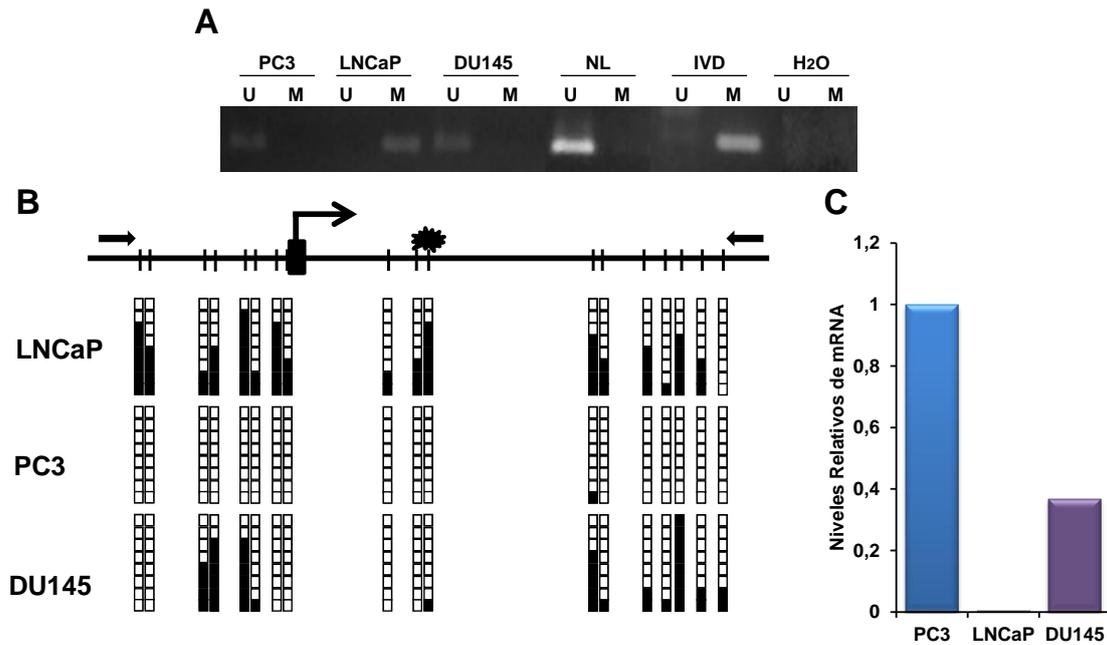


Figura 20. Análisis del estado de metilación y expresión de GSTM2 en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, PC3 y DU145. (A) Análisis de la metilación del promotor del gen GSTM2 mediante MSP en las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145. La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa línea, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa línea celular. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD). **(B)** Representación esquemática de la región promotora de GSTM2. Los dinucleótidos CpG están representados como líneas verticales negras cortas. Las flechas de color negro representan los cebadores diseñados para la reacción de la secuenciación con bisulfito sódico. La estrella negra representa la citosina analizada en el array de metilación en posición +153 respecto al inicio de transcripción (bloque negro). Se muestran los resultados de la secuenciación genómica con bisulfito de 8 clones individuales en las líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145. La presencia de citosinas metiladas o no metiladas se indican mediante cuadrados negros o blancos, respectivamente. **(C)** qRT-PCR de los niveles relativos del mRNA de GSTM2 en las líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Una vez que determinamos la pérdida de expresión de GSTM2 en la línea celular LNCaP, el siguiente paso que nos planteamos fue determinar si esa pérdida de expresión era debida a la metilación de su región promotora. Para confirmar este punto, tratamos las tres líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145 con el agente desmetilante 5-aza-2-deoxicitidina y determinamos los niveles de expresión mediante qRT-PCR. En la línea celular LNCaP, en la que GSTM2 está metilado y no se expresa, este tratamiento produjo un aumento en los niveles de mRNA (**Figura 21B**), mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de GSTM2 en las líneas PC3 y DU145 en las que no está metilado (**Figura 21A y C**).

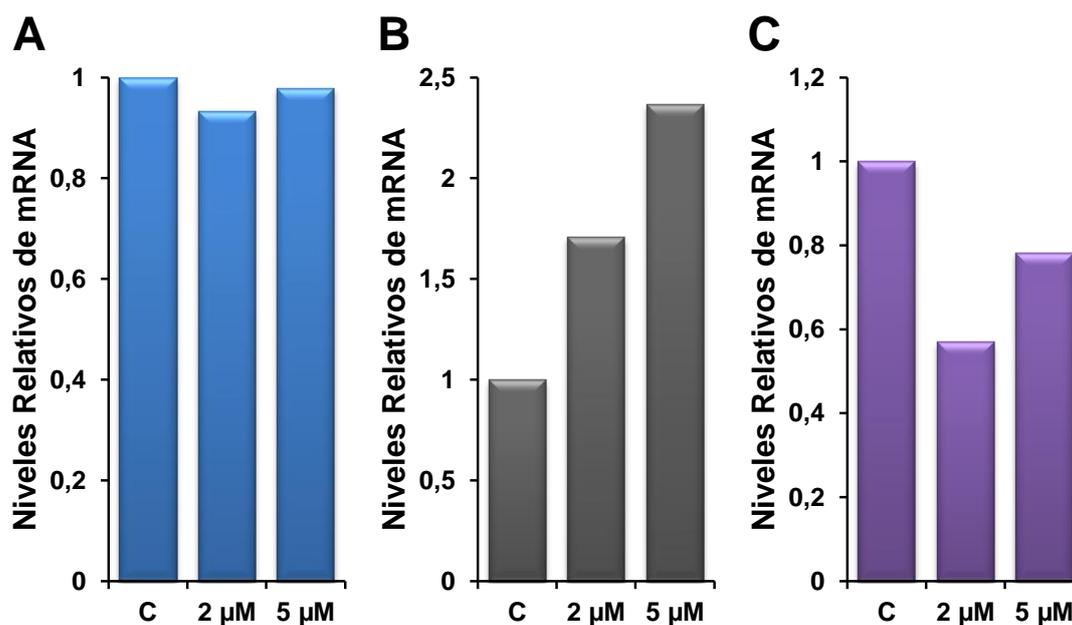


Figura 21. Efecto del tratamiento con 5'-aza-2'-deoxicitidina (2 y 5 µM) sobre los niveles de mRNA de GSTM2 en las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145. El agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina induce la expresión de GSTM2 en la línea celular LNCaP (B), pero no en las líneas celulares PC3 (A) y DU145 (C) que no están metiladas. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Este mismo estudio lo llevamos a cabo para PENK. Los ensayos de MSP (Figura 22A) y secuenciación con bisulfito (Figura 22B) confirmaron que PENK está metilado en las líneas celulares PC3 y DU145, y no lo está en la línea LNCaP. Además, estos datos se correlacionaron con los niveles de mRNA (Figura 22C). La hipermetilación de PENK en las líneas PC3 y DU145 se correspondió con su pérdida de expresión, mientras que los niveles de su mRNA fueron restaurados cuando ambas líneas fueron tratadas con el agente desmetilante 5-aza-2-deoxicitidina (Figura 23).

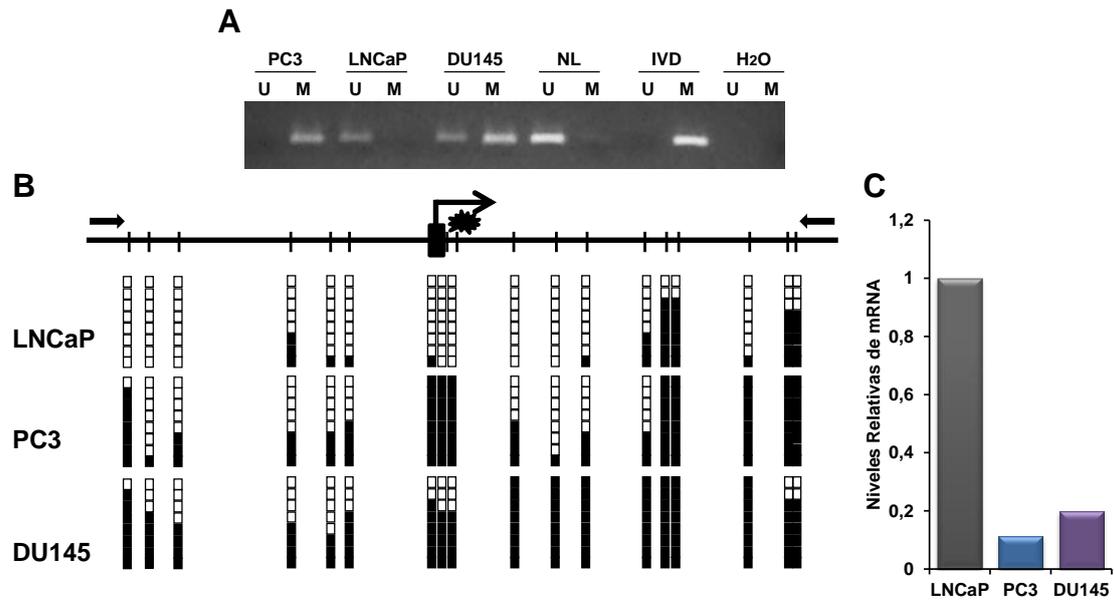


Figura 22. Análisis del estado de metilación y expresión de PENK en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, PC3 y DU145. (A) Análisis de la metilación del promotor de PENK mediante MSP en las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145. La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa línea, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa línea celular. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD). **(B)** Representación esquemática de la región promotora de PENK. Los dinucleótidos CpG están representados como líneas verticales negras cortas. Las flechas de color negro representan los cebadores diseñados para la reacción de la secuenciación con bisulfito sódico. La estrella negra representa la citosina analizada en el array de metilación en posición +26 respecto al inicio de transcripción (bloque negro). Se muestran los resultados de la secuenciación genómica con bisulfito de 8 clones individuales en las líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145. La presencia de citosinas metiladas o no metiladas se indican mediante cuadrados negros o blancos, respectivamente. **(C)** qRT-PCR de los niveles relativos del mRNA de PENK en las líneas celulares LNCaP, PCR y DU145. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

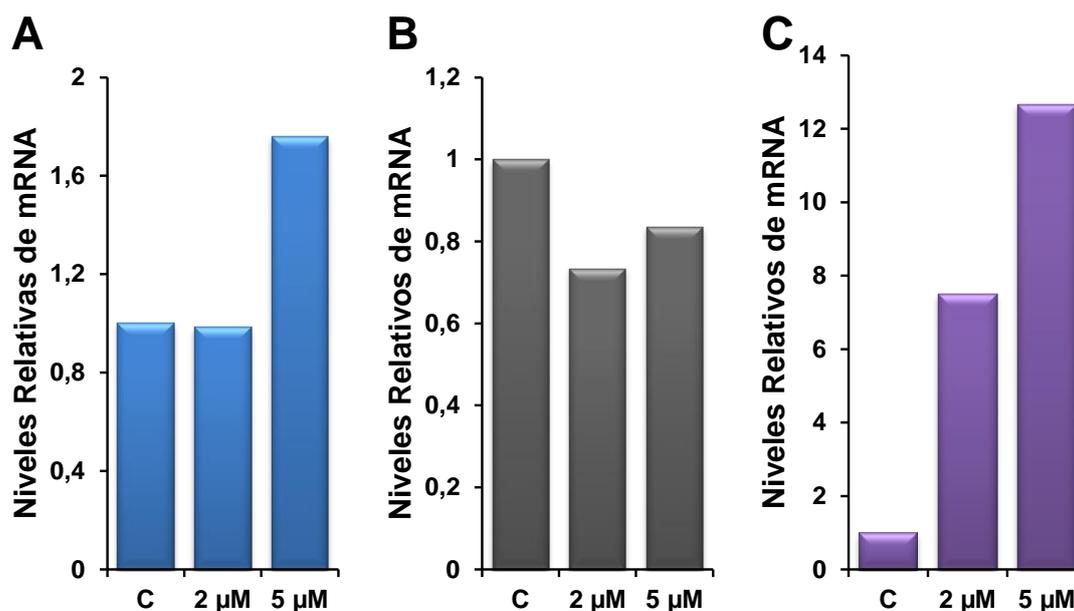


Figura 23. Efecto del tratamiento con 5'-aza-2'-deoxicitidina (2 y 5 µM) sobre los niveles de mRNA de PENK en las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145. El agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina induce la expresión de PENK en las líneas celulares PC3 (A) y DU145 (C), pero no en la línea celular LNCaP (B) que no está metilada. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

En conjunto, estos datos indican que, al igual que con GSTM2, la expresión de PENK está regulada por metilación de su promotor en líneas celulares de CP.

Posteriormente, quisimos determinar si esta correlación entre la expresión y la metilación de estos dos genes también se producía en las muestras de pacientes incluidas en el array. Para ello, analizamos la expresión de GSTM2 y PENK en las muestras de pacientes con CP y en las muestras de tejido prostático normal mediante inmunohistoquímica, y observamos que ambas proteínas se expresan en próstata normal, mientras que su expresión en las muestras tumorales fue muy heterogénea (Figura 24).

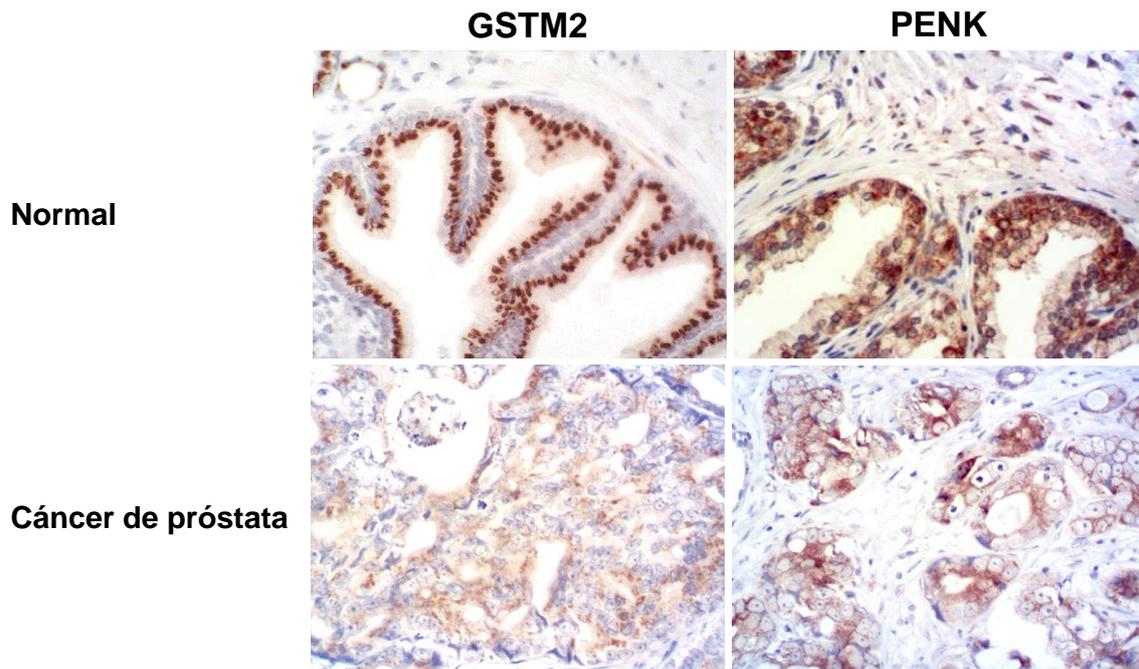


Figura 24. Expresión de GSTM2 y PENK en tejidos normales y tumorales de próstata. Se muestran imágenes representativas de la expresión de GSTM2 y de PENK determinada por inmunohistoquímica en tejido normal y muestras de CP. Las tinciones de GSTM2 y PENK en las glándulas normales fueron intensas y localizadas en los citoplasmas de las células del epitelio glandular (tinción marrón). A su vez, la mayoría de las células tumorales mostraron una pérdida evidente de la señal tanto para GSTM2 como para PENK.

Por último, determinamos la correlación entre los valores de metilación de las muestras tumorales y sus niveles de expresión proteica para GSTM2 (**Figura 25A**) y PENK (**Figura 25B**) para lo que, y siguiendo el criterio de clasificación de las muestras establecido por un único patólogo, asignamos un valor de expresión numérico a cada muestra siendo 0 el valor mínimo y 4 el máximo nivel de expresión. La correlación entre los niveles de metilación y la expresión fue de $-0,78$ para GSTM2 ($n=68$, $p<0,0001$) y $-0,59$ para PENK ($n=50$, $p<0,0001$). Para GSTM2 el 86,2% de los tumores metilados mostraron pérdida de expresión mientras que la proteína estaba presente en todos los tumores no metilados. La presencia de PENK se detectó en el 50% de los tumores no metilados y estuvo ausente en el 90% de los tumores metilados.

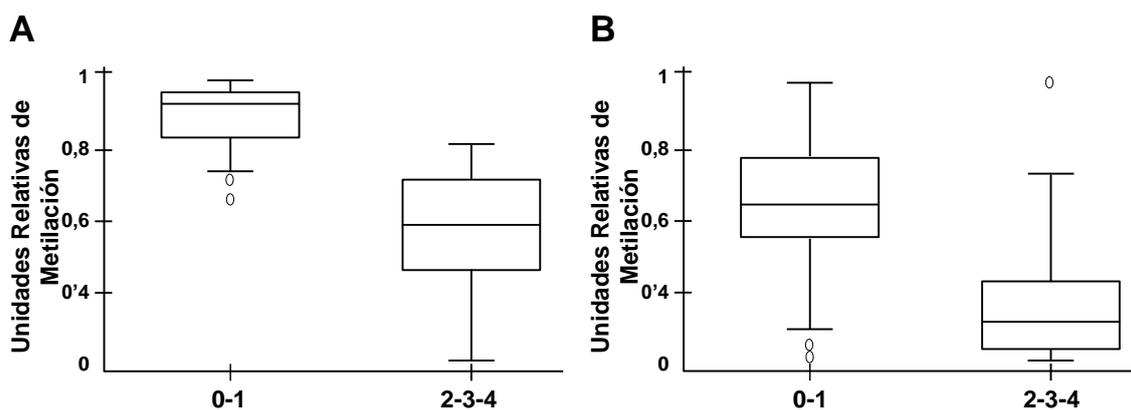


Figura 25. Correlación entre la metilación y la expresión de GSTM2 y PENK en tumores de próstata. Se muestra la correlación entre los valores de metilación obtenidos en el array de metilación y los datos de expresión de GSTM2 (**A**) y PENK (**B**) obtenidos mediante inmunohistoquímica, donde el valor 0 indica la ausencia de proteína y 4 es el valor máximo de expresión. La metilación de GSTM2 y PENK se correlacionó negativamente con la presencia de la proteína en ambos casos. *** $p < 0,0001$

A la vista de estos resultados podemos concluir que la metilación de GSTM2 y PENK es un hecho frecuente en CP, que, además, se asocia con su pérdida de expresión por lo que podría tener un papel relevante en el desarrollo de esta patología. Además, y no menos importante, estos dos genes están metilados conjuntamente en el 40,9% de las muestras tumorales analizadas por lo que la determinación de su estado de metilación podría ser una valiosa herramienta para la detección de los tumores de próstata.

2.3. Asociación entre el perfil de metilación del DNA y el pronóstico del cáncer de próstata

La metilación del DNA es una herramienta muy valiosa desde un punto de vista clínico ya que se puede utilizar no solo como marcador en la detección del cáncer, sino también para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Dado que las muestras incluidas en el estudio representan diferentes estadios en el desarrollo de esta patología (enfermedad localizada, enfermedad localmente avanzada y enfermedad diseminada) resultaba muy interesante analizar si existía alguna relación entre la frecuencia de metilación de los genes seleccionados y las características clinicopatológicas relacionadas con el pronóstico de esta enfermedad como son el Ki-67 (**Tabla 7**), el índice de Gleason (**Tabla 8**) y el tamaño tumoral (**Tabla 9**). El índice de Gleason es el método más usado por los patólogos en la clasificación del CP. Se basa en el grado de diferenciación de la arquitectura glandular existente entre el tejido normal y el del CP (7, 8). Los tumores menos agresivos generalmente tienen un aspecto similar al del tejido sano, mientras que los más agresivos, con posibilidades de crecer y metastatizar tienen un aspecto diferente al tejido sano. El Ki-67 es un antígeno nuclear que se expresa en las células en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular y no se expresa en las células en fase G0. Por tanto, la expresión del Ki-67 nos puede dar idea

del estado proliferativo de las células tumorales (243). Por último, el tamaño tumoral (T) permite describir el tamaño y la ubicación del tumor.

Tabla 7. Genes más frecuentemente metilados en tumores de próstata con elevados niveles de Ki-67

Genes	Ki-67 0-5 , n=48	Ki-67 6-12, n=14	Ki-67 13-25 , n = 8	Ki-67 >25 , n=10	Valor p
ALOX12_E85_R	47.91	64.28	87.5	90	0.0027
CFTR_P372_R	37.5	55	62.5	90	0.002
GFI1_E136_F	27.08	42.85	50	80	0.0015
GSTP1_P74_F	29.16	50	62.5	70	0.0048
HFE_E273_R	12.5	35.71	50	40	0.0081
HTR1B_P222_F	14.58	35.71	37.5	90	<.0001
MT1A_E13_R	33.33	50	62.5	80	0.0032
PDGFRA_P1429_F	16.66	42.85	25	60	0.0069
PDGFRB_P273_F	41.66	71.42	87.5	80	0.0026
PENK_E26_F	29.16	57.14	50	90	0.0004
RARA_P176_R	33.33	42.85	50	80	0.008
RARRES1_P426_R	12.5	35.71	37.5	50	0.0038
SEPT9_P374_F	25	35.71	75	80	0.0001
TAL1_P594_F	31.25	42.85	50	90	0.001
THY1_P149_R	12.5	21.42	50	50	0.0017
ZNF215_P71_R	14.58	35.71	50	60	0.0007

Tabla 8. Genes más frecuentemente metilados en tumores de próstata con elevado índice de Gleason

Genes	Gleason <8 n=36	Gleason ≥8 n=47	Valor p
BMP4_P123_R	5.55	31.91	0.005
CFTR_P372_R	25	63.83	0.0008
ERG_E28_F	16.66	55.31	0.0005
HTR1B_P222_F	11.11	42.55	0.0029
MYCL2_P19_F	19.44	51.06	0.0056
RARB_P60_F	44.44	74.46	0.0068
TBX1_P885_R	19.44	48.93	0.0063
TERT_P360_R	22.22	57.44	0.0017

Tabla 9. Genes más frecuentemente metilados en tumores de próstata con elevada Categoría T

Genes	T1-T2 n=35	T3-T4 n=48	Valor p
ALOX12_E85_R	37.14	75	0.0007
APC_P14_F	37.14	70.83	0.0034
ASCL2_P360_F	8.57	35.41	0.0048
BMP4_P123_R	5.71	31.25	0.0052
CAV1_P130_R	5.71	33.33	0.0027
CCNA1_E7_F	22.85	54.16	0.0064
GSTM2_E153_F	71.42	95.83	0.0031
GSTP1_P74_F	20	54.16	0.0029
HFE_E273_R	8.57	33.33	0.0087
IRAK3_P185_F	8.57	37.5	0.0042
MFAP4_P10_R	17.14	50	0.0026
MT1A_E13_R	17.14	62.5	<.0001
MYCL2_P19_F	17.14	52.08	0.0013
PDGFRA_P1429_F	8.57	39.58	0.0021
PDGFRB_P273_F	31.42	70.83	0.0007
RARB_P60_F	40	77.08	0.0012
SCGB3A1_E55_R	25.71	66.66	0.0003
SEPT9_P374_F	14.28	54.16	0.0002
TAL1_P594_F	20	56.25	0.0014
TERT_P360_R	22.85	56.25	0.0033

Con este análisis encontramos grupos de genes cuya metilación es más frecuente en pacientes con elevado Ki-67 (**Tabla 7**), elevado índice de Gleason (**Tabla 8**) o elevado estado tumoral (**Tabla 9**), pero no encontramos genes que estuviesen metilados con elevada frecuencia en pacientes que tuviesen elevadas las 3 variables clínicas analizadas. En el caso de PENK y GSTM2, los hemos encontrado significativamente metilados en pacientes con elevado Ki-67 en el caso de PENK y en pacientes con enfermedad avanzada en el caso de GSTM2, pero no hemos encontrado ninguna relación entre el estado de metilación de estos genes con el resto de variables. Pero hemos encontrado dos genes, CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) y HTR1B (*5-hydroxytryptamine receptor 1B*) que están metilados con una elevada frecuencia en pacientes con elevado índice de Gleason y con un alto índice Ki-67, dos parámetros asociados a un peor pronóstico en CP. En concreto, CFTR estaba hipermetilado en el 63,8% de los pacientes que presentaban un índice de Gleason ≥ 8 y en un 25% de los pacientes con Gleason < 8 , mientras que HTR1B estaba hipermetilado en el 42,5% y el 11% de los pacientes incluidos en estos mismos grupos.

Además, CFTR y HTR1B están hipermetilados conjuntamente en el 40,4% de los tumores con un índice de Gleason ≥ 8 . Como se muestra en la figura 26 el análisis de Kaplan-Meier indica que tanto la supervivencia global (**Figura 26A**) como el tiempo libre de progresión clínica (TLPC) (**Figura 26B**) fueron menores en los pacientes que presentan la metilación conjunta de estos dos genes ($p < 0,0001$).

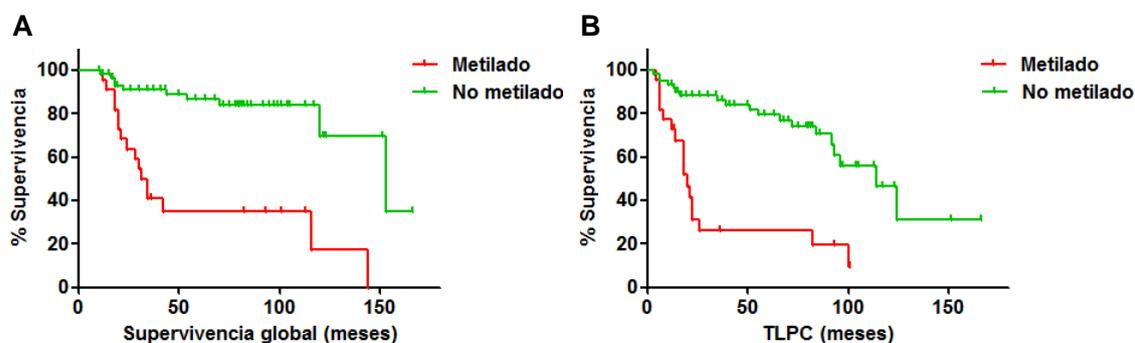


Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la relación entre la metilación simultánea de CFTR y HTR1B y la supervivencia global (A) y el TLPC (B). Análisis de la supervivencia global (A) y el TLPC (B) de los pacientes con CP que presentan metilación simultánea de los genes CFTR y HTR1B (líneas de color rojo) y que no presentan metilación simultánea de CTFR y HTR1B (líneas de color verde). El fallecimiento de los pacientes está representado como líneas verticales cortas. El tiempo está expresado en meses. La supervivencia global (A) y el TLPC (B) fueron menores en los pacientes que presentan la metilación simultánea de estos dos genes. *** $p < 0,0001$

Una vez seleccionados CFTR y HTR1B como marcadores de pronóstico, por último, confirmamos los datos de metilación obtenidos en el array mediante MSP (**Figura 27**). Encontramos que CFTR (**Figura 27A**) y HTR1B (**Figura 27B**) están metilados en el 65% y en el 22% de los tumores, respectivamente. La discrepancia encontrada respecto al porcentaje de metilación obtenido con el array en el caso de CFTR (46,9%) puede ser debida a la diferente metodología empleada. Mientras que en el array de metilación seleccionamos como tumores metilados solo aquellos que presentaron un valor $\beta > 0,6$, en la MSP, debido a su elevada sensibilidad, pueden aparecer metilados tumores que presentan un valor de metilación por debajo de 0,6 en el array.

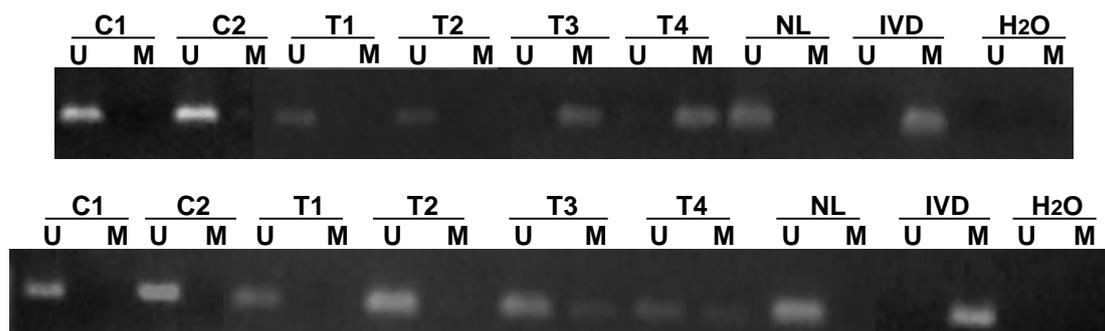


Figura 27. Validación de los datos de metilación de CFTR y HTR1B obtenidos en el array de metilación mediante MSP. Análisis de la metilación del promotor de los genes CFTR (A) y HTR1B (B) mediante MSP en tejido prostático normal (N) y CP (T). La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa muestra, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa muestra. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD).

En conjunto, estos resultados sugieren que la hipermetilación conjunta de CFTR y HTR1B es un biomarcador que permite distinguir entre tumores de próstata agresivos e indolentes.

3. Papel de la metilación de Gfi1 en cáncer

3.1. Identificación de Gfi1 como un nuevo gen hipermetilado en cáncer de próstata

Otro de los grandes objetivos que nos propusimos en este trabajo fue identificar nuevos genes silenciados por metilación en cáncer de próstata y analizar la relevancia funcional de su pérdida de expresión en el desarrollo de esta neoplasia. De la lista de los 41 genes significativamente hipermetilados (Tabla 6) para este estudio seleccionamos Gfi1 por la elevada frecuencia con la que está metilado (37,3%) (Figura 28), porque su metilación no se ha descrito hasta el momento en cáncer, y por su función. En concreto Gfi1 codifica para un represor transcripcional implicado en la diferenciación de células hematopoyéticas (244). Aunque menos conocido, se ha demostrado que también regula la diferenciación de tejidos no hematopoyéticos entre las que se incluyen las neuronas (245), las células de la membrana del oído interno (246), pulmón (247) e intestino (248). Como mecanismo para reprimir la expresión génica, Gfi1 interacciona con proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas como la histona desacetilasa HDAC2 (249) y la histona metiltransferasa G9a (250).

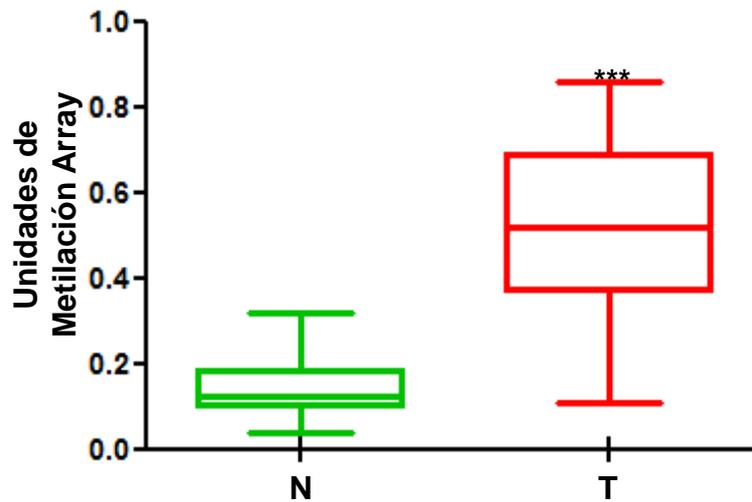


Figura 28. Valores de metilación del array para el gen Gfi1 en las muestras de tejido normal (N) y CP (T). Gfi1 se encuentra diferencialmente metilado y de forma significativa en las muestras tumorales respecto a las muestras de tejido normal. *** $p < 0,0001$

Ya que tanto la metilación como la función de Gfi1 en próstata no han sido descritas hasta el momento, en primer lugar, validamos los datos de metilación obtenidos en el array, para posteriormente caracterizar las consecuencias biológicas de este cambio epigenético en CP.

Para validar los datos del array analizamos la metilación de Gfi1 mediante Sequenom (**Figura 29**). En este caso no pudimos incluir en el estudio la CpG analizada en el array debido a que la presencia de numerosas GpGs en la región promotora dificultaron el diseño de cebadores que abarcasen la CpG de interés. Por este motivo, determinamos la metilación de otras CpGs de la región promotora de Gfi1 y observamos que las muestras tumorales presentan unos niveles de metilación significativamente más elevados que las muestras de tejido normal.

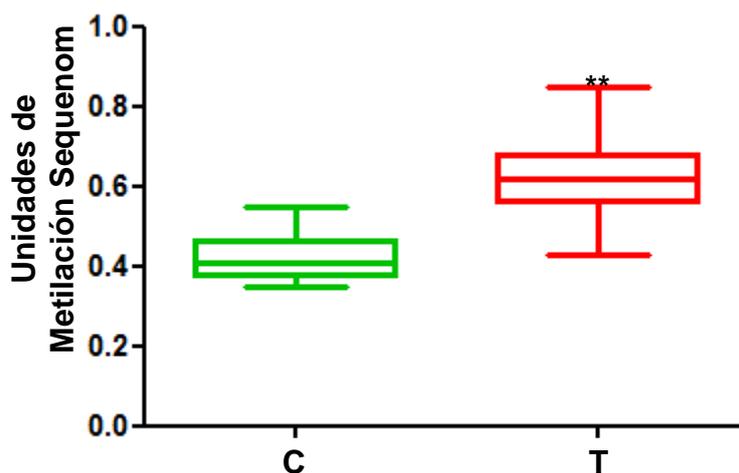


Figura 29. Valores de metilación de Gfi1 analizadas mediante Sequenom EpiTYPER. La figura muestra diferencias significativas en los valores de metilación de la CpG analizada, entre las muestras de tejido normal (N) y las muestras tumorales (T). ** $p < 0,01$

A continuación, analizamos la metilación en las mismas muestras mediante MSP (Figura 30). En este caso los cebadores si incluían la CpG analizada en el array. Con esta técnica encontramos que el 51,3% de los tumores analizados están metilados. La discrepancia encontrada respecto al porcentaje de metilación obtenido con el array (37,3%) puede ser debida a la diferente metodología empleada. Como ya explicamos en el caso de CFTR, mientras que en el array de metilación seleccionamos como tumores metilados solo aquellos que presentaron un valor $\beta > 0,6$, en la MSP, debido a su elevada sensibilidad, pueden aparecer metilados tumores que presentan un valor de metilación por debajo de 0,6 en el array. En cualquier caso, los datos obtenidos por estas dos técnicas se correlacionaron en el 78% de las muestras analizadas ($n=39$), lo que confirma que Gfi1 está frecuentemente metilado en los pacientes con CP.

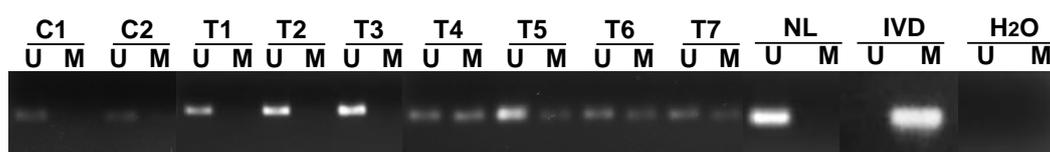


Figura 30. Análisis de la metilación del promotor del gen Gfi1 mediante MSP en tejido normal (N) y CP (T). La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa muestra, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa muestra. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD).

3.2. Silenciamiento de Gfi1 por hipermetilación de su región promotora en líneas celulares de cáncer próstata

Para determinar si la metilación de la región promotora de Gfi1 provoca cambios en su expresión utilizamos las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145, que también fueron incluidas en el array de metilación y cuyos valores para este gen fueron 0,84,

0,96 y 0,57, respectivamente. Para este estudio, incluimos también la línea celular de próstata no tumoral RWPE en la que el promotor de Gfi1 no está metilado.

Confirmamos los datos obtenidos en el array de metilación mediante MSP. Como esperábamos, encontramos que Gfi1 se encuentra metilado en las células LNCaP, PC3 y DU145 y que no está metilado en la línea celular RWPE (**Figura 31A**). Además, estos resultados se correlacionaron con los niveles de mRNA de Gfi1, en los que observamos que este gen se expresa en la línea celular RWPE y se produce una disminución muy significativa en las líneas celulares LNCaP, PC3 y DU145 (**Figura 31B**).

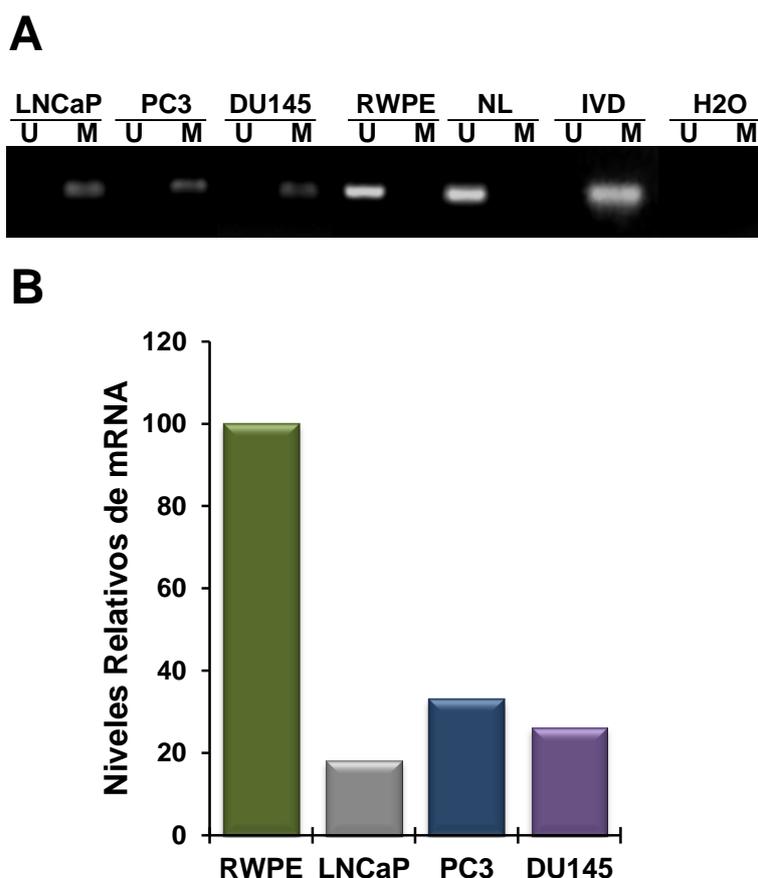


Figura 31. Análisis del estado de metilación y expresión de Gfi1 en las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y RWPE. (A) Análisis de la metilación del promotor del gen Gfi1 mediante MSP en las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y RWPE. La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa línea, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa línea celular. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD). **(B)** qRT-PCR de los niveles relativos de mRNA de Gfi1 en las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y RWPE. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Una vez determinada la pérdida de expresión de Gfi1 en las tres líneas celulares de CP, el siguiente paso fue determinar si esta era debida a la metilación de su región promotora. Para ello, tratamos las tres líneas celulares con el agente desmetilante 5'-

aza-2'-deoxicitidina y determinamos los niveles de mRNA de Gfi1 mediante qRT-PCR. El tratamiento con el agente desmetilante produjo un aumento de los niveles del mRNA de Gfi1 en las líneas celulares en las que está metilado (**Figura 32**).

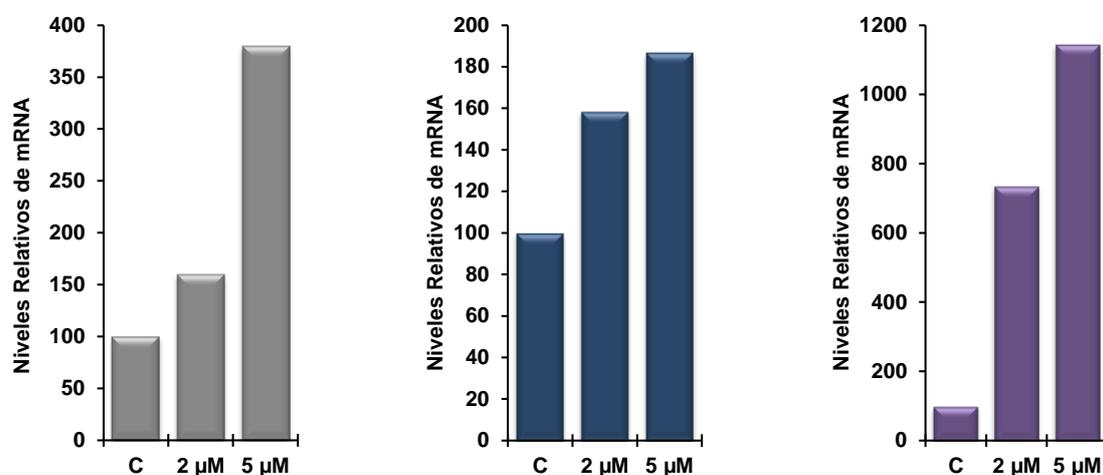


Figura 32. Efecto del tratamiento con 5'-aza-2'-deoxicitidina (2 y 5 μM) sobre los niveles de mRNA de Gfi1 en las líneas celulares LNCaP (A), PC3 (B) y DU145 (C). El agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina aumenta la expresión de Gfi1 en las tres líneas celulares. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Estos resultados indican que la expresión de Gfi1 está regulada por metilación de su promotor en las líneas celulares de CP LNCaP, PC3 y DU145.

3.3. Silenciamiento epigenético de Gfi1 en cáncer de mama

Una vez determinado el silenciamiento epigenético en CP, quisimos determinar si este era un evento específico de este tipo de tumores. Para ello, determinamos el estado de metilación de Gfi1 en 27 líneas celulares correspondientes a 8 tipos de tumores mediante MSP (**Tabla 10 y Figura 33A**) y secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito sódico (**Figura 33B**) y encontramos que Gfi1 está metilado muy frecuentemente en líneas celulares de cáncer de mama, en concreto en las líneas MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT474 y BT549.

Tabla 10. Representación esquemática del estado de metilación de Gfi1 en 27 líneas celulares correspondientes a 8 tipos de tumores

		No Metilado	Metilado
Cérvix	MDAH2774	No Metilado	Metilado
	CasKI		
	Hela		
Pulmón	H522		
	A459		
	H2126		
	H2227		
	H23		
Hueso	SAOS-2		
	CAI178		
Endometrio	SKUT1		
	AN3CA		Metilado
Mama	MCF7	No Metilado	
	MDA-MB-231		Metilado
	MDA-MB-468		Metilado
	BT-549		Metilado
	MDA-MB-157	No Metilado	
	BT-474		Metilado
Hígado	HEPG2	No Metilado	
Neuroblastoma	SNU368		Metilado
	SKNBE	No Metilado	Metilado
	LAI5S		
	LAN1		
	IMR32		
	SKNAS		
Colon	RKO		Metilado
	LOVO	No Metilado	

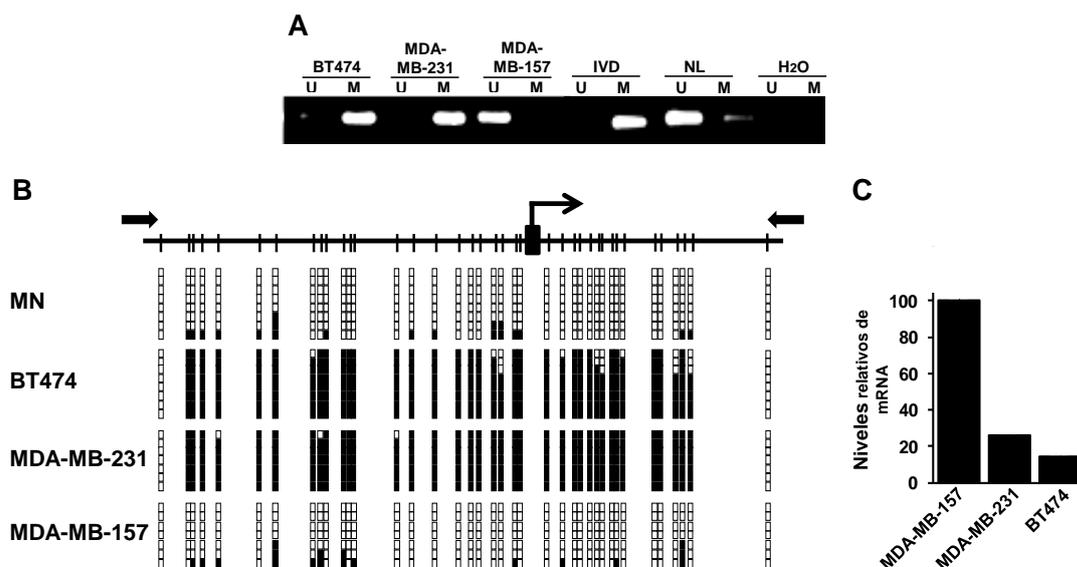


Figura 33. Análisis del estado de metilación y expresión de Gfi1 en las líneas celulares de cáncer mama BT474, MDA-MB-231 y MDA-MB-157 y en tejido de mama normal (MN). (A) Análisis de la metilación del promotor de Gfi1 mediante MSP en las líneas celulares de cáncer de mama BT474, MDA-MB-231 y MDA-MB-157. La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa línea, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa línea celular. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD). (B) Representación esquemática de la región promotora de Gfi1. Los dinucleótidos CpG están representados como líneas verticales negras cortas. Las flechas de color negro representan los cebadores diseñados para la reacción de la secuenciación con bisulfito sódico. El bloque negro representa el inicio de transcripción. Se muestran los resultados de la secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito de 8 clones individuales en tejido de mama normal (MN) y en las líneas celulares de cáncer de mama BT474, MDA-MB-231 y MDA-MB-157. La presencia de citosinas metiladas o no metiladas se indican mediante cuadrados negros o blancos, respectivamente. (C) qRT-PCR de los niveles relativos del mRNA de Gfi1 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-157, MDA-MB-231 y BT474. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Estos resultados se correlacionaron con los niveles de mRNA de Gfi1 determinados mediante qRT-PCR en los que observamos una pérdida de expresión en las líneas MDA-MB-231 y BT474 respecto a la línea MDA-MB-157 en la que no está metilado (Figura 33C).

Además, el tratamiento de las líneas MDA-MB-231 y BT474 con 5-aza-2-deoxicitidina aumentó los niveles de mRNA de Gfi1 en ambas, lo que indica que la expresión de Gfi1 está regulada por la metilación de su promotor en líneas celulares de cáncer de mama (Figura 34).

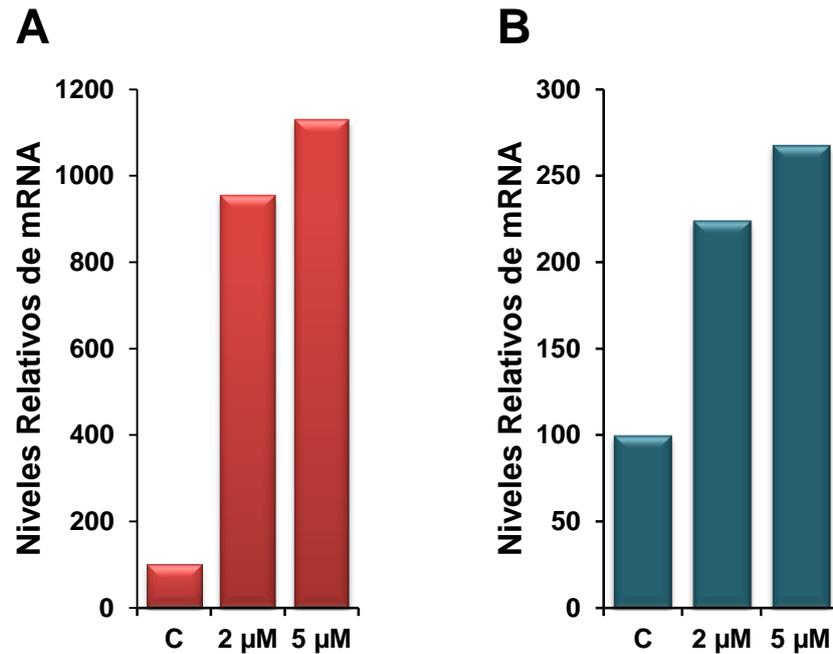


Figura 34. Niveles del mRNA del gen Gfi1 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (A) y BT474 (B) tras el tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina (2 y 5 µM). El agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina aumenta la expresión de Gfi1 en ambas líneas celulares. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

A la vista de estos resultados el siguiente paso fue extrapolarlos a muestras de tumores mediante MSP. Como muestra la figura 35, Gfi1 está metilado en las muestras de cáncer de mama (en el 47 % de los tumores analizados, n=44) (**Figura 35A**), mientras que no lo está en las muestras de cáncer de colon analizadas (**Figura 35B**) confirmando por tanto que la metilación de Gfi1 no es un evento general en cáncer.

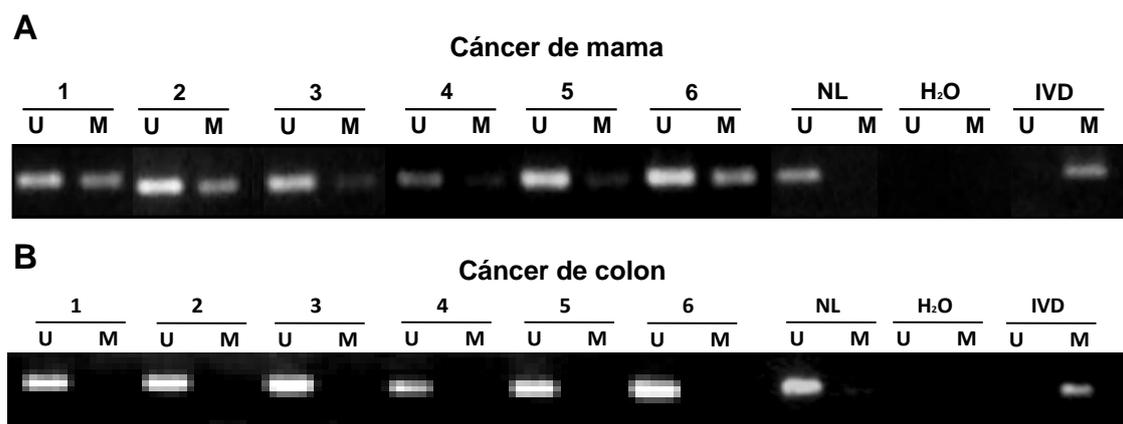


Figura 35. Análisis del estado de metilación de Gfi1 en muestras de cáncer de mama y colon mediante MSP. Análisis de la metilación del promotor de Gfi1 mediante MSP cáncer de mama (A) y cáncer de colon (B). La presencia de una banda de PCR debajo de la línea U indica que el gen no está metilado en esa muestra, mientras que la presencia de una banda de PCR debajo de la línea M indica que el gen está metilado en esa muestra. Como control de la reacción de no metilación se utilizaron linfocitos normales (NL) y como control de la reacción de metilación se utilizó DNA metilado *in vitro* (IVD).

En conjunto, todos estos resultados nos indican que la pérdida de expresión por metilación del promotor de Gfi1 es un evento específico y frecuente en CP y mama. Ya que el cáncer de mama y el de próstata son los dos tipos de tumores endocrinos mejor caracterizados y que comparten grandes similitudes en las principales vías de señalización hormonal que controlan el crecimiento tumoral, decidimos analizar la implicación biológica del silenciamiento epigenético de Gfi1 en este tipo de tumores.

3.4. Estudio de la relevancia funcional de la pérdida de expresión de Gfi1 en cáncer de próstata y mama

Los datos disponibles sobre el papel de Gfi1 en el sistema hematopoyético son contradictorios, por un lado, hay trabajos que indican que puede actuar como un oncogén, mientras que otros estudios han demostrado que Gfi1 disminuye la proliferación de células hematopoyéticas y es fundamental para preservar su integridad funcional (251) proponiendo que puede actuar como un gen supresor de tumores. Pero no hay datos en la bibliografía sobre el papel de este gen en los tejidos de próstata y mama, por lo que una vez demostrado que los niveles de expresión de Gfi1 están regulados epigenéticamente, quisimos conocer el significado funcional de su pérdida de expresión en estos dos tipos de tumores. Para ello, en primer lugar, transfectamos de manera estable las líneas celulares de CP y mama, PC3 y MDA-MB-231, respectivamente, que han perdido la expresión de este gen por metilación de su promotor con un vector de expresión para Gfi1 (pCMV-Gfi1) o con el mismo vector de expresión vacío (Mock) que nos sirvió como control. Una vez transfectadas, las células que han incorporado el cDNA que codifica para Gfi1 se seleccionaron mediante el crecimiento en presencia de Geneticina. La eficiencia de la transfección se determinó mediante, qRT-PCR (**Figuras 36A y C**) y *Western-blot* (**Figuras 36B y D**) y se seleccionaron aquellos clones que presentaron mayores niveles de expresión.

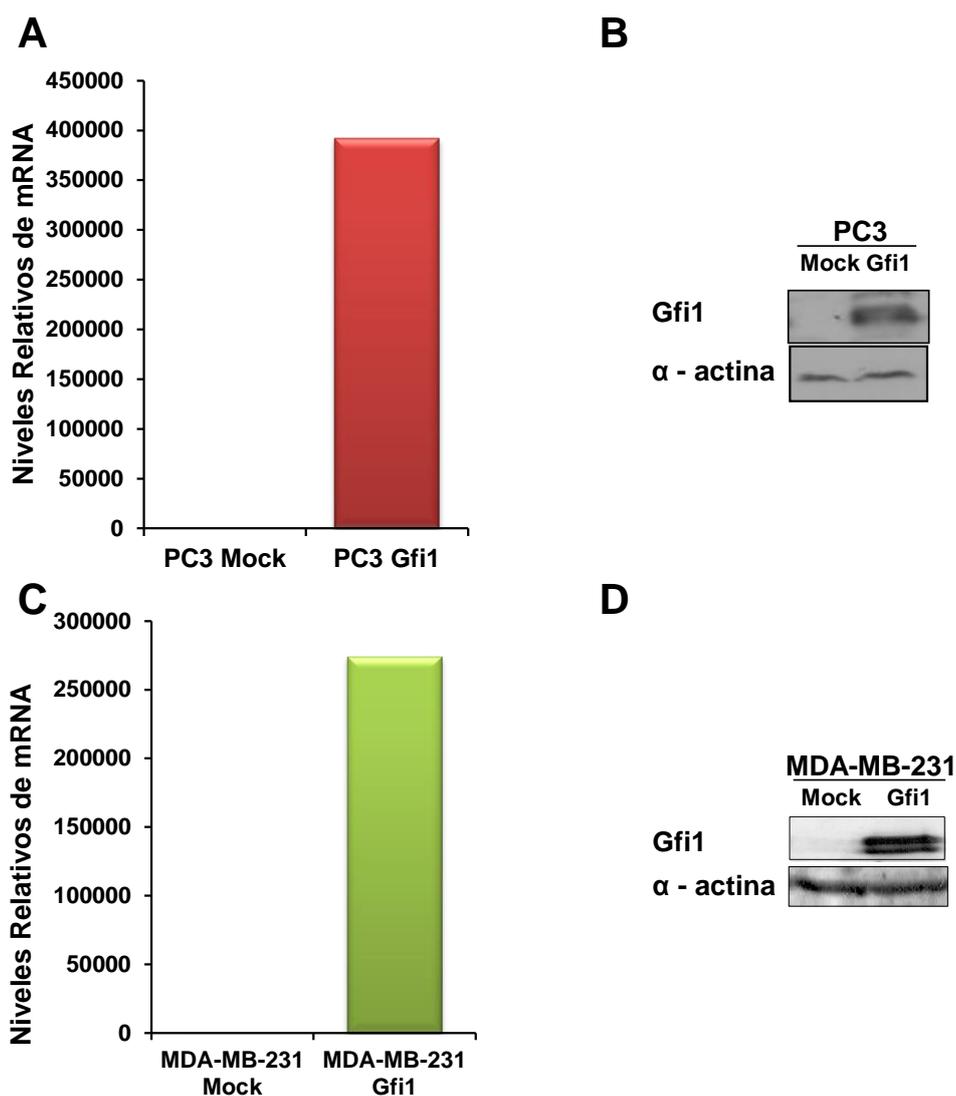


Figura 36. Análisis de la eficiencia de la transfección de Gfi1 en las líneas celulares PC3 y MDA-MB-231. Niveles de expresión de Gfi1 en las líneas celulares PC3 (**A y B**) y MDA-MB-231 (**C y D**) transfectadas con el vector de expresión que contiene la secuencia de Gfi1 y el vector de expresión vacío (Mock) mediante qRT-PCR (**A y C**) y *Western-Blot* (**B y D**). Como control de carga en el *Western-Blot* se utilizó la α -actina. Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

3.4.1. Efecto de Gfi1 sobre la viabilidad y proliferación celular

Para estudiar el posible papel de Gfi1 como gen supresor de tumores en nuestro modelo, en primer lugar, determinamos el efecto de su reexpresión sobre la viabilidad y la proliferación celular. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico que mide la reducción de la sal Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) y observamos que la reexpresión de Gfi1 redujo significativamente la viabilidad celular tanto en la línea celular PC3 como en la línea MDA-MB-231 (**Figura 37**).

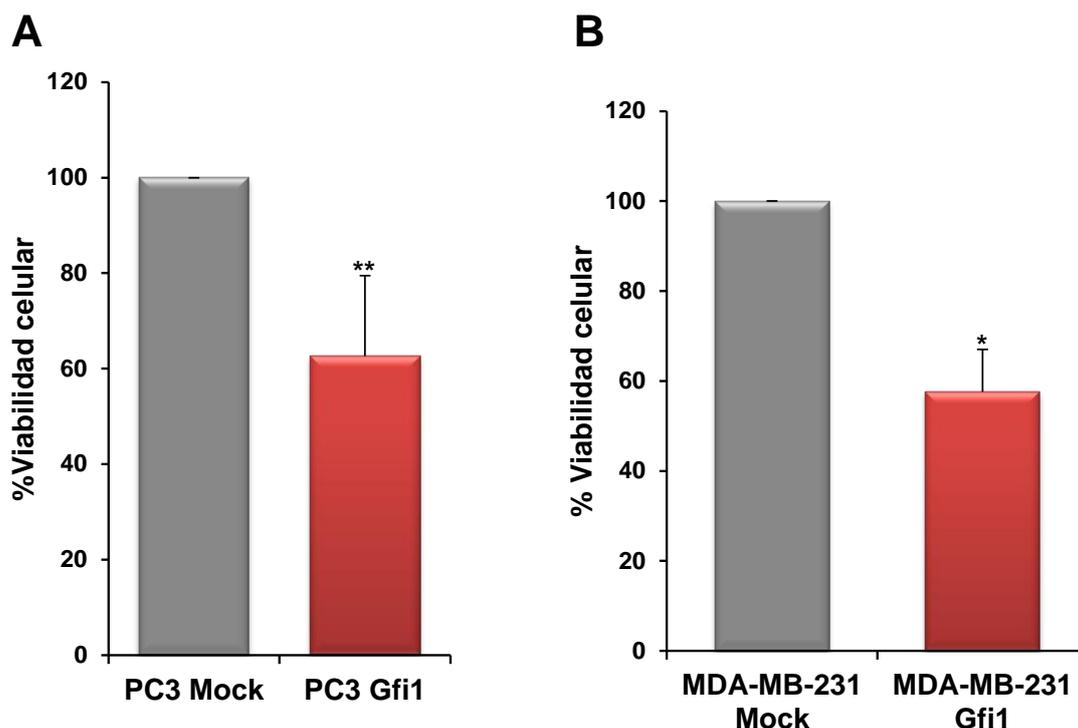


Figura 37. La reexpresión de Gfi1 en las líneas celulares PC3 y MDA-MB-231 produce una disminución de la viabilidad celular. Las líneas celulares PC3 (A) y MDA-MB-231 (B) se transfectaron con un plásmido vacío (PC3 Mock o MDA-MB-231 Mock) o con el plásmido que contiene el cDNA de Gfi1 (PC3 Gfi1 o MDA-MB-231 Gfi1). La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT 15 días después de la siembra. Los datos representan la media \pm el EMS de tres experimentos realizados por triplicado ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Para determinar la proliferación celular realizamos ensayos de incorporación de timidina tritiada que se incorpora a las células en la fase de síntesis de DNA y es un indicativo de que la célula está proliferando. En este grupo de experimentos las células fueron sincronizadas mediante la incubación con medio sin suero durante 48 h, y tras inducir la proliferación durante 12 horas por la adición de medio completo se determinó la incorporación de timidina tritiada. Nuestros resultados indican que la proliferación celular se redujo significativamente en la línea MDA-MB-231 Gfi1 (Figura 38B), sin embargo, en la línea PC3 la reexpresión de Gfi1 no produjo cambios significativos en la proliferación celular (Figura 38A).

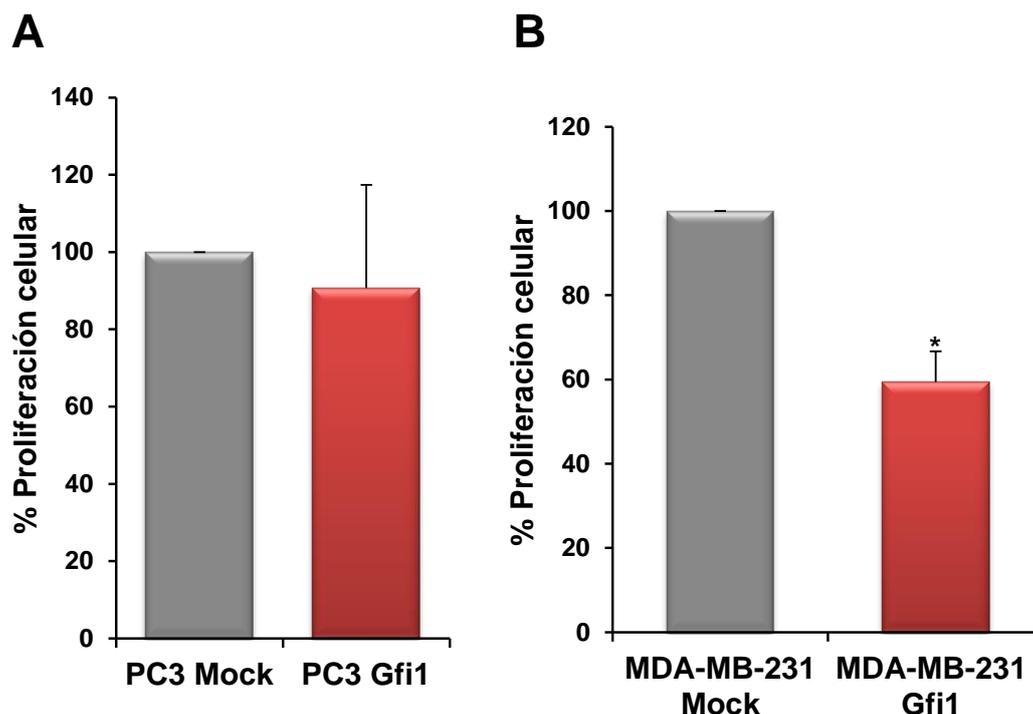


Figura 38. La reexpresión de Gfi1 disminuye la proliferación celular en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada se midió la proliferación celular. Los datos representan la media \pm la EMS de tres experimentos realizados por triplicado. En el caso de la línea PC3 los resultados no fueron significativos. * $p < 0,05$

A continuación, realizamos ensayos de formación de colonias para cada una de las líneas transfectadas y observamos que tanto en la línea PC3 como MDA-MB-231, la expresión de Gfi1 produjo una reducción en su capacidad para formar colonias (**Figura 39**). Esta técnica nos da idea de la capacidad tumorigénica de un cultivo *in vitro* ya que determina la capacidad de una única célula para formar una colonia. En conjunto, este grupo de resultados indican que la reexpresión de Gfi1 produce una disminución en la capacidad tumorigénica *in vitro* en las líneas celulares de CP y mama, como demuestran los ensayos de viabilidad, proliferación celular y formación de colonias.

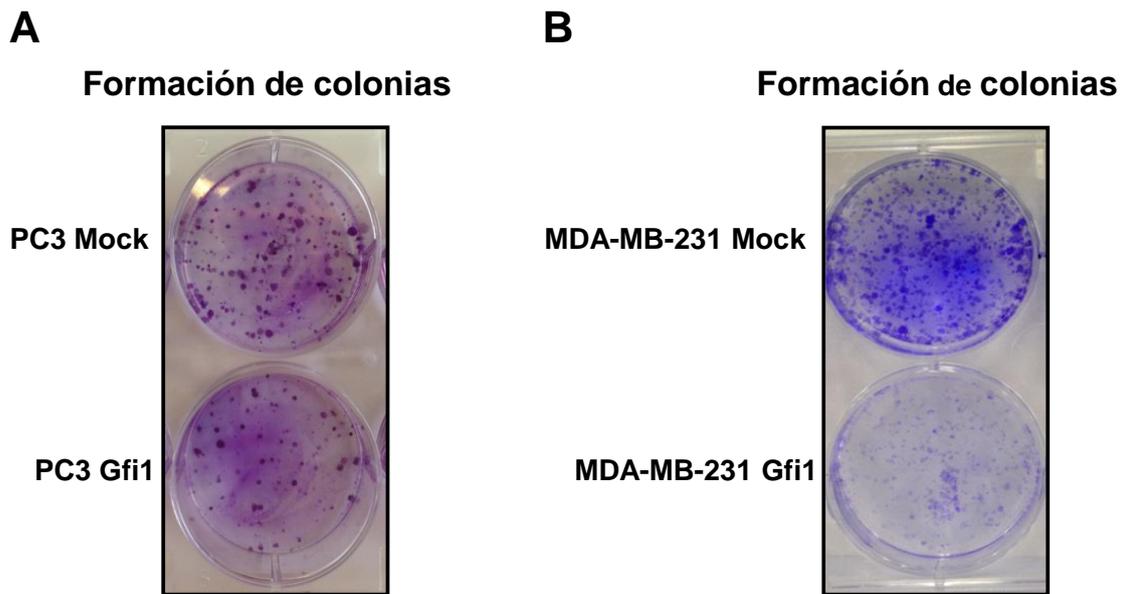


Figura 39. La reexpresión de Gfi1 reduce la capacidad de formar colonias en la línea celular de CP PC3 (A) y de cáncer de mama MDA-MB-231 (B). Imagen de las colonias tras ser fijadas y teñidas con cristal violeta. La imagen superior corresponde a las células Mock y la inferior corresponde a las células transfectadas de forma estable con el vector de expresión para Gfi1. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.4.2. Efecto de Gfi1 sobre la migración y la invasión celular

La migración y la invasión celular son otros de los procesos ligados a la progresión tumoral. Como hemos comentado anteriormente, no hay datos sobre la función de Gfi1 en los tejidos de próstata y mama y por tanto no se conoce su posible papel sobre estos dos procesos relacionados con la agresividad tumoral. Por ello, el siguiente paso fue determinar el posible efecto de la reexpresión de Gfi1 sobre estos dos procesos en nuestros modelos celulares. Como muestra la figura 40, la reexpresión de Gfi1 no produjo cambios significativos sobre la migración de estas dos líneas celulares, pero sorprendentemente si modificó la invasión, aunque de diferente manera: la disminuyó en el caso de la línea PC3 Gfi1 (**Figura 41A**) y la aumentó en las MDA-MB-231 Gfi1 (**Figura 41B**).

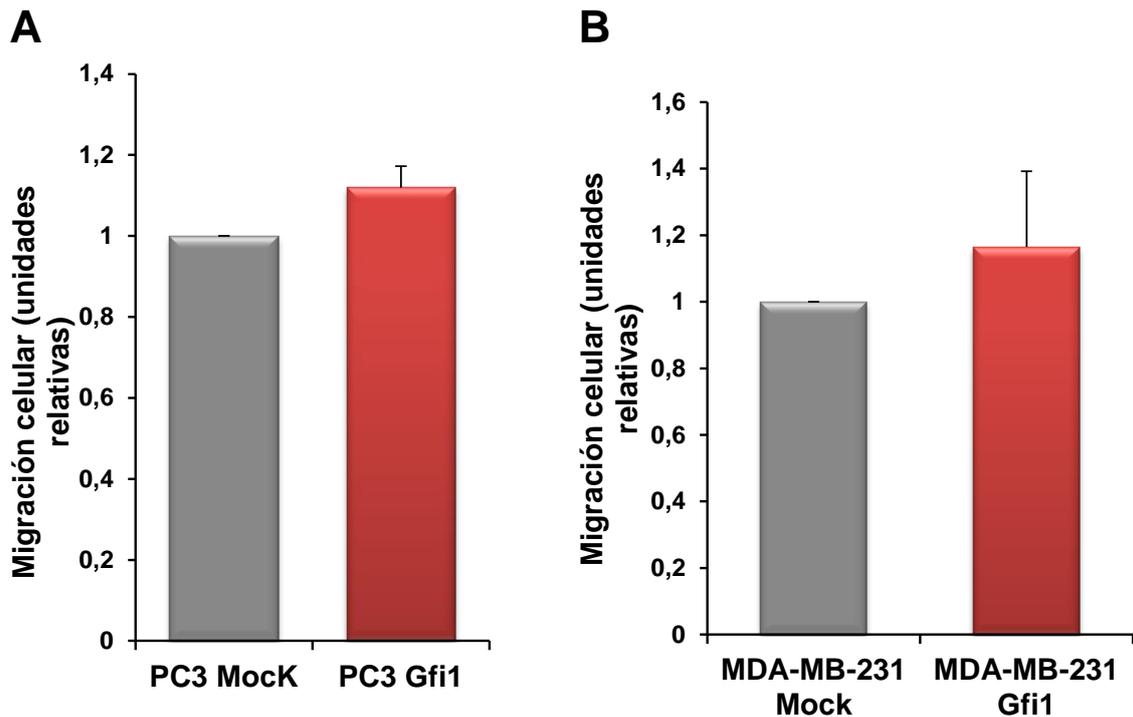


Figura 40. Efecto de la reexpresión de Gfi1 sobre la migración celular en las líneas celulares PC3 (A) y MDA-MB-231 (B). La reexpresión de Gfi1 no produjo cambios significativos en la migración celular ni en la línea PC3 Gfi1 (A) ni en la línea MDA-MB-231 Gfi1 (B). Los datos representan la media \pm la EMS de tres experimentos realizados por triplicado. Los resultados no fueron significativos.

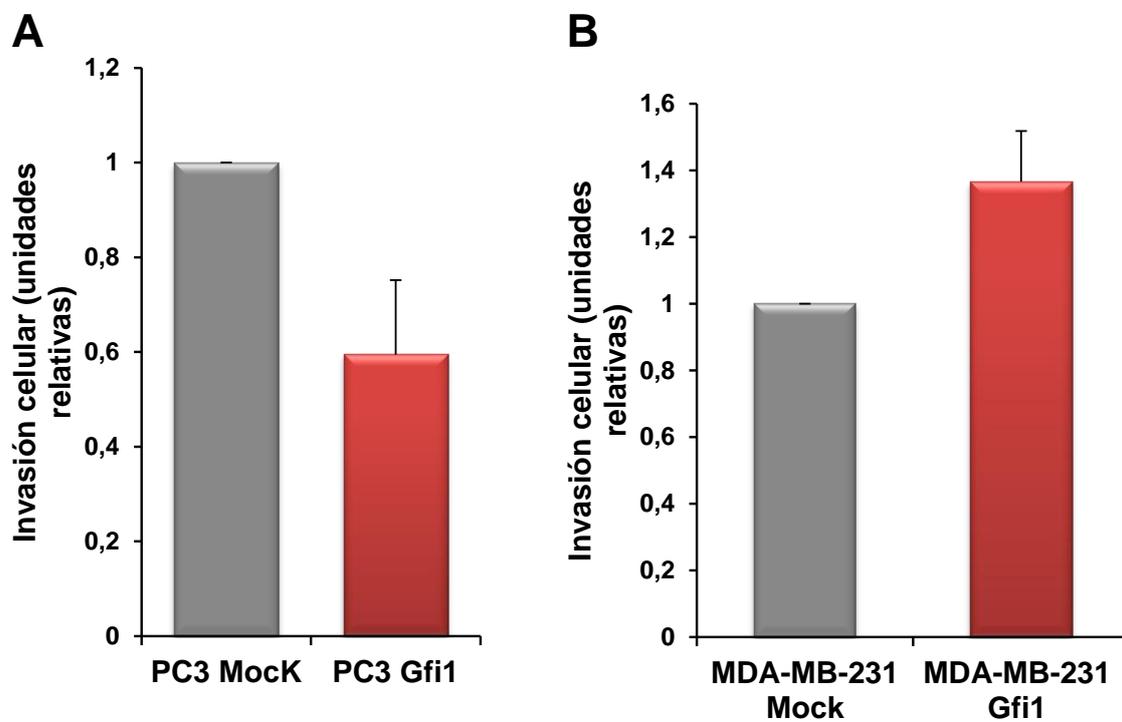


Figura 41. Efecto de la reexpresión de Gfi1 sobre la invasión celular en las líneas celulares PC3 (A) y MDA-MB-231 (B). La reexpresión de Gfi1 produjo una disminución de la invasión celular en la línea PC3 Gfi1 (A) y la aumentó en el caso de la línea MDA-MB-231 Gfi1 (B). Los datos representan la media \pm la EMS de tres experimentos realizados por triplicado. Los resultados no fueron significativos.

3.4.3. Efecto de Gfi1 sobre la capacidad tumorigénica *in vivo*

Una vez determinado el papel de Gfi1 como gen supresor de tumores *in vitro*, el siguiente paso fue trasladar nuestro modelo de trabajo a un ensayo *in vivo*. Para ello, utilizamos los mismos modelos celulares que en los ensayos *in vitro* y analizamos su capacidad para formar tumores en ratones atómicos. Con este fin, inyectamos vía subcutánea las líneas que expresan Gfi1 (PC3 Gfi1 o MDA-MB-231 Gfi1) en el flanco derecho y las células control (PC3 Mock o MDA-MB-231 Mock) en el flanco izquierdo de los ratones inmunodeprimidos (**Figuras 42B y D**). El crecimiento tumoral fue monitorizado cada 3 días, todos los ratones fueron sacrificados a los 37 días después de la inyección y los tumores fueron diseccionados y pesados. En todos los casos se produjo la formación de tumores macroscópicos al final del ensayo. Sin embargo, la expresión de Gfi1 redujo la capacidad de formar tumores de manera significativa. Así, en el momento del sacrificio, el tamaño medio de los tumores producidos a partir de la línea celular PC3 Gfi1 fue un 58% inferior a los producidos por las células control (**Figura 42A**), mientras que para el caso de los tumores producidos por la línea MDA-MB-231 Gfi1 esta disminución fue del 35% (**Figura 42C**).

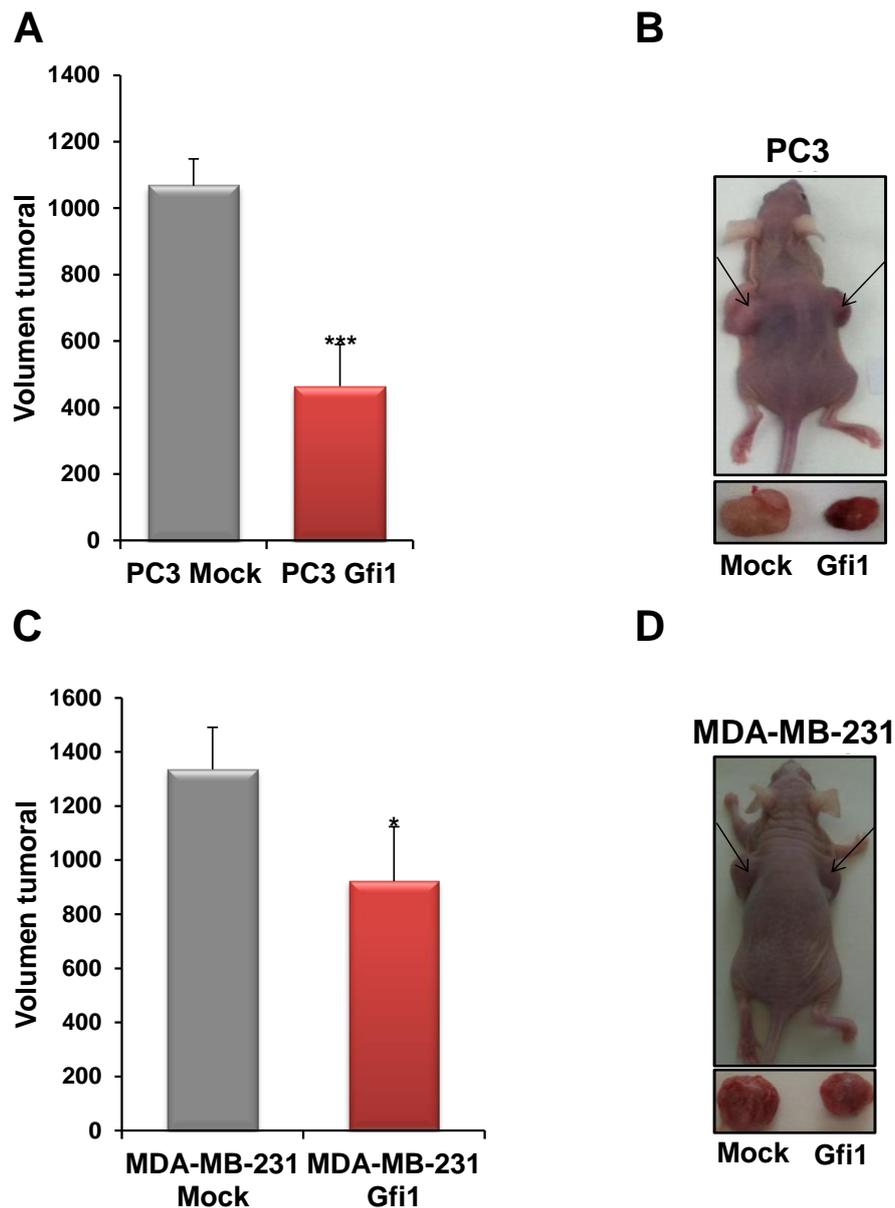


Figura 42. La reexpresión de Gfi-1 redujo el crecimiento de tumores en ratones desnudos. (A y C) Representación del volumen tumoral medio generado por las líneas celulares PC3 y MDA-MB-231 transfectadas con el vector de expresión para Gfi1 o con el vector vacío. Tumores subcutáneos generados en ratones inmunodeprimidos por las líneas celulares PC3 **(B)** y MDA-MB-231 **(D)** transfectadas de manera estable. La presencia de tumores se indica mediante una flecha. Los experimentos se realizaron en 7 ratones. *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$

3.4.4. La reexpresión de Gfi1 disminuye los niveles de mRNA de sus genes diana

Tomados en conjunto todos los datos mostrados hasta el momento indican que Gfi1 se podría comportar como un gen supresor en los tumores en próstata y mama ya que su reexpresión disminuye la viabilidad y proliferación celular, su capacidad para formar colonias y el crecimiento de tumores en ratones desnudos. Dado que Gfi1 codifica para un factor de transcripción, podría ejercer su efecto sobre el desarrollo tumoral regulando la expresión de genes implicados en estos procesos. En este sentido sabemos que en el sistema hematopoyético Gfi1 regula la expresión del gen que

codifica para la α 1-antitripsina (AAT), E2F5, α 1-antiquimotripsina (ACT), C/EBP, Ets2, c-Myc y CXCR4 (252), todos ellos implicados en la regulación de diferentes funciones relacionadas con el desarrollo tumoral. Por ello, decidimos analizar el efecto de la reexpresión de Gfi1 sobre la expresión de estos genes en nuestros modelos celulares mediante qRT-PCR. Como se aprecia en la figura 43, la reexpresión de Gfi1 redujo la expresión de los genes AAT y ATC tanto en la línea celular PC3 Gfi1 (**Figuras 43A y B**) como en la línea celular MDA-MB-231 Gfi1 (**Figuras 43C y D**).

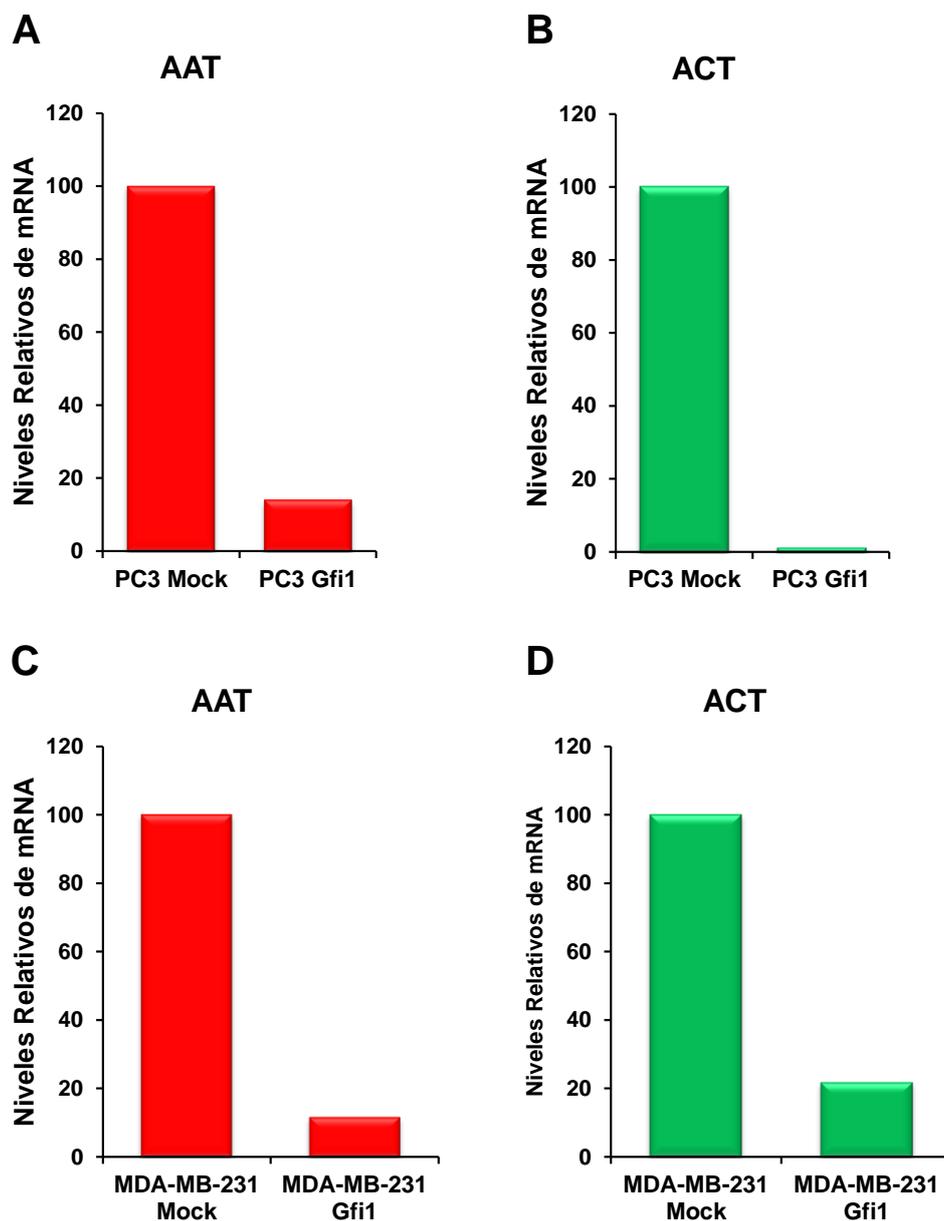


Figura 43. Niveles de mRNA de los genes AAT y ACT en las línea celulares PC3 Gfi1 (**A y B**) y MDA-MB-231 Gfi1 (**C y D**). La reexpresión de Gfi1 produjo una disminución de los niveles del mRNA de AAT y ACT tanto en la línea celular de cáncer de próstata (**A y B**) como en la línea celular de cáncer de mama (**C y D**). Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Por último, se ha descrito que la represión del factor de transcripción Neurog3 por Gfi1 provoca la diferenciación neuroendocrina de la mucosa intestinal (253). Dado que la diferenciación neuroendocrina se asocia con un aumento en la agresividad en CP y con el desarrollo de resistencia de estos tumores a los tratamientos hormonales, determinamos el efecto de la reexpresión de Gfi1 sobre la expresión de Neurog3 en nuestros modelos celulares y observamos una disminución en los niveles del mRNA de este gen en las células que expresan Gfi1 (**Figura 44**).

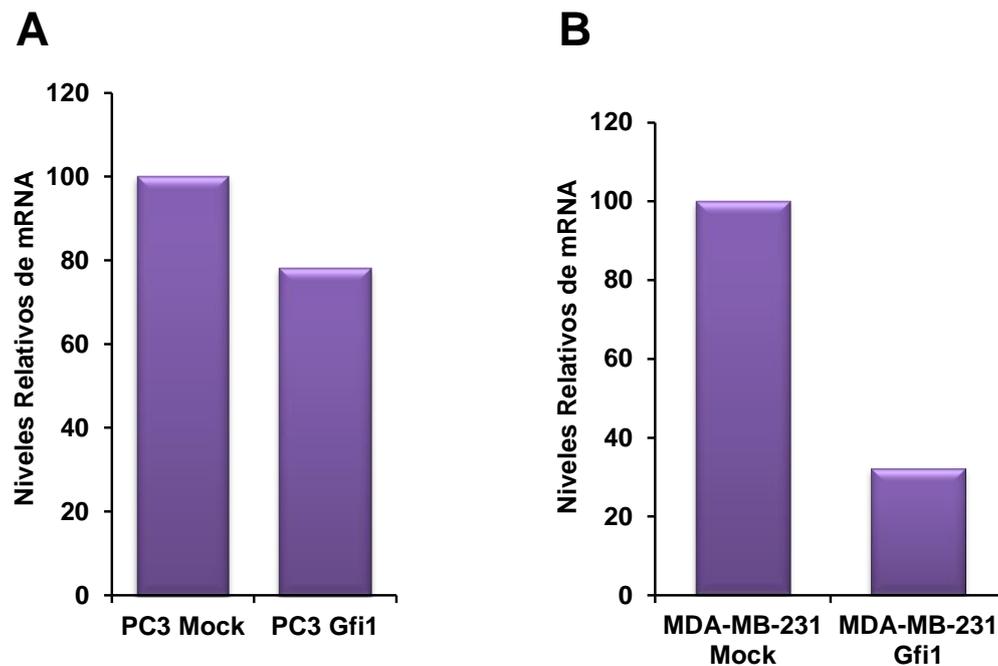


Figura 44. Niveles de mRNA del gen Neurog3 como diana de Gfi1 en la línea celular PC3 Gfi1 (A) y MDA-MB-231 Gfi1 (B). La reexpresión de Gfi1 produjo una disminución de los niveles del mRNA de Neurog3 tanto en la línea celular de cáncer de próstata (A) como en la línea celular de cáncer de mama (B). Se muestra un experimento representativo de tres realizados por triplicado.

Por tanto, podemos sugerir que la pérdida de expresión de Gfi1 por metilación podría estar implicada en el desarrollo del CP y mama mediante el control de la expresión de genes con importantes funciones en el desarrollo y función normal de estos tejidos.

3.5. Relación entre la hipermetilación de Gfi1 y el pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata

Por último, quisimos determinar el posible papel de Gfi1 como biomarcador en el manejo clínico de los pacientes con CP. Dado, que como hemos demostrado está metilado en un elevado porcentaje de tumores de próstata y mama, podría ser utilizado para el diagnóstico de estos dos tipos de tumores, aunque su utilidad estaría limitada a muestras de biopsias y no sería útil para el diagnóstico en suero. En cuanto a su papel en la definición del pronóstico, solo pudimos realizar este análisis con los tumores de próstata ya que no disponíamos de los datos clínicos de los tumores de

mama incluidos en este estudio. Como ya mostramos en la tabla 5 Gfi1 está metilado con mayor frecuencia en tumores de próstata con elevado índice Ki-67 ($p=0,0015$) mientras que no mostró ninguna relación con el resto de parámetros clínicos analizados (índice de Gleason y estado tumoral). Además, al análisis de Kaplan Meier (**Figura 45**) muestra que tanto la supervivencia global ($p < 0,05$) (**Figura 45A**) como el TLPC ($p < 0,01$) (**Figura 45B**) fueron menores en los pacientes que tenían Gfi1 metilado. Por tanto, y aunque estos datos habría que confirmarlos en un estudio multicéntrico que incluyera un gran número de pacientes, estos resultados sugieren que la metilación de Gfi1 podría ayudar a predecir la recurrencia de los pacientes con CP.

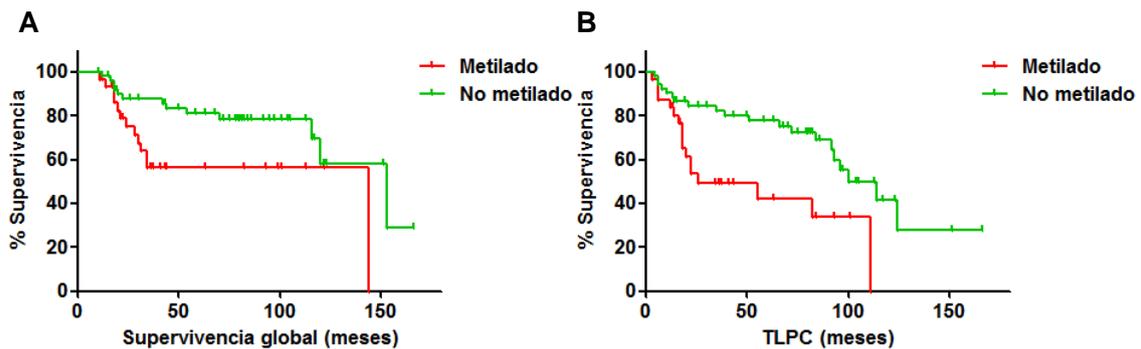


Figura 45. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la relación entre la metilación del gen Gfi1 y la supervivencia global (A) y el TLPC (B) de los pacientes con CP. Los pacientes que presentan metilación de Gfi1 y los que no presentan metilación están representados por las líneas roja y verde, respectivamente. El fallecimiento de los pacientes está representado como líneas verticales cortas. El tiempo está expresado en meses. La supervivencia global (**A**) y el TLPC (**B**) fueron menores en los pacientes que tienen metilado Gfi1. Supervivencia global * $p < 0,05$; TLPC ** $p < 0,01$

DISCUSIÓN

En la actualidad, uno de los grandes retos de la ciencia es determinar las alteraciones moleculares responsables del desarrollo del cáncer en general y del de próstata en particular. El conocimiento de estas alteraciones posibilita por un lado el desarrollo de terapias cada vez más específicas y personalizadas; y, por otro lado, el uso de estas alteraciones como biomarcadores en el manejo clínico de los pacientes con CP. Pensamos que sólo así estaremos en condiciones de afrontar los nuevos retos que plantea esta patología en el siglo XXI.

Son diversos los factores de riesgo que pueden favorecer la aparición del CP. Entre ellos encontramos la edad avanzada, la raza, la localización geográfica, la alimentación o los antecedentes familiares. En este sentido, el estudio de las alteraciones epigenéticas asociadas al desarrollo del CP resulta especialmente interesante ya que es bien conocido que con la edad se produce una acumulación de alteraciones en las modificaciones epigenéticas. Además, existen un gran número de trabajos que indican que la exposición a determinados factores ambientales también provoca cambios en las modificaciones epigenéticas. Por ello, en este trabajo nos hemos centrado en el papel que desempeña la metilación del DNA en el desarrollo del CP y en la búsqueda de nuevos marcadores para el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad.

1. Perfil de metilación en cáncer de próstata

No existe una única técnica que nos permita el estudio de una modificación epigenética, sino que, por el contrario, existen diversos procedimientos que se ajustan a las necesidades y fines que el propio investigador se proponga para lograr el objetivo de su estudio. En cuanto a la metilación del DNA, existe una amplia gama de métodos que permiten determinar desde el estado de metilación de una secuencia determinada hasta definir el perfil de metilación de una muestra. Así, según la información que nos proporcionan estos métodos los podemos clasificar en: aquellos que nos informan sobre el grado de metilación global del DNA, aquellos que nos proporcionan información sobre el estado de metilación de secuencias específicas y los destinados al descubrimiento de nuevos “hot spots” (254).

Como ya hemos descrito, los primeros trabajos consistían en analizar el estado de metilación del promotor de genes de los que se sabía que su expresión estaba alterada en cáncer y que podían comportarse como genes supresores de tumores. Con el paso de los años y a la luz de los avances tecnológicos han ido apareciendo nuevas técnicas que permiten aproximaciones globales al estudio de las alteraciones de la metilación del DNA.

Entre estos métodos encontramos aquellos basados en la utilización de enzimas de restricción que son sensibles al estado de metilación de las citosinas presentes en la secuencia que reconocen, como *Restriction Landmark Genomic Scanning* (RLGS), *Differential Methylation Hybridization* (DMH), o el *Amplification of Intermethylated*

Sites (AIMS). Aunque estos estudios permitieron definir el perfil de metilación de un gran número de patologías, presentan algunas limitaciones como el reducido número de nuestras que se pueden analizar a la vez, que las CpGs que se pueden analizar están restringidas a las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción utilizadas y en algunos casos a la complejidad experimental que algunas de ellas presentan (255, 256, 257). El uso conjunto de los array de expresión del mRNA, previo tratamiento de las muestras con el agente desmetilante del DNA 5-aza-2-deoxicitidina y con tricostatina A (TSA) es otra herramienta muy útil en el desenmascaramiento de genes metilados en cáncer, pero en este caso solo nos da idea del estado de metilación de los promotores ya que lo que determinan estos ensayos son cambios en la expresión (258, 259).

En este sentido, y ante la diversidad de técnicas desarrolladas, sin lugar a dudas uno de los grandes avances ha sido la incorporación de los arrays de metilación que permiten el estudio de los patrones de metilación del DNA a lo largo de todo el genoma. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos utilizado el array de metilación disponible en ese momento, el *GodenGate Methylation Cancer Panel I*, que permite determinar simultáneamente el estado de metilación de 1505 CpGs presentes en la región promotora de 807 genes. Una de las grandes ventajas de este método es que nos permitió determinar el perfil de metilación de pacientes con cáncer de próstata empleando muestras incluidas en parafina. Conforme con los estudios de otros grupos en los que han validado y demostrado la especificidad y sensibilidad de esta técnica (260, 261), los resultados que hemos obtenido con esta plataforma han mostrado una alta correlación con los obtenidos mediante las técnicas utilizadas para la validación (MSP, secuenciación y Sequenom). También hemos encontrado un alto grado de solapamiento entre los resultados obtenidos en líneas celulares y las muestras de tumores. Por último, entre los genes seleccionados encontramos algunos como GSTP1, RAR β 2, APC, SCGB3A1, RASSF1, CDH13, CAV1, MDR1 cuya metilación aberrante ya había sido descrita en CP, lo que, en conjunto, indica que este método era una buena herramienta para la búsqueda e identificación de nuevos genes hipermetilados en CP (201).

Una vez definido el perfil de metilación de los tumores de próstata seleccionamos un grupo de genes para un estudio más detallado, y de igual modo a como hicimos en el desarrollo de los resultados hemos dividido la discusión en dos grandes bloques en los que primero discutiremos el posible uso de los genes seleccionados como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en esta patología, y en segundo lugar analizaremos la relevancia funcional de la pérdida de expresión por metilación de Gfi1 en los tumores de próstata y mama.

2. Identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata

La incidencia del CP ha aumentado más de un 100% en los últimos 10 años debido, fundamentalmente, a la realización de un diagnóstico precoz fomentado por una mejora en los métodos de detección temprana de la enfermedad. Un biomarcador es cualquier característica biológica que pueda ser medida objetivamente y evaluada como un indicador de un proceso normal, de un proceso patológico o como respuesta farmacológica a una intervención terapéutica.

A día de hoy, desafortunadamente, no existe ningún biomarcador que pueda ser usado como herramienta de diagnóstico y que pueda predecir la progresión del CP de forma fiable. El biomarcador más usado actualmente para la detección y monitorización del tratamiento del CP es la determinación en suero de los niveles de PSA (262). En la actualidad, en la detección del CP se utiliza la determinación del PSA junto con un examen rectal digital (DRE) (263, 264). Sin embargo, hay una gran polémica y controversia en cuanto a si el PSA es o no una buena herramienta ya que no existe un umbral de los niveles de PSA que definan con absoluta certeza si un paciente tiene o no CP (265). Aunque los niveles elevados de PSA en suero son indicativos de la presencia de células cancerosas, existen estudios que demuestran que una proporción de hombres que no tienen CP presentan elevados niveles de PSA en suero (266) y que el 22% de los hombres con cáncer de próstata presentan unos niveles de PSA bajos (202). Además, sus concentraciones séricas pueden aumentar durante la BPH y la prostatitis (267, 268).

Hasta el momento se han identificado un gran número de genes hipermetilados en CP. De todos ellos, la hipermetilación de GSTP1 es la alteración epigenética más ampliamente estudiada y el biomarcador epigenético mejor establecido ya que se encuentra metilado en más del 90% de los tumores de próstata y en las lesiones premalignas (PIN y PIA), pero no lo está en tejidos normales (269). APC es otro de los genes frecuentemente metilados (30%) en CP que además se ha relacionado con la recurrencia bioquímica. Sin embargo, su uso como biomarcadores de diagnóstico es limitado ya que su metilación no es un evento exclusivo de esta enfermedad. Por ejemplo, GSTP1 y APC se encuentran hipermetilados en cáncer de mama, colon y tumores gastrointestinales (208, 270) lo que limita su uso como biomarcadores en fluidos biológicos.

Nosotros hemos demostrado por primera vez que GSTM2 y PENK están frecuentemente metilados en los tumores de próstata (85,5% y 42,1% respectivamente). Pero quizás el dato más interesante para nuestro estudio es que la metilación conjunta de GSTM2 y PENK se produce en el 40.9% de los tumores analizados (271). Aunque es necesario validar estos datos en una muestra más amplia

que incluya pacientes de diferentes instituciones, estos resultados abren la puerta al posible uso de la metilación conjunta de estos dos genes como marcadores para el diagnóstico de CP, lo que podría aumentar la especificidad sobre todo cuando se utilizan fluidos biológicos.

Además, desde el punto de vista funcional, hemos encontrado una correlación entre la hipermetilación de los promotores de GSTM2 y PENK y sus niveles de expresión tanto en nuestro modelo celular como en las muestras normales y tumorales de próstata. Las líneas celulares y los tumores que presentan unos niveles de metilación elevados son los que presentan unos menores niveles de expresión de GSTM2 y PENK. En las líneas celulares, además, el tratamiento con un agente desmetilante induce la expresión de estos genes lo que demuestra que la pérdida de expresión de estos genes se debe a la metilación del promotor. En conjunto, estos resultados también indican que nuestro modelo celular ha resultado ser una herramienta muy útil en el estudio de las alteraciones en la metilación del DNA asociadas al desarrollo de esta patología.

En cuanto a la relevancia funcional de la pérdida de expresión de estos dos genes, GSTM2 codifica para la glutatión S-transferasa de clase mu, una enzima implicada en los procesos de detoxificación por conjugación con glutatión de compuestos electrofílicos, incluidos carcinógenos, fármacos, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo (241). Por tanto, el silenciamiento epigenético de GSTM2 podría sensibilizar a las células prostáticas al daño celular causado por estos compuestos y podría explicar, al menos en parte, la contribución de los estilos de vida y la dieta en la carcinogénesis prostática y la relación de estos factores de riesgo con la alteración de los patrones de metilación del DNA en CP (272). En este sentido, se ha propuesto que la expresión de GSTM2 protege al DNA de la formación de aductos inducidos por el benzopireno diolepóxido (BPDE) en células de cáncer de pulmón (273). Otro estudio publicado recientemente indica que GSTM2 previene la autofagia inducida por el aminocromo en las células de glioblastoma (274).

El desarrollo funcional de la próstata está regulado por la interacción estroma-epitelio mediado por un estricto control hormonal regulado en su mayor parte por las células del estroma. La proencefalina PENK, que, entre otras funciones, está implicada en la percepción del dolor, la respuesta al estrés y a apoptosis mediada por p53, es una hormona que también participa en la comunicación intercelular y, por tanto, tiene un papel clave en el desarrollo (242). En concreto, en la próstata son las células estromales las responsables de la expresión de PENK. PENK interactúa con CD10, una encefalina que se expresa en las células del epitelio luminal de la próstata (275). La actividad conjunta de PENK y CD10 podría constituir una vía de señalización en la interacción estroma-epitelio en la próstata normal. Dado que esta interacción es fundamental para el desarrollo y función de la próstata, la pérdida de expresión y función de PENK y/o CD10 podría ser decisiva en el desarrollo del CP. Apoyando esta

premisa, hay estudios que indican que las células epiteliales cancerígenas no expresan CD10 (275). Otros trabajos indican que en pacientes con CP y en sus etapas más agresivas los niveles de expresión de PENK disminuyen o se vuelven casi indetectables (276). Nuestros datos confirman los obtenidos en estos estudios previos, pero además hemos demostrado que esta pérdida de expresión de PENK en CP se debe a la metilación de su promotor. En este sentido, se ha demostrado que en cáncer de páncreas la disminución de los niveles de expresión de PENK son consecuencia de su metilación (277).

Por todo ello, la pérdida funcional de GSTM2 y PENK por metilación de sus respectivos promotores podría ser una alteración epigenética importante en el desarrollo del CP que, además, se podría utilizar en el diagnóstico ya que están metilados conjuntamente en el 40,9% de los tumores analizados.

Otro de los grandes retos es encontrar biomarcadores que permitan predecir el comportamiento de la enfermedad. Hasta el momento el índice de Gleason es el sistema de gradación tumoral que más se utiliza en clínica como marcador de pronóstico en CP. Este índice está basado en las diferencias histológicas entre las células normales y tumorales y permite determinar el grado de diferenciación tumoral. Sin embargo, existe una gran variabilidad, ya que a la hora de analizar las muestras hay cierta subjetividad dependiendo del patólogo que las analice. Además, dada la heterogeneidad de los tumores puede que el grado definido en la biopsia no se corresponda o que no refleje correctamente el grado que pudiera mostrar la muestra de la próstata entera (7, 8). En este sentido, un estudio encontró que el índice Gleason de las biopsias coincidía solo en el 50% con el obtenido en la muestra tumoral tras la prostatectomía (278). Una alternativa sería la determinación de los niveles séricos de PSA pero también ha mostrado una limitada utilidad. En cuanto a las alteraciones genéticas, la presencia del gen de fusión TMRSS2/ERG permite identificar tumores de próstata más agresivos. Sin embargo, su aplicación puede ser complicada en muestras incluidas en parafina, y puede plantear problemas con la heterogeneidad del tumor (279). De aquí la urgente necesidad de buscar nuevos biomarcadores que permitan predecir el comportamiento tumoral, que mejoren las características de los actualmente utilizados en clínica y que se puedan determinar en muestras obtenidas mediante métodos mínimamente invasivos como son la orina, suero o fluido seminal.

Aunque la hipermetilación del DNA es un evento temprano en el proceso tumorigénico, también es evidente que esta alteración acompaña e incluso dirige la progresión tumoral. En este sentido, hay un gran número de estudios que han encontrado una estrecha relación entre la metilación del DNA y el estado tumoral que la convierte en una excelente herramienta para mejorar la evaluación del pronóstico en CP. La hipermetilación de RASSF1A, GSTP1, RAR β y CDH13 se produce con mayor frecuencia en pacientes con un elevado índice de Gleason (280). Existe una asociación

entre la hipermetilación de los genes FLNC, EFS, ECRG4, PITX2, PDLIM4, KCNQ1 y la recurrencia tanto local como sistémica en CP (211). La metilación de la glicoproteína CD44 y de PTGS2 predice la recurrencia bioquímica en pacientes con CP que han sufrido una prostatectomía radical e identifica aquellos con cánceres más agresivos (218).

En este trabajo nosotros hemos seleccionado paneles de genes que presentan una mayor frecuencia de metilación en pacientes de CP con características clinicopatológicas asociadas a un peor pronóstico como son el elevado índice de Gleason, estadios tumorales avanzados y elevados niveles del antígeno prostático Ki-67. Sin embargo, las listas de genes seleccionados son demasiado grandes para su uso como biomarcadores ya que el uso simultáneo de más de cuatro genes podría comprometer la especificidad, mientras que reduciendo el número ganamos en sensibilidad. Los estudios en los que se ha analizado el uso de paneles de genes para el diagnóstico y pronóstico muestran que, aunque se aumenta la sensibilidad se produce una pérdida de la especificidad (195). Por ello, de las listas de genes mostradas en las tablas 7 y 8, hemos seleccionado CFTR y HTR1B como biomarcadores prometedores para distinguir entre CP agresivos e indolentes ya que su frecuencia de hipermetilación es mayor en los pacientes con elevado índice de Gleason y con altos niveles de Ki-67 y que por tanto presentan un peor pronóstico de la enfermedad. Además, en los pacientes que tenían estos dos genes metilados tanto la supervivencia global como el tiempo libre de progresión clínica fueron menores.

En este caso el silenciamiento génico de CFTR y HTR1B por metilación de su promotor ya ha sido descrito en otros tipos tumorales. En concreto CFTR está metilado en tumores de hígado y pulmón y se ha propuesto como un potencial biomarcador de diagnóstico altamente específico en cáncer de hígado (281, 282). En cáncer de pulmón la metilación de CFTR es significativamente mayor en los carcinomas de células escamosas y se ha asociado con una menor supervivencia de los pacientes más jóvenes con NSCLC, lo que sugiere su posible papel como factor pronóstico en este grupo de pacientes (282). Por otro lado, HTR1B está frecuentemente metilado en pacientes con cáncer de pulmón, pero no ha sido definido su papel en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad (283). Sin embargo, la metilación simultánea de CFTR y HTR1B no ha sido descrita hasta el momento en ningún tipo tumoral, por lo que su uso como biomarcador de pronóstico en CP podría aumentar la especificidad y sensibilidad de los métodos descritos anteriormente, pero no podrían ser utilizados para el diagnóstico ya que no están metilados en los pacientes que presentan un mejor pronóstico.

3. Relevancia funcional de la pérdida de expresión de Gfi1 por metilación

Muchos son los estudios que se han centrado en intentar dilucidar cuales son los factores responsables del inicio y la progresión del CP. La edad avanzada y la raza son los factores de riesgo más determinantes en el desarrollo del CP y pueden estar

influyendo tanto en los factores genéticos como epigenéticos (284). Con la edad, en el tejido prostático normal se producen cambios en la metilación de determinados genes como GSTP1, RAR β 2, RASSF1A, NK2 homeobox 5 (NKX-2-5) y ESR1. Esta metilación producida durante el envejecimiento podría preceder y predisponer al desarrollo del CP (285). Por otro lado, los perfiles de metilación son diferentes entre los hombres afroamericanos y los de origen caucásico. Estas alteraciones epigenéticas asociadas a la raza se han correlacionado con diferencias tanto en el pronóstico como con la supervivencia (286, 287). Por tanto, el estudio del papel que juega la metilación del DNA en el desarrollo de este tipo de tumores tiene especial relevancia para conocer su etiología. Como ya describimos en la introducción, hasta el momento se han identificado un gran número de genes inactivados por metilación en cáncer, sin embargo, no todos ellos tienen un papel conductor en el desarrollo de esta enfermedad. Así, hay genes para los que se ha descrito un papel clave en el desarrollo del cáncer mientras que para otros muchos aún no se ha conseguido determinar su papel, pero han mostrado su utilidad como marcadores.

En este trabajo, nosotros hemos demostrado que la hipermetilación del promotor de Gfi1 es un evento común en CP y mama. El CP y el de mama son los dos tipos de tumores endocrinos mejor caracterizados, que comparten grandes similitudes en cuanto a su epidemiología, ya que representan uno de los tumores más diagnosticados en hombres y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, respectivamente (288), y también en cuanto a su etiología ya que estos dos tipos de tumores son dependientes de hormonas para su crecimiento, lo que ha propiciado el diseño de terapias específicas encaminadas a subsanar esta dependencia (10, 289, 290, 291). También hemos demostrado que el silenciamiento epigenético de Gfi1 podría tener un papel relevante en el desarrollo de este tipo de tumores ya que la reexpresión en las células en las que está metilado disminuye el crecimiento tumoral. Además, podemos sugerir que el silenciamiento epigenético de Gfi1 no es un evento general en cáncer ya que no está metilado en las muestras de pacientes con cáncer de colon ni en las líneas celulares correspondientes a otros tipos tumorales analizadas.

Gfi1 es un represor transcripcional con importantes funciones en el desarrollo y diferenciación del sistema hematopoyético y algunos tejidos sólidos como las células de la membrana del oído interno, el pulmón y el intestino (244). La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de su papel en sistema hematopoyético. En concreto, Gfi1 es fundamental para el correcto desarrollo de células B y T en la médula ósea y en el timo. Su pérdida de expresión induce la muerte celular, una disminución en la proliferación celular y el bloqueo en la diferenciación de las células T (292). Además, las mutaciones en el gen que codifica para Gfi1 están estrechamente relacionadas con la Neutropenia Congénita Grave (SNC) (293), lo que refuerza la importancia de este gen en la función del sistema hematopoyético. Aunque es menos conocido, en los últimos años se ha demostrado que también regula la diferenciación

de tejidos no hematopoyéticos. En particular Gfi1 regula la diferenciación de las células de la membrana del oído interno (246), las neuronas del ganglio coclear, las células de Purkinje del cerebelo (245), la diferenciación neuroendocrina de las células pulmonares (247) y la diferenciación enteroendocrina de las células de Golbet y de Paneth del colon e intestino delgado (248).

En cuanto a la función de Gfi1 en el desarrollo del cáncer los datos disponibles son contradictorios. Gran parte de los estudios apuntan a su papel como un oncogén como son los datos obtenidos en leucemia mieloide crónica (CML) y AML (294, 295). En este sentido, se han descrito mutaciones que producen ganancia de función de Gfi1 en pacientes con SNC (296), leucemia (294) y linfoma (297). Sin embargo, otros trabajos apuntan en sentido contrario, como el que describe que Gfi1 inhibe la proliferación de las células madre hemopoyéticas y es fundamental para su correcto funcionamiento (251). Conforme con estos datos, los ratones *KnockOut* para Gfi1 no muestran una especial predisposición a desarrollar leucemia (298). Además, la expresión de este factor de transcripción disminuye la proliferación y la formación de colonias de células que expresan la translocación p210BCR/ABL (299). Estos datos indican que Gfi1 se podría comportar como un supresor tumoral en sistema hematopoyético. En los tejidos sólidos, al igual que en sistema hematopoyético, su función en cáncer no está muy bien definida, de nuevo se ha propuesto un papel dual como oncogen o gen supresor de tumores dependiendo del tejido. En este sentido, mientras que en el NSCLC existe una pérdida de expresión y función de Gfi1, y su reexpresión da lugar a la detención del ciclo celular y a un mejor pronóstico y supervivencia de los pacientes, en el carcinoma de células pequeñas de pulmón (SCLC) mayores niveles de expresión de Gfi1 están asociados a un peor pronóstico de los pacientes (300).

En este trabajo, nosotros hemos demostrado por primera vez que Gfi1 se comporta como un gen supresor de tumores en próstata y mama ya que su reexpresión en las líneas en las que está silenciado por metilación provoca una disminución de la viabilidad y la proliferación celular y en la formación de colonias. Además, inhibe el crecimiento de tumores inducidos en ratones desnudos. Por tanto, la pérdida de expresión por metilación observada en estos dos tipos de tumores provocaría la pérdida de este papel protector favoreciendo el crecimiento del tumor.

Gfi1 inhibe la transcripción mediante el reclutamiento de complejos multiproteicos, entre los que se incluyen proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas, como las HDAC1, 2 y 3 (249, 250), la HMT G9a encargada de metilar la lisina 9 de la histona H3 (250), la HDM LSD1 que desmetila la lisina 4 de esta misma histona (301). Además, Gfi1 interacciona con otros factores de transcripción que se comportan como genes supresores de tumores. En particular, Gfi1 interactúa con PRDM5, un factor de transcripción silenciado por metilación en tumores del aparato digestivo (esófago, gástrico y hepático) (302, 303). En cuanto a su papel en cáncer de mama, Gfi1

interacciona con CBFA2T1 y CBFA2T3, dos represores de la transcripción de la familia ETO para el que se ha descrito un posible papel como supresores de tumores en cáncer de mama (304). Todas estas evidencias refuerzan la idea de que Gfi1 se pueda estar comportando como un supresor tumoral en los tumores de próstata y mama como indican nuestros resultados.

El silenciamiento génico por metilación es un evento específico del tipo tumoral (161). En el caso de Gfi1, lo hemos encontrado metilado en tumores de mama y próstata y no en el resto de tumores y líneas analizados. En estos tejidos tanto el receptor de estrógenos como el de andrógenos se comportan como factores de transcripción que una vez activados regulan la expresión de genes que regulan, entre otras funciones, el desarrollo tumoral (305, 306, 307). Como mecanismo para regular la expresión estos receptores interactúan con proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas (308, 309) de igual modo a como lo hace Gfi1, por lo que la pérdida de expresión que hemos demostrado podría tener un papel parecido al que desempeñan estos receptores en el desarrollo de estas patologías.

En cuanto al mecanismo por el que ejerce este efecto, Gfi1 regula la expresión de una amplia gama de genes entre los que se incluyen receptores de la superficie celular, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y citoquinas, entre otros (252). Nosotros hemos encontrado que Gfi1 reprime la expresión de AAT, ACT y Neurog3 en líneas celulares de CP y mama, sin observarse ningún cambio en la expresión de genes con funciones específicas en el sistema hematopoyético como son E2F5, Ets2, C/EBP y c-Myc. El silenciamiento de Gfi1 por hipermetilación se asocia con la expresión de estos tres genes, mientras que la reexpresión de Gfi1 provoca una disminución en sus niveles. En este sentido, hay estudios que sugieren que el aumento en la expresión de AAT y ACT está asociado a la tumorigenicidad de varios tipos de tumores (310, 311). En concreto, AAT es un inhibidor de proteasas cuya expresión está relacionada con la respuesta inflamatoria, a infecciones y la transformación de células tumorales. En cuanto a su papel en cáncer, AAT puede inducir la proliferación e invasividad de las células de cáncer de mama mediante el control de la actividad de NF- κ B (312). Además, se ha demostrado un aumento en los niveles séricos de AAT en pacientes con cáncer de pulmón y próstata (313).

Por otro lado, ACT también codifica para un inhibidor de proteasas cuya expresión se induce por estrógenos en células de cáncer de mama y que se ha sugerido como marcador para predecir la recurrencia en pacientes con este tipo de tumores (314). Aunque no hay datos sobre la función de ACT en CP si se ha descrito que ACT estabiliza los niveles de PSA en suero y que la presencia del complejo formado por ACT-PSA en el suero de pacientes con CP es mayor que el PSA libre, lo que sugiere una relación entre ACT y el CP (315).

Por último, Neurog3 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación neuroendocrina cuya expresión está regulada por Gfi1 en el epitelio intestinal. En este tejido la pérdida de expresión de Gfi1 está asociada a la diferenciación neuroendocrina mediante un aumento en la expresión de Neurog3 (253). En el CP, el fenotipo neuroendocrino también se ha asociado con un aumento de los niveles de Neurog3 (316). Dado que la diferenciación neuroendocrina se ha asociado con un comportamiento más agresivo en el CP, la pérdida de expresión de Gfi1 por hipermetilación podría tener un papel crucial en este proceso mediante un aumento en la expresión de Neurog3. Aunque es necesario realizar estudios adicionales para determinar el papel exacto del silenciamiento de Gfi1 en CP y de mama, nuestros resultados aportan nuevos datos para conocer la etiología de estos dos tipos de tumores.

La mortalidad de los pacientes con cáncer está causada fundamentalmente por la capacidad invasiva de los tumores que conlleva a una destrucción local o metastásica de los tejidos. Se ha propuesto que en tumores primarios los cambios en la expresión de Gfi1 podrían estar asociados con un incremento de su capacidad metastásica. En concreto, los pacientes con NSLC que expresan Gfi1 tienden a tener un mejor pronóstico y una mayor supervivencia. Además, la expresión de Gfi1 en las líneas celulares no neuroendocrinas de NSLC produce una parada del ciclo celular (247). En CP y mama no hay trabajos que muestren el papel de Gfi1 en los procesos de migración e invasión celular. Nuestros resultados indican que la reexpresión de Gfi1 en las líneas celulares de CP y de mama no produjo cambios significativos en la migración celular, sin embargo, si modificó la invasión, aunque de diferente manera; la disminuyó en el caso de la línea PC3 y la aumentó en las MDA-MB-231.

Gfi1 ejerce su actividad por medio del dominio SNAG, que es compartido por el factor de transcripción Snail y que actúa también como represor transcripcional (317). Snail reprime E-cadherina, una proteína de adhesión cuya expresión está disminuida durante la adquisición del potencial metastásico en estadios tardíos en la progresión de tumores epiteliales (318). La función represora de Gfi1 y Snail y su papel oncogénico en cáncer parece estar asociada a su dominio SNAG (319). Aunque no disponemos de datos, Gfi1 podría actuar de la misma manera que Snail reprimiendo la expresión de genes relacionados con los procesos de invasión como la E-cadherina en cáncer de mama, lo que podría explicar el aumento en la invasión provocado por la reexpresión de Gfi1. En el caso de la línea celular de CP en la que, si observamos una disminución de la invasión celular, Gfi1 podría estar reprimiendo otros genes que estén implicados en este proceso, poniendo de manifiesto de nuevo la variabilidad funcional de Gfi1 dependiendo del contexto celular.

Por otro lado, como ya hemos comentado, la expresión de Gfi1 se asocia con un mejor pronóstico y una mayor supervivencia de los pacientes con NSLC (300). En este

sentido, hemos observado que en los pacientes en los que Gfi1 está metilado tanto la supervivencia global como el periodo libre de enfermedad fueron menores que en los que no estaba metilado. Por tanto, y aunque estos datos habría que confirmarlos en un estudio multicéntrico que incluyera un gran número de pacientes, estos resultados sugieren que la metilación de Gfi1 podría predecir la recurrencia de los pacientes con CP.

En conjunto, nuestros datos indican que el silenciamiento epigenético de Gfi1 es un hecho frecuente en CP y mama, que se comporta como un gen supresor de tumores y que podría tener un papel relevante en el desarrollo de estas dos patologías mediante el control de la expresión de genes con importantes funciones en el desarrollo tumoral. Esto, unido a la inactivación epigenética de PENK y GSTM2 que hemos demostrado en CP aporta nuevos datos acerca de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de este tipo de tumores. La metilación del DNA en un proceso reversible para el que ya se han desarrollado terapias que han mostrado su efectividad en otros tipos tumorales, por lo que su aplicación en el tratamiento de los pacientes con CP tanto de forma individual como en combinación con las terapias clásicas podría mejorar el comportamiento de estos tumores.

CONCLUSIONES

1. Los arrays de metilación representan una herramienta fiable y reproducible para el estudio del perfil de metilación en diferentes sistemas experimentales.
2. La metilación de GSTM2 y PENK supone un nuevo biomarcador para el diagnóstico de CP ya que están metilados simultáneamente en el 40,9% de los tumores de próstata analizados.
3. La metilación de GSTM2 y PENK provoca su pérdida de expresión tanto en líneas celulares como en los tumores de próstata. Dada la función de GSTM2 y PENK, la pérdida de expresión de estos genes por metilación podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.
4. La metilación conjunta de CFTR y HTR1B es una valiosa herramienta para distinguir entre tumores de próstata agresivos e indolentes ya que están metilados simultáneamente en el 40,4 % de tumores con un índice de Gleason elevado. Además, tanto la supervivencia global como el TLPC fueron menores en los pacientes que tenían estos dos genes metilados.
5. Hemos caracterizado por primera vez el silenciamiento por metilación de Gfi1 en cáncer. La hipermetilación del promotor de Gfi1 no es un evento general en cáncer si no que es específico del CP y mama.
6. Gfi1 se comporta como un gen supresor de tumores en próstata y mama ya que su reexpresión en las líneas en las que está silenciado provoca una disminución de la viabilidad y proliferación celular y en la formación de colonias. Además, inhibe el crecimiento de tumores inducidos en ratones desnudos.
7. Gfi1 es un represor transcripcional que podría estar regulando el desarrollo de los tumores de próstata y mama, al menos en parte, mediante el control de la expresión de genes con importantes funciones en el correcto desarrollo de estos tejidos.
8. La metilación de Gfi1 podría predecir la recurrencia de los pacientes con CP, ya que está más frecuentemente metilado en los tumores de próstata con elevado Ki-67. Además, en los pacientes en los que Gfi1 está metilado la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad fueron menores.

BIBLIOGRAFÍA

1. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 49(3):347–57 (1968).
2. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40(3):565–75 (2011).
3. Dube VE, Farrow GM, Greene LF. Prostatic adenocarcinoma of ductal origin. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company 32(2):402–9 (1973).
4. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155(6):1985–92 (1999).
5. Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol*6(4):171–9 (2004).
6. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 150(2 Pt 1):379–85 (1993).
7. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14(19):2410–34 (2000).
8. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23(3):273–9 (1992).
9. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*1863(6):1238–60 (2016).
10. Huggins C, Hodges C V. Studies on prostatic cancer. *J Urol* 167(2):948–51 (2002).
11. Isaacs JT, Coffey DS. Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer Res* 41(12 Pt 1):5070–5 (1981).
12. Ketchandji M, Kuo Y-F, Shahinian VB, Goodwin JS. Cause of death in older men after the diagnosis of prostate cancer. *J Am Geriatr Soc* 57(1):24–30 (2009).
13. Aus G, Robinson D, Rosell J, Sandblom G, Varenhorst E, South-East Region Prostate Cancer Group. Survival in prostate carcinoma--outcomes from a prospective, population-based cohort of 8887 men with up to 15 years of follow-up: results from three countries in the population-based National Prostate Cancer Registry of Sweden. *Cancer* 103(5):943–51 (2005).
14. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 90(2):162–73 (2002).
15. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15(1):3866–71 (2008).
16. Breslow N, Chan CW, Dhom G, Drury RA, Franks LM, Gellei B, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J cancer* 20(5):680–8 (1977).
17. Ferlay J, Soerjomataram I I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. *Cancer*

- incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* (2014).
18. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, Byrnes G, Antilla A, Ferlay J, et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer* 51(9):1164–87 (2015).
 19. Waddington CH. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25(7):299–307 (1939).
 20. Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996).
 21. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447(7143):396–8 (2007).
 22. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci* 104(32):13056–61 (2007).
 23. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1):6–21 (2002).
 24. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245–54 (2003).
 25. Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech Ageing Dev* 124(10–12):989–98 (2003).
 26. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. From The Cover: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci* 102(30):10604–9 (2005).
 27. Fraga MF. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol* 21(4):446–53 (2009).
 28. HOTCHKISS RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175(1):315–32 (1948).
 29. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187(4173):226–32 (1975).
 30. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14(1):9–25 (1975).
 31. Hermann a, Gowher H, Jeltsch a. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61(19–20):2571–87 (2004).
 32. Bickle TA, Krüger DH. Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev* 57(2):434–50 (1993).
 33. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird a P, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5237–42 (2000).
 34. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341(6146):1237905 (2013).

35. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10(8):2709–21 (1982).
36. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 78(2):151–5 (1988).
37. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 60(8):1647–58 (2003).
38. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24):11995–9 (1993).
39. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25(10):1010–22 (2011).
40. Sharif J, Endo TA, Toyoda T, Koseki H. Divergence of CpG island promoters: A consequence or cause of evolution? *Dev Growth Differ* 52(6):545–54 (2010).
41. Hu S, Wan J, Su Y, Song Q, Zeng Y, Nguyen HN, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* 2:e00726 (2013).
42. Bartolomei MS. Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev* 23(18):2124–33 (2009).
43. Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211(4480):393–6 (1981).
44. Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS, Brown CJ. Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 24(6):1528–39 (2015).
45. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321(6067):209–13 (1986).
46. Doerfler W. Epigenetic consequences of foreign DNA insertions: de novo methylation and global alterations of methylation patterns in recipient genomes. *Rev Med Virol* 21(6):336–46 (2011).
47. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13(7):484–92 (2012).
48. Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1829(11):1161–74 (2013).
49. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science* (80-) 328(5980):916–9 (2010).
50. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44(11):1236–42 (2012).
51. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315(5815):1141–3 (2007).

52. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* 130(1):77–88 (2007).
53. Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, Han H, et al. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol* 29(19):5366–76 (2009).
54. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 274(46):33002–10 (1999).
55. Kim G-D, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J. European Molecular Biology Organization* 21(15):4183–95 (2002).
56. GRØNBAEK K, Hother CC changes in canceroffer, JONES PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115(10):1039–59 (2007).
57. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99(3):247–57 (1999).
58. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair K-W, Yen R-WC, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416(6880):552–6 (2002).
59. Schuebel KE, Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404(6781):1003–7 (2000).
60. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22(2):480–91 (2002).
61. Chen Z-X, Mann JR, Hsieh C-L, Riggs AD, Chédin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem* 95(5):902–17 (2005).
62. Holz-Schietinger C, Reich NO. The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 285(38):29091–100 (2010).
63. Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, et al. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res* 30(17):3831–8 (2002).
64. Aapola U, Liiv I, Peterson P. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* 30(16):3602–8 (2002).
65. Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, Cheng X. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 29(2):439–48 (2001).
66. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, et al. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311(5759):395–8

- (2006).
67. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Héroult Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science* 354(6314):909–12 (2016).
 68. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 93(12):4059–70 (1999).
 69. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 18(13):3975–82 (1990).
 70. Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65(3):395–407 (1991).
 71. Weih F, Nitsch D, Reik A, Schütz G, Becker PB. Analysis of CpG methylation and genomic footprinting at the tyrosine aminotransferase gene: DNA methylation alone is not sufficient to prevent protein binding in vivo. *EMBO J* 10(9):2559–67 (1991).
 72. Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci* 97(12):6481–6 (2000).
 73. Kirillov A, Kistler B, Mostoslavsky R, Cedar H, Wirth T, Bergman Y. A role for nuclear NF- κ B in B-cell-specific demethylation of the Igk locus. *Nat Genet* 13(4):435–41 (1996).
 74. Höller M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2(9):1127–35 (1988).
 75. Fournier A, Sasai N, Nakao M, Defossez P-A. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief Funct Genomics* 11(3):251–64 (2012).
 76. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19(2):187–91 (1998).
 77. Bird A, Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393(6683):386–9 (1998).
 78. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The Methyl-CpG-binding Protein MeCP2 Links DNA Methylation to Histone Methylation. *J Biol Chem* 278(6):4035–40 (2003).
 79. Rupon JW, Wang SZ, Gnanapragasam M, Labropoulos S, Ginder GD. MBD2 contributes to developmental silencing of the human ϵ -globin gene. *Blood Cells, Mol Dis* 46(3):212–9 (2011).
 80. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16(4):168–74 (2000).
 81. Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448(7154):714–7 (2007).
 82. Park JG, Chapman VM. CpG island promoter region methylation patterns of the

- inactive-X-chromosome hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) gene. *Mol Cell Biol* 14(12):7975–83 (1994).
83. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324(5929):929–30 (2009).
84. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* (80-) 324(5929):930–5 (2009).
85. Auclair G, Weber M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* 94(11):2202–11 (2012).
86. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. Nature Publishing Group 502(7472):472–9 (2013).
87. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(6):341–56 (2013).
88. He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* (80-) 333(6047):1303–7 (2011).
89. Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466(7310):1129–33 (2010).
90. Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32(14):4100–8 (2004).
91. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128(4):693–705 (2007).
92. Gardner KE, Allis CD, Strahl BD. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol*. NIH Public Access 409(1):36–46 (2011).
93. ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences 51(5):786–94 (1964).
94. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 1(1):19–25 (2007).
95. Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26(37):5521–7 (2007).
96. Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66(3):407–22 (2009).
97. ZHANG Y, CAO R, WANG L, JONES RS. Mechanism of Polycomb Group Gene Silencing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69(0):309–18 (2004).
98. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* 120(2):169–81 (2005).

99. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science* (80-) 293(5532):1074–80 (2001).
100. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410(6824):120–4 (2001).
101. Mishima Y, Jayasinghe CD, Lu K, Otani J, Shirakawa M, Kawakami T, et al. Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding to methylated H3K9. *Nucleic Acids Res* 43(21):10200–12 (2015).
102. Flanagan JF, Mi L-Z, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, et al. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438(7071):1181–5 (2005).
103. Siggins L, Cordeddu L, Rönnerblad M, Lennartsson A, Ekwall K. Transcription-coupled recruitment of human CHD1 and CHD2 influences chromatin accessibility and histone H3 and H3.3 occupancy at active chromatin regions. *Epigenetics Chromatin* 8(1):4 (2015).
104. Gurley LR, Walters RA, Tobey RA. Cell cycle-specific changes in histone phosphorylation associated with cell proliferation and chromosome condensation. *J Cell Biol* 60(2):356–64 (1974).
105. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106(6):348–60 (1997).
106. Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116(Pt 18):3677–85 (2003).
107. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20(4):214–20 (2004).
108. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843–54 (1993).
109. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281–97 (2004).
110. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19(1):92–105 (2009).
111. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3):219–30 (2008).
112. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 100(17):9779–84 (2003).
113. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24):3011–6 (2003).
114. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and

- paradigms. *Nat Rev Genet* 10(5):295–304 (2009).
115. Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 8(2):188–94 (2006).
 116. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta*. (2014).
 117. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439(7078):871–4 (2006).
 118. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39(2):232–6 (2007).
 119. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7(1):21–33 (2006).
 120. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128(4):683–92 (2007).
 121. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31(1):27–36 (2010).
 122. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72:141–96 (1998).
 123. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301(5895):89–92 (1983).
 124. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11(19):6883–94 (1983).
 125. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 48(5):1159–61 (1988).
 126. Narayan A, Ji W, Zhang XY, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, et al. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J cancer* 77(6):833–8 (1998).
 127. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, San Jose-Eneriz E, et al. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 32(3):487–90 (2008).
 128. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, et al. DNA Hypomethylation and Ovarian Cancer Biology. *Cancer Res* 64(13):4472–80 (2004).
 129. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395(6697):89–93 (1998).
 130. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 358(11):1148–59 (2008).
 131. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science* (80-) 300(5618):455–455 (2003).
 132. Issa J-P. Colon Cancer: It's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res* 14(19) (2008).

133. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 100(23):1734–8 (2008).
134. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation. *Science* (80-) 300(5618):489–92 (2003).
135. Soares J, Pinto AE, Cunha C V, André S, Barão I, Sousa JM, et al. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer* 85(1):112–8 (1999).
136. Kim M-J, White-Cross JA, Shen L, Issa J-PJ, Rashid A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol* 22(3):442–9 (2009).
137. Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA. High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* 39(3):166–74 (1999).
138. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1775(1):138–62 (2007).
139. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression 31(2):175–9 (2002).
140. Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rümmele P, Blaszyk H, Hartmann A, et al. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol* 205(5):606–14 (2005).
141. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 299(5613):1753–5 (2003).
142. Ito Y, Koessler T, Ibrahim AEK, Rai S, Vowler SL, Abu-Amero S, et al. Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 17(17):2633–43 (2008).
143. Reichard JF, Schnekenburger M, Puga A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 352(1):188–92 (2007).
144. Coppin J-F, Qu W, Waalkes MP. Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *J Biol Chem* 283(28):19342–50 (2008).
145. Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett JC, Waalkes MP. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 25(9):1779–86 (2004).
146. Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 41(1):79–105 (2012).
147. Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 193(3):1184–90 (1993).

148. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48(5):880–8 (1991).
149. de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, Wouters KAD, de Goeij AFPM, van den Brandt PA, et al. MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol* 20(7):1216–22 (2009).
150. Long C, Yin B, Lu Q, Zhou X, Hu J, Yang Y, et al. Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 25(8):685–90 (2007).
151. Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair K-W, van Engeland M, Esteller M, et al. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 23(23):8429–39 (2003).
152. Yu D-H, Waterland RA, Zhang P, Schady D, Chen M-H, Guan Y, et al. Targeted p16Ink4a epimutation causes tumorigenesis and reduces survival in mice. *J Clin Invest* 124(9):3708–12 (2014).
153. Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4045–50 (1996).
154. Melki JR, Warnecke P, Vincent PC, Clark SJ. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* 12(3):311–6 (1998).
155. Qu Y, Mu G, Wu Y, Dai X, Zhou F, Xu X, et al. Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. *Am J Clin Pathol* 134(5):826–34 (2010).
156. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell. NIH Public Access* 153(1):38–55 (2013).
157. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295(5557):1079–82 (2002).
158. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 20(4):434–9 (2010).
159. Ohm JE, Baylin SB. Stem Cell Chromatin Patterns: An Instructive Mechanism for DNA Hypermethylation? *Cell Cycle* 6(9):1040–3 (2007).
160. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* 125(2):315–26 (2006).
161. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer 61(8):3225–9 (2001).
162. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the

- CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55(20):4525–30 (1995).
163. Ropero S, Setien F, Espada J, Fraga MF, Herranz M, Asp J, et al. Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Hum Mol Genet* 13(22):2753–65 (2004).
 164. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37(4):391–400 (2005).
 165. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 3(6):300–9 (2008).
 166. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, et al. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet* 38(5):566–9 (2006).
 167. Ropero S, Ballestar E, Alaminos M, Arango D, Schwartz S, Esteller M. Transforming pathways unleashed by a HDAC2 mutation in human cancer. *Oncogene* 27(28):4008–12 (2008).
 168. Carlson S, Glass KC. The MOZ histone acetyltransferase in epigenetic signaling and disease. *J Cell Physiol*. NIH Public Access 229(11):1571–4 (2014).
 169. Marmorstein R, Zhou M-M. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(7):a018762 (2014).
 170. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, et al. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 37(11):974–83 (2007).
 171. McGrath J, Trojer P. Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacol Ther* 150:1–22 (2015).
 172. Hayami S, Kelly JD, Cho H-S, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company 128(3):574–86 (2011).
 173. Tian X, Zhang S, Liu H-M, Zhang Y-B, Blair CA, Mercola D, et al. Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention. *Curr Cancer Drug Targets* 13(5):558–79 (2013).
 174. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. Nature Publishing Group 22(1):6–11 (2015).
 175. Zhou X, Ren Y, Moore L, Mei M, You Y, Xu P, et al. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest*. Nature Publishing Group 90(2):144–55 (2010).
 176. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 7(17):2643–6 (2008).
 177. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, et al. Genetic

- Unmasking of an Epigenetically Silenced microRNA in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 67(4):1424–9 (2007).
178. Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer--- concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 92(18):1460–1 (2000).
179. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 123(1):8–13 (2008).
180. Erdmann A, Halby L, Fahy J, Arimondo PB. Targeting DNA Methylation with Small Molecules: What's Next? *J Med Chem* 58(6):2569–83 (2015).
181. Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire J-M, et al. DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie* 94(11):2280–96 (2012).
182. Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 43(6):395–422 (2007).
183. Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4681–5 (1997).
184. Walker C, Nettesheim P. In vitro transformation of primary rat tracheal epithelial cells by 5-azacytidine. *Cancer Res* 46(12 Pt 1):6433–7 (1986).
185. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 68(1):1–11 (2008).
186. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5(1):37–50 (2006).
187. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone Deacetylase Inhibitors. In: *Advances in cancer research* p. 137–68 (2004).
188. Hagelkruys A, Sawicka A, Rennmayr M, Seiser C. The Biology of HDAC in Cancer: The Nuclear and Epigenetic Components. In: *Handbook of experimental pharmacology* p. 13–37 (2011).
189. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 1(7):598–607 (2011).
190. Chen M-Y, Liao WS-L, Lu Z, Bornmann WG, Hennessey V, Washington MN, et al. Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy. *Cancer* 117(19):4424–38 (2011).
191. Chan TA, Glockner S, Yi JM, Chen W, Van Neste L, Cope L, et al. Convergence of Mutation and Epigenetic Alterations Identifies Common Genes in Cancer That Predict for Poor Prognosis. *Gazdar AF, editor. PLoS Med* 5(5):e114 (2008).
192. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10(7):687–92 (2001).
193. Aryee MJ, Liu W, Engelmann JC, Nuhn P, Gurel M, Haffner MC, et al. DNA methylation

- alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastases. *Sci Transl Med* 5(169):169ra10 (2013).
194. Li L-C, Zhao H, Shiina H, Kane CJ, Dahiya R. PGDB: a curated and integrated database of genes related to the prostate. *Nucleic Acids Res* 31(1):291–3 (2003).
 195. Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. *BJU Int* 105(10):1364–70 (2010).
 196. Issa J-P. DNA Methylation As a Clinical Marker in Oncology. *J Clin Oncol* 30(20):2566–8 (2012).
 197. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9821–6 (1996).
 198. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, et al. Preoperative Serum DNA GSTP1 CpG Island Hypermethylation and the Risk of Early Prostate-Specific Antigen Recurrence Following Radical Prostatectomy. *Clin Cancer Res* 11(11):4037–43 (2005).
 199. Rouprêt M, Hupertan V, Catto JWFF, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer* 122(4):952–6 (2008).
 200. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Association of circulating tumor cells with tumor-related methylated DNA in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Int J Urol* 17(5):466–75 (2010).
 201. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, et al. Epigenetics in prostate cancer. *Prostate Cancer* 2011:580318 (2011).
 202. Henrique R, Jerónimo C. Molecular Detection of Prostate Cancer: A Role for GSTP1 Hypermethylation. *Eur Urol* 46(5):660–9 (2004).
 203. Wu T, Giovannucci E, Welge J, Mallick P, Tang W-Y, Ho S-M. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br J Cancer* 105(1):65–73 (2011).
 204. Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem* 91(3):540–52 (2004).
 205. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li L-C, et al. Multigene Methylation Analysis for Detection and Staging of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 11(18):6582–8 (2005).
 206. Goessl C, Krause H, Müller M, Mu M, Schrader M, Sachsinger J. Fluorescent Methylation-specific Polymerase Chain Reaction for DNA-based Detection of Prostate Cancer in Bodily Fluids Advances in Brief Fluorescent Methylation-specific Polymerase Chain Reaction for DNA-based Detection of Prostate Cancer in Bodily Fluids. 5941–5 (2000).
 207. Goessl C, Müller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci* 945:51–8 (2001).

208. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 58(20):4515–8 (1998).
209. Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, et al. GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 16(4):663–76 (2000).
210. Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN. DNA Methylation of GSTP1 as Biomarker in Diagnosis of Prostate Cancer. *Urology* 69(1):11–6 (2007).
211. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 11(11):4097–106 (2005).
212. Roupret M, Hupertan V, Yates DR, Catto JWF, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular Detection of Localized Prostate Cancer Using Quantitative Methylation-Specific PCR on Urinary Cells Obtained Following Prostate Massage. *Clin Cancer Res* 13(6):1720–5 (2007).
213. Tokumaru Y, Harden S V, Sun D-I, Yamashita K, Epstein JI, Sidransky D. Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10(16):5518–22 (2004).
214. Liu L, Yoon J-H, Dammann R, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 21(44):6835–40 (2002).
215. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, et al. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer*. 1975–86 (2004).
216. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 202(2):233–40 (2004).
217. Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res* 93(7):767–73 (2002).
218. Woodson K, O'Reilly KJ, Ward DE, Walter J, Hanson J, Walk EL, et al. CD44 and PTGS2 Methylation are Independent Prognostic Markers for Biochemical Recurrence Among Prostate Cancer Patients with Clinically Localized Disease. *Epigenetics* 1(4):183–6 (2006).
219. Angulo JC, Andrés G, Ashour N, Sánchez-Chapado M, López JI, Roperó S. Development of Castration Resistant Prostate Cancer can be Predicted by a DNA Hypermethylation Profile. *J Urol* 195(3):619–26 (2016).
220. Angulo JC, Lopez JI, Dorado JF, Sanchez-Chapado M, Colas B, Roperó S. A DNA Hypermethylation Profile Independently Predicts Biochemical Recurrence Following Radical Prostatectomy. *Urol Int* 97(1):16–25 (2016).
221. Bedford MT, van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res* 47(20):5274–6 (1987).

222. Zelic R, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Pettersson A, Gillio-Tos A, et al. Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 18(1):1–12 (2015).
223. Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, et al. Cytochrome P450 1B1 Is Overexpressed and Regulated by Hypomethylation in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 11(16):5793–801 (2005).
224. Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11(3):1028–36 (2005).
225. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amisshah N, Freeman A, Nariculam J, et al. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26(45):6560–5 (2007).
226. Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA. Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 5(7):471–88 (2005).
227. Cho N-Y, Kim B-H, Choi M, Yoo E, Moon K, Cho Y-M, et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol* 211(3):269–77 (2007).
228. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 435(7046):1262–6 (2005).
229. Zhou L-X, Li T, Huang Y-R, Sha J-J, Sun P, Li D. Application of histone modification in the risk prediction of the biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Asian J Androl* 12(2):171–9 (2010).
230. Ellinger JJ, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, et al. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* 70(1):61–9 (2010).
231. Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global Levels of Specific Histone Modifications and an Epigenetic Gene Signature Predict Prostate Cancer Progression and Development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(10):2611–22 (2010).
232. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, et al. Global Histone H3K27 Methylation Levels are Different in Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Invest* 30(2):92–7 (2012).
233. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419(6907):624–9 (2002).
234. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59(2):177–89 (2004).
235. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, et al. Histone

- deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* 98(3):604–10 (2008).
236. Sonpavde G, Aparicio AM, Zhan F, North B, DeLaune R, Garbo LE, et al. Azacitidine favorably modulates PSA kinetics correlating with plasma DNA LINE-1 hypomethylation in men with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 29(6):682–9 (2011).
237. Thibault A, Figg WD, Bergan RC, Lush RM, Myers CE, Tompkins A, et al. A phase II study of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer. *Tumori*;84(1):87–9b.
238. Graça I, Sousa EJ, Baptista T, Almeida M, Ramalho-Carvalho J, Palmeira C, et al. Anti-tumoral effect of the non-nucleoside DNMT inhibitor RG108 in human prostate cancer cells. *Curr Pharm Des* 20(11):1803–11 (2014).
239. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22(15):2990–7 (1994).
240. Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(44):15785–90 (2005).
241. Bhattacharjee P, Paul S, Banerjee M, Patra D, Banerjee P, Ghoshal N, et al. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci Rep. Nature Publishing Group* 3:2704 (2013).
242. McTavish N, Copeland LA, Saville MK, Perkins ND, Spruce BA. Proenkephalin assists stress-activated apoptosis through transcriptional repression of NF-kappaB- and p53-regulated gene targets. *Cell Death Differ. Europe PMC Funders* 14(9):1700–10 (2007).
243. Berney DM, Gopalan a, Kudahetti S, Fisher G, Ambrosine L, Foster CS, et al. Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer* 100(6):888–93 (2009).
244. Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16(8):4024–34 (1996).
245. Tsuda H, Jafar-Nejad H, Patel AJ, Sun Y, Chen H-K, Rose MF, et al. The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell* 122(4):633–44 (2005).
246. Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJT, Schumacher A, Grimes HL, et al. The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130(1):221–32 (2003).
247. Kazanjian A, Wallis D, Au N, Nigam R, Venken KJT, Cagle PT, et al. Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Res* 64(19):6874–82 (2004).
248. Shroyer NF, Wallis D, Venken KJT, Bellen HJ, Zoghbi HY. Gfi1 functions downstream of

- Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19(20):2412–7 (2005).
249. McGhee L, Bryan J, Elliott L, Grimes HL, Kazanjian A, Davis JN, et al. Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem* 89(5):1005–18 (2003).
250. Duan Z, Zarebski A, Montoya-durango D, Grimes HL, Horwitz M. Gfi1 Coordinates Epigenetic Repression of p21 Cip / WAF1 by Recruitment of Histone Lysine Methyltransferase G9a and Histone Deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 25(23):10338–51 (2005).
251. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, et al. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):1002–7 (2004).
252. Duan Z, Horwitz M. Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5932–7 (2003).
253. Bjercknes M, Cheng H. Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Dev Biol* 345(1):49–63 (2010).
254. Berdasco M, Fraga MF, Esteller M. Quantification of Global DNA Methylation by Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry. p. 23–34 (2009).
255. Costello JF, Hong C, Plass C, Smiraglia DJ. Restriction Landmark Genomic Scanning: Analysis of CpG Islands in Genomes by 2D Gel Electrophoresis. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) p. 131–48 (2009).
256. Yan PS, Potter D, Deatherage DE, Huang TH-M, Lin S. Differential methylation hybridization: profiling DNA methylation with a high-density CpG island microarray. *Methods Mol Biol* 507:89–106 (2009).
257. Jordà M, Rodríguez J, Frigola J, Peinado MA. Analysis of DNA Methylation by Amplification of Intermethylated Sites (AIMS). In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) p. 107–16 (2009).
258. Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 2(6):485–95 (2002).
259. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31(2):141–9 (2002).
260. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res* 16(3):383–93 (2006).
261. Fan J, Gunderson KL, Bibikova M, Yeakley JM, Chen J, Wickham Garcia E, et al. [3] Illumina Universal Bead Arrays. In: *Methods in enzymology* p. 57–73 (2006).
262. Barry MJ. Prostate-Specific-Antigen Testing for Early Diagnosis of Prostate Cancer. *N Engl J Med* 344(18):1373–7 (2001).

263. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med* 350(22):2239–46 (2004).
264. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men. *J Urol* 197(2):S200–7 (2017).
265. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. *N Engl J Med* 360(13):1320–8 (2009).
266. Neal DE, Donovan JL. Prostate cancer: to screen or not to screen? *Lancet Oncol* 1(1):17–24 (2000).
267. Roehrborn CG, Boyle P, Gould AL, Waldstreicher J. Serum prostate-specific antigen as a predictor of prostate volume in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 53(3):581–9 (1999).
268. Schatteman PH, Hoekx L, Wyndaele JJ, Jeuris W, Van Marck E. Inflammation in prostate biopsies of men without prostatic malignancy or clinical prostatitis: correlation with total serum PSA and PSA density. *Eur Urol* 37(4):404–12 (2000).
269. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture micr. *Am J Pathol* 163(3):923–33 (2003).
270. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29(1):181–206 (2010).
271. Ashour N, Angulo JC, Andrés G, Alelú R, González-Corpas A, Toledo M V., et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate* 74(12):1171–82 (2014).
272. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62(5):55–62 (2003).
273. Weng M-W, Hsiao Y-M, Chiou H-L, Yang S-F, Hsieh Y-S, Cheng Y-W, et al. Alleviation of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-transferase M2. *DNA Repair (Amst)* 4(4):493–502 (2005).
274. Huenchuguala S, Muñoz P, Zavala P, Villa M, Cuevas C, Ahumada U, et al. Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy* 10(4):618–30 (2014).
275. Liu AY, True LD. Characterization of prostate cell types by CD cell surface molecules. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology* 160(1):37–43 (2002).
276. Goo YA, Goodlett DR, Pascal LE, Worthington KD, Vessella RL, True LD, et al. Stromal mesenchyme cell genes of the human prostate and bladder. *BMC Urol* 5:17 (2005).
277. Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, et al. Aberrant

- Methylation of Preproenkephalin and p16 Genes in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Pathol* 160(5):1573–81 (2002).
278. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, Epstein JI. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol* 21(5):566–76 (1997).
279. Shah RB. Clinical Applications of Novel ERG Immunohistochemistry in Prostate Cancer Diagnosis and Management. *Adv Anat Pathol* 20(2):117–24 (2013).
280. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Zo S, Farinas AJ, Minna JD, et al. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features 1. 514–9 (2002).
281. Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, et al. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 125(2):388–97 (2009).
282. Son JW, Kim YJ, Cho HM, Lee SY, Lee SM, Kang J-K, et al. Promoter hypermethylation of the CFTR gene and clinical/pathological features associated with non-small cell lung cancer. *Respirology* 16(8):1203–9 (2011).
283. Takai D, Yagi Y, Wakazono K, Ohishi N, Morita Y, Sugimura T, et al. Silencing of HTR1B and reduced expression of EDN1 in human lung cancers, revealed by methylation-sensitive representational difference analysis. *Oncogene* 20(51):7505–13 (2001).
284. Karan D, Thrasher JB, Lubaroff D. Prostate cancer: genes, environment, immunity and the use of immunotherapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11(3):230–6 (2008).
285. Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, et al. Age-Related DNA Methylation Changes in Normal Human Prostate Tissues. *Clin Cancer Res* 13(13):3796–802 (2007).
286. Xia Y, Ding Y, Liu X, Chen X, Cheng S, Li L, et al. Racial/ethnic disparities in human DNA methylation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1846(1):258–62 (2014).
287. Devaney J, Wang S, Furbert-Harris P, Apprey V, Ittmann M, Wang B-D, et al. Genome-wide differentially methylated genes in prostate cancer tissues from African-American and Caucasian men. *Epigenetics* 10(4):319–28 (2015).
288. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64(1):9–29 (2014).
289. Rau K-M, Kang H-Y, Cha T-L, Miller SA, Hung M-C. The mechanisms and managements of hormone-therapy resistance in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 12(3):511–32 (2005).
290. Cucchiara V, Yang JC, Mirone V, Gao AC, Rosenfeld MG, Evans CP. Epigenomic Regulation of Androgen Receptor Signaling: Potential Role in Prostate Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) 9(1) (2017).
291. Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, Fiegl H, Marth C, Müller-Holzner E, et al. Association of Breast Cancer DNA Methylation Profiles with Hormone Receptor Status and Response to Tamoxifen. *Cancer Res* 64(11):3807–13 (2004).

292. Yücel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Möröy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* 197(7):831–44 (2003).
293. Person RE, Li F-Q, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, et al. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34(3):308–12 (2003).
294. Khandanpour C, Thiede C, Valk PJM, Sharif-Askari E, Nuckel H, Lohmann D, et al. A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GFI1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 115(12):2462–72 (2010).
295. Vassen L, Khandanpour C, Ebeling P, van der Reijden BA, Jansen JH, Mahlmann S, et al. Growth factor independent 1b (Gfi1b) and a new splice variant of Gfi1b are highly expressed in patients with acute and chronic leukemia. *Int J Hematol* 89(4):422–30 (2009).
296. Boztug K, Klein C. Novel genetic etiologies of severe congenital neutropenia. *Curr Opin Immunol* 21(5):472–80 (2009).
297. Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, Tschlis PN. Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 13(3):1759–68 (1993).
298. Schmidt T, Karsunky H, Gau E, Zevnik B, Elsässer HP, Möröy T. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17(20):2661–7 (1998).
299. Soliera AR, Mariani SA, Audia A, Lidonnici MR, Addya S, Ferrari-Amorotti G, et al. Gfi-1 inhibits proliferation and colony formation of p210BCR/ABL-expressing cells via transcriptional repression of STAT 5 and Mcl-1. *Leukemia* 26(7):1555–63 (2012).
300. Kazanjian A, Gross EA, Grimes HL. The growth factor independence-1 transcription factor: new functions and new insights. *Crit Rev Oncol Hematol* 59(2):85–97 (2006).
301. Saleque S, Kim J, Rooke HM, Orkin SH. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell* 27(4):562–72 (2007).
302. Duan Z, Person RE, Lee H-H, Huang S, Donadieu J, Badolato R, et al. Epigenetic regulation of protein-coding and microRNA genes by the Gfi1-interacting tumor suppressor PRDM5. *Mol Cell Biol* 27(19):6889–902 (2007).
303. Shu X, Geng H, Li L, Ying J, Ma C, Wang Y, et al. The Epigenetic Modifier PRDM5 Functions as a Tumor Suppressor through Modulating WNT/ β -Catenin Signaling and Is Frequently Silenced in Multiple Tumors. Gottardi C, editor. *PLoS One* 6(11):e27346 (2011).
304. Kumar R, Manning J, Spendlove HE, Kremmidiotis G, McKirdy R, Lee J, et al. ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription. *Mol Cancer Res* 4(9):655–65 (2006).
305. Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, et al. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res* 58(23):5310–4 (1998).

306. Mishra DK, Chen Z, Wu Y, Sarkissyan M, Koeffler HP, Vadgama J V. Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9(1):33–45 (2010).
307. Peters KM, Edwards SL, Nair SS, French JD, Bailey PJ, Salkield K, et al. Androgen receptor expression predicts breast cancer survival: the role of genetic and epigenetic events. *BMC Cancer* 12(1):132 (2012).
308. Mills IG. Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 14(3):187–98 (2014).
309. Lustberg MB, Ramaswamy B. Epigenetic Therapy in Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep. NIH Public Access* 3(1):34–43 (2011).
310. Chawla RK, Lawson DH, Sarma PR, Nixon DW, Travis J. Serum alpha-1 proteinase inhibitor in advanced cancer: mass variants and functionally inert forms. *Cancer Res* 47(4):1179–84 (1987).
311. Tountas Y, Sparos L, Theodoropoulos C, Trichopoulos D. Alpha 1-antitrypsin and cancer of the pancreas. *Digestion* 31(1):37–40 (1985).
312. Zelvyte I, Lindgren S, Janciauskiene S. Multiple effects of alpha1-antitrypsin on breast carcinoma MDA-MB 468 cell growth and invasiveness. *Eur J Cancer Prev* 12(2):117–24 (2003).
313. El-Akawi ZJ, Al-Hindawi FK, Bashir NA. Alpha-1 antitrypsin (alpha1-AT) plasma levels in lung, prostate and breast cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* 29(4):482–4 (2008).
314. Yamamura J, Miyoshi Y, Tamaki Y, Taguchi T, Iwao K, Monden M, et al. mRNA expression level of estrogen-inducible gene, alpha 1-antichymotrypsin, is a predictor of early tumor recurrence in patients with invasive breast cancers. *Cancer Sci* 95(11):887–92 (2004).
315. Brawer MK, Ferreri LF, Bankson DD. Long-term stability of alpha-1-antichymotrypsin complexed form of prostate specific antigen. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3(3):191–4 (2000).
316. Gupta A, Wang Y, Browne C, Kim S, Case T, Paul M, et al. Neuroendocrine differentiation in the 12T-10 transgenic prostate mouse model mimics endocrine differentiation of pancreatic beta cells. *Prostate* 68(1):50–60 (2008).
317. Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16(11):6263–72 (1996).
318. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2(2):84–9 (2000).
319. Chiang C, Ayyanathan K. Snail/Gfi-1 (SNAG) family zinc finger proteins in transcription regulation, chromatin dynamics, cell signaling, development, and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(2):123–31 (2013).

ANEXO

PUBLICACIONES

Los resultados de esta Tesis han dado lugar a la siguiente publicación como primer autor:

Ashour N, Angulo JC, Andrés G, Alelú R, González-Corpas A, Toledo M V., Rodríguez-Barbero JM, López JI, Sánchez-Chapado M, Ropero S (2014) A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate* **74**: 1171–1182 doi:10.1002/pros.22833

Colaboraciones:

Angulo JC, Andrés G, **Ashour N**, Sánchez-Chapado M, López JI, Ropero S (2016) Development of Castration Resistant Prostate Cancer can be Predicted by a DNA Hypermethylation Profile. *J Urol* **195**: 619–626 doi:10.1016/j.juro.2015.10.172.

Alelú-Paz R, Carmona FJ, Sanchez-Mut J V., Cariaga-Martínez A, González-Corpas A, **Ashour N**, Orea MJ, Escanilla A, Monje A, Guerrero Márquez C, Saiz-Ruiz J, Esteller M, Ropero S (2016) Epigenetics in Schizophrenia: A Pilot Study of Global DNA Methylation in Different Brain Regions Associated with Higher Cognitive Functions. *Front Psychol* **7**: 1496 doi:10.3389/fpsyg.2016.01496.

Alelú-Paz R, González-Corpas A, **Ashour N**, Escanilla A, Monje A, Guerrero Márquez C, Algora Weber M, Ropero S (2015) DNA methylation pattern of gene promoters of major neurotransmitter systems in older patients with schizophrenia with severe and mild cognitive impairment. *Int J Geriatr Psychiatry* **30**: 558–565 doi:10.1002/gps.4182.

Andrés G, **Ashour N**, Sánchez-Chapado M, Ropero S, Angulo JC (2013) The study of DNA methylation in urological cancer: present and future. *Actas Urol españolas* **37**: 368–375 doi:10.1016/j.acuro.2013.03.001.

Alelú-Paz R, **Ashour N**, González-Corpas A, Ropero S (2012) DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology. *J Signal Transduct* **2012**: 956958 doi:10.1155/2012/956958.

