

*Universidad de la República*

---

*Facultad de Ciencias*

*Licenciatura en Ciencias Biológicas*

# **Puesta a punto y evaluación de la Técnica de Amplificación de Sitios Intermetilados**

**Lorena Da Silveira**

Tutora: Mónica Cappetta

**Montevideo, Uruguay  
2012**



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE de TABLAS e ILUSTRACIONES</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERALIDADES DE EPIGENÉTICA</b> .....	<b>1</b>
<b>PRIMEROS MÉTODOS DE ANÁLISIS</b> .....	<b>3</b>
<b>TÉCNICAS DE ANÁLISIS EPIGENÓMICOS AMPLIOS</b> .....	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>9</b>
<b>SELECCIÓN DE MUESTRAS DE ADN</b> .....	<b>9</b>
<b>ANÁLISIS GLOBAL DE PERFILES DE METILACIÓN DEL ADN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DE SITIOS INTERMETILADOS (AIMS)</b> .....	<b>9</b>
<b>OPTIMIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS Y SU TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA</b> .....	<b>12</b>
<b>EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE AIMS</b> .....	<b>14</b>
<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>SELECCIÓN DE UN GRUPO DE MUESTRAS DE ADN CON LAS CARACTERÍSTICAS ADECUADAS PARA LA TÉCNICA DE AIMS</b> .....	<b>15</b>
<b>PUESTA A PUNTO DE LOS PROTOCOLOS DE DIGESTIÓN DEL ADN, LIGACIÓN DE ADAPTADORES Y POSTERIOR AMPLIFICACIÓN DE SITIOS INTERMETILADOS</b> . ....	<b>15</b>
<b>OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS Y EL PROCESO DE REVELADO DEL GEL CON NITRATO DE PLATA</b> .....	<b>16</b>
<b>EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA EN UN GRUPO DE MUESTRAS DE ADN PREEXISTENTES EN EL LABORATORIO</b> . ....	<b>21</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>ANEXO 1: Soluciones para corrida electroforética</b> .....	<b>27</b>
<b>SOLUCIONES</b> .....	<b>27</b>
<b>TRATAMIENTO DE LOS VIDRIOS</b> .....	<b>28</b>
<b>PREPARACIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA</b> .....	<b>28</b>
<b>ANEXO 2: Soluciones para la Tinción con Nitrato de Plata</b> .....	<b>29</b>
<b>SOLUCIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

# ÍNDICE de TABLAS e ILUSTRACIONES

<b>Tabla 1.</b> Número de muestras de pacientes y controles utilizados para el análisis de cada una de las bandas.....	23
<b>Tabla 2.</b> Análisis comparativo entre pacientes y controles de las bandas seleccionadas.....	24
<b>Ilustración 1.</b> Gráfico que representa el número de publicaciones que contienen la palabra “epigenetics” en la base de datos del NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a> ), respecto al año de publicación de las mismas.....	2
<b>Ilustración 2.</b> Diagrama esquemático del tratamiento con Bisulfito de Sodio. El ADN es desnaturalizado y luego tratado con bisulfito de sodio para convertir citosinas no metiladas a uracilo, que luego es convertido en timina por PCR. Luego del tratamiento con bisulfito las hebras de ADN ya no son complementarias, y los cebadores son diseñados para analizar el estado de metilación de una secuencia específica (Zilberman & Henikoff 2007).....	5
<b>Ilustración 3.</b> Diagrama esquemático de la técnica de AIMS. El ADN genómico es representado por líneas sólidas con siete sitios de restricción CCCGGG. Los sitios no metilados y metilados son representados por cajas blancas y negras respectivamente. Modificado de Figura 1 de (Frigola <i>et al.</i> 2002).....	11
<b>Ilustración 4.</b> Adaptador y Cebadores utilizados en AIMS. Arriba, Secuencias que conforman los adaptadores ligados. Abajo, Secuencias correspondientes a los cebadores de las tres PCRs que se realizaron. Se señalan en subrayado los nucleótidos agregados arbitrariamente en cada par de cebadores.....	12
<b>Ilustración 5.</b> Optimización del proceso de tinción con Nitrato de Plata. Corridas electroforéticas de los productos de amplificación de AIMS en geles de acrilamida 6%/urea 8M, y teñidos con nitrato de plata. En los 4 casos se utilizó distinto fijador final: A. Ácido Acético 5%; B. Ácido Acético 10%, C. EtOH 10% y Ácido Acético 5%; D. EtOH 10% y Ácido Acético 0.5%. En todos los casos se carga en el gel la misma cantidad de muestra.....	17
<b>Ilustración 6.</b> <i>Fingerprinting</i> de metilación obtenido mediante AIMS, utilizando distinto tamaño de pocillos en la electroforesis. A: PCR C utilizando el peine de 96 pocillos, B y C: PCR A utilizando los peines de 72 y 48 pocillos respectivamente. En cada uno de los casos se cargaron 2 µl, 5 µl y 10 µl respectivamente.....	19
<b>Ilustración 7.</b> Electroforesis del PCR C. Gel de secuencia desnaturalizante de acrilamida 6% con urea 8M, utilizando el peine de 92 pocillos. Marcado con círculos bandas diferenciales detectadas por inspección visual directa.....	20
<b>Ilustración 8.</b> Electroforesis del PCR A. Gel de secuencia desnaturalizante de acrilamida 6% con urea 8M, utilizando el peine de 48 pocillos. Marcado con líneas rectas bandas diferenciales detectadas por inspección visual directa.....	20
<b>Ilustración 9.</b> <i>Fingerprinting</i> de metilación obtenido mediante AIMS, utilizando la reacción PCR-A por triplicado, para tres controles (1, 2 y 3) y tres pacientes (4, 5 y 6). El producto de amplificación fue visualizado en gel de acrilamida 6% desnaturalizante con urea 8M y teñido con nitrato de plata.....	22

## RESUMEN

---

En los últimos años se han reportado datos epidemiológicos de que cambios en los patrones de metilación del ADN en leucocitos pueden servir como biomarcadores útiles de susceptibilidad a diferentes enfermedades. La búsqueda de biomarcadores es importante para la estratificación del riesgo, la detección temprana y el diagnóstico molecular de ciertas patologías, así como determinar pronóstico de las mismas, y como indicadores de susceptibilidad o respuesta a las terapias.

Con este trabajo se implementó en nuestro laboratorio la técnica de AIMS (Amplification of intermethylated sites), que permite detectar regiones genómicas que puedan estar vinculadas a la susceptibilidad a diversas enfermedades. Partiendo de muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica, se puso a punto y se evaluó dicha técnica sustituyendo la radioactividad por la tinción con Nitrato de Plata. Para ello se determinó el tiempo óptimo de las corridas electroforéticas, tamaño de pocillo y volumen de carga. Por otro lado se optimizó la tinción del gel, en cuanto a tiempos y fijador final, que permitía obtener patrones de metilación bien definidos. Se realizó una primera evaluación utilizando muestras de 40 mujeres uruguayas con cáncer de mama y 40 mujeres sanas (sin historial familiar de cáncer) como grupo control. Se obtuvieron patrones de metilación altamente reproducibles de cada individuo y las bandas diferenciales entre pacientes y controles, resultado de AIMS, fueron tratadas como sistemas binarios (presencia/ausencia). La significancia de dichas diferencias entre ambos grupos fue estudiada por prueba de  $\chi^2$ . De las 22 bandas analizadas, se detectaron 2 bandas diferencialmente metiladas entre pacientes y controles ( $p \leq 0,01$ ).

Se demostró que aún sustituyendo la radioactividad por la Tinción con Nitrato de Plata, la técnica de AIMS permitió la detección de secuencias diferencialmente metiladas entre individuos. Incluso aún evaluando un bajo número de muestras ésta permite detectar diferencias significativas entre dos grupos de muestras. Por lo que podrá ser aplicada en estudios caso-control a mayor escala, permitiendo detectar regiones genómicas diferencialmente metiladas entre pacientes y controles, y su posterior caracterización.

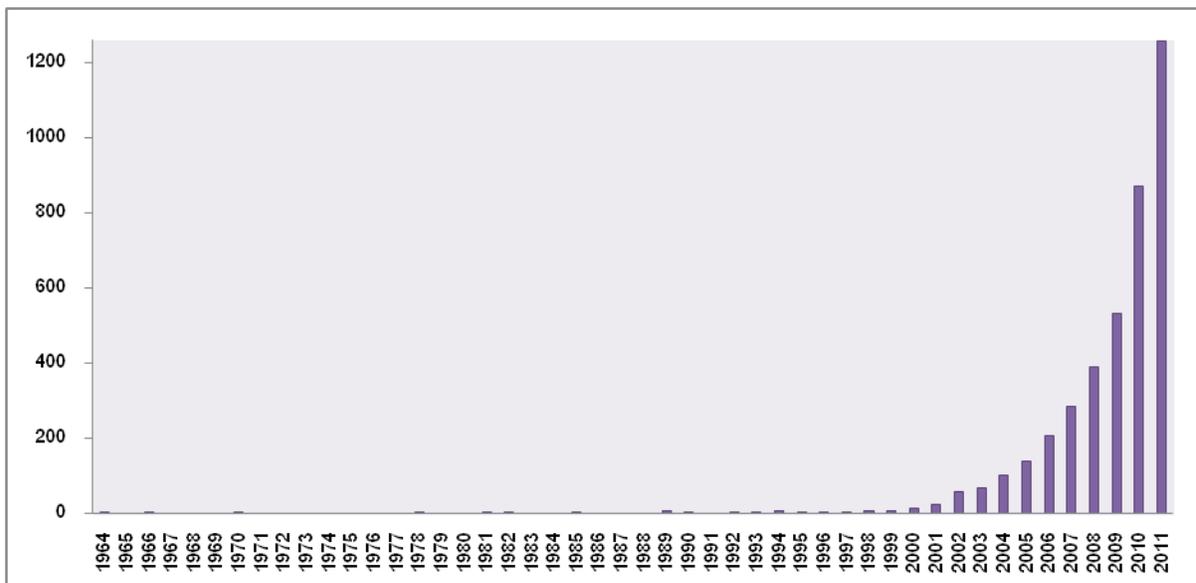
# ANTECEDENTES

## *Generalidades de Epigenética*

La epigenética fue definida como disciplina hace ya más de 50 años, por Conrad Hal Waddington, mientras estudiaba los procesos que ocurrían durante el desarrollo embrionario. Originalmente describía aquellos cambios en el desarrollo de los organismos que no podían ser explicados por cambios en el ADN, **“The... more important part...is to discover the causal mechanisms at work, and to relate them as far as possible to what experimental embryology has already revealed of the mechanics of development. We might use the name ‘epigenetics’ for such studies, thus emphasizing their relationship to the concepts...”** (Waddington 1942). Desde entonces el término epigenética ha cambiado a lo largo de los años y se ha hecho evidente que las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante en todos los procesos biológicos que ocurren dentro de cada célula que compone el cuerpo de un organismo. Así, la transcripción, el procesamiento post-transcripcional del ARN y la traducción, son procesos celulares que son selectivamente regulados por múltiples mecanismos epigenéticos. De esta manera, la alteración de estos mecanismos influye y muchas veces determinan la aparición de ciertas enfermedades en un individuo. Existe, entonces, una necesidad apremiante de comprender el “genoma funcional”, es decir, los cambios definidos por la superposición de mecanismos de regulación de la estructura génica (Huang *et al.* 2011), y a lo largo de la historia han aparecido cada vez más publicaciones, numerosas reuniones científicas y una nueva revista que se han dedicado al tema de la epigenética (Ilustración 1). Por lo tanto en lo que se dio a llamar la era posgenómica, el campo de la epigenética ha revolucionado la medicina moderna.

La epigenética comprende el estudio de los procesos moleculares y celulares responsables de la expresión específica de un gen determinado así como de sus redes funcionales (Qureshi & Mehler 2010). Podemos definir un fenómeno epigenético como alteraciones estables en la expresión de genes, heredable por mitosis y posiblemente

meiosis, que no son causadas por modificaciones en la propia secuencia génica (Taby & Issa 2010). Así pues, podemos hablar de un “epigenoma” y definirlo como la combinación de todas las modificaciones de la cromatina presentes en cualquier tipo celular, incluyendo la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas, la remodelación de los nucleosomas, y los reordenamientos de la cromatina de mayor orden. De acuerdo con esto, organismos complejos como el ser humano no poseen un único epigenoma, sino múltiples epigenomas dependiendo del tipo de tejido o etapa del desarrollo en el que se encuentre la célula (Schones & Zhao 2008).



**Ilustración 1.** Gráfico que representa el número de publicaciones que contienen la palabra “epigenetics” en la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), respecto al año de publicación de las mismas.

Por su parte, la metilación del ADN es capaz de reprimir la transcripción local de genes así como de regular la expresión global del genoma a través de la transferencia de grupos metilo desde la S-adenosil metionina a citosinas (Mehler 2008) apareciendo éstas como 5-metilcitosina (5mC). La mayoría de las 5mC (70-80%) se encuentran formando dinucleótidos CpG. La distribución en el genoma tanto de las 5mC como de los dinucleótidos CpG no es al azar. En el genoma humano, que se encuentra en gran parte privado de estos dinucleótidos, podemos encontrar aproximadamente la mitad de sus promotores de genes asociados a regiones ricas en CpG (0.5-5 Kb) denominadas islas CpG

(Frigola *et al.* 2002). La hipermetilación de estas islas ha sido el área más estudiada en lo que respecta a las investigaciones sobre metilación del ADN en cáncer. Se sabe que en células normales, la mayoría de estas regiones promotoras se encuentran no-metiladas, permitiendo la transcripción de su gen asociado, mientras que en células cancerígenas, la hipermetilación de estas regiones resulta en la pérdida de expresión de genes determinados (Sadikovic *et al.* 2008).

Estudios recientes han empezado a elucidar los roles claves de los mecanismos epigenéticos que están involucrados en la susceptibilidad y la patogénesis de enfermedades complejas tales como el cáncer, y han demostrado que la identificación de biomarcadores epigenéticos es importante para la estratificación del riesgo, la detección temprana y el diagnóstico molecular de ciertas patologías, así como determinar pronóstico de las mismas, y como indicadores de respuesta a la terapias (Terry *et al.* 2011).

Se ha demostrado últimamente en diversos artículos que alteraciones en los patrones de metilación ya sea de locus específicos como de todo el genoma, se asocian a diversas enfermedades (Terry *et al.* 2011). La mayoría de estos cambios han sido observados a nivel del tejido afectado, sin embargo en los últimos años se han reportado datos epidemiológicos de que cambios en los patrones de metilación del ADN en leucocitos pueden servir como biomarcadores útiles de susceptibilidad a diferentes cánceres severos incluyendo cáncer de colon (Lim *et al.* 2008; Ally *et al.* 2009), vejiga (Moore *et al.* 2008; Wilhelm *et al.* 2010), estómago (Hou *et al.* 2010), mama (Choi *et al.* 2009; Cappetta *et al.* 2010), y cabeza y cuello (Hsiung *et al.* 2007).

### *Primeros métodos de análisis*

Los primeros métodos de análisis de perfiles de metilación se han enfocado principalmente en el Southern blotting y la utilización de enzimas de restricción en combinación con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés). El primero se basa en el hecho de que las enzimas de restricción sensibles a la metilación son incapaces de cortar en secuencias metiladas de las islas CpG.

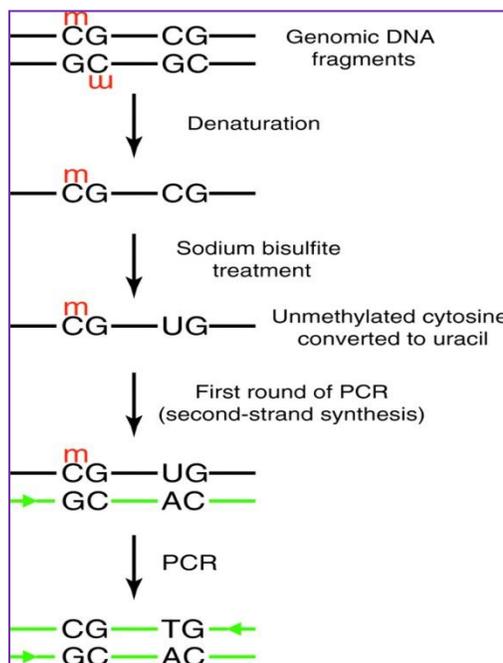
Como consecuencia de esto, a la hora de interpretar los resultados del Southern blotting, obtendremos dos bandas si el sitio CpG no se encuentra metilado y una banda si éste sí se encuentra metilado. Este ensayo provee un análisis global del estado de metilación de las islas CpG, incluyendo análisis cuantitativos, pero requiere grandes cantidades de ADN de alto peso molecular (generalmente 5 µg o más) y permite solamente estudiar unos pocos sitios de restricción dentro de islas de genes conocidos (Herman *et al.* 1996; Sulewska *et al.* 2007).

El análisis con enzimas de restricción combinado con PCR es un método más sensible que el Southern blotting y al igual que éste permite el monitoreo de la metilación de sitios CpG solamente en regiones del ADN que contengan secuencias blanco de enzimas sensibles a la metilación. Luego de la digestión se amplifica con cebadores que flanquean el sitio de restricción, y solamente se obtiene producto de amplificación si el ADN se encuentra metilado en ese sitio y por ende no se cortó en el proceso de digestión. Es útil para el análisis de muestras con alto porcentaje de alelos metilados y por ello puede ser aplicado al análisis de la impronta genómica así como al análisis de la inactivación del cromosoma X. Una limitación adicional de este método, al igual que para el Southern blotting, son las dificultades para diferenciar la completa digestión del ADN no metilado cuando la cantidad de alelos metilados es baja. Por ello es que esta técnica no es utilizada para detectar la hipermetilación de genes supresores de tumores cuando la cantidad de material biológico es pequeña, o cuando los alelos metilados constituyen una pequeña fracción del ADN (Herman *et al.* 1996; Sulewska *et al.* 2007).

Las enzimas de restricción que diferencian las secuencias metiladas de las no metiladas pueden utilizarse sólo con secuencias que contienen los sitios de corte reconocidos por las mismas. La técnica de modificación bioquímica de la Citosina a Uracilo mediante el tratamiento con bisulfito de sodio ha provisto otro método de estudio de la metilación del ADN que evita el uso de enzimas de restricción (Ilustración 2) y fue inventada con el fin de identificar correctamente todas las islas CpG metiladas y las no metiladas presentes en el genoma. Este método precede a la mayoría de las técnicas de PCR cualitativas y cuantitativas adoptadas para el análisis de metilación.

De todas maneras se ha probado la dificultad de aplicar esta técnica a grandes regiones genómicas ya que el análisis de ADN tratado con bisulfito es laborioso y sin la combinación con otras técnicas de caracterización de los productos amplificados, termina siendo menos sensible que el Southern blotting, requiriendo alrededor del 25 % de los alelos metilados para que puedan ser detectados (Herman *et al.* 1996; Sulewska *et al.* 2007; Schones & Zhao 2008).

Estos estudios reduccionistas han aportado importante información sobre el control local de la metilación de genes individuales. Pero para dar un paso superior en la comprensión de los mecanismos de metilación del ADN en el cáncer y otras enfermedades, es necesario conducir análisis genómicos amplios de metilación *de novo* en pacientes que presenten dichas enfermedades. Este tipo de análisis puede llevar a la identificación de islas CpG no caracterizadas aún asociadas con el silenciamiento génico o de secuencias asociadas a inestabilidad genómica, así como a la detección de factores que gobernarían los eventos de metilación aberrantes.



**Ilustración 2. Diagrama esquemático del tratamiento con Bisulfito de Sodio.** El ADN es desnaturalizado y luego tratado con bisulfito de sodio para convertir citosinas no metiladas a uracilo, que luego es convertido en timina por PCR. Luego del tratamiento con bisulfito las hebras de ADN ya no son complementarias, y los cebadores son diseñados para analizar el estado de metilación de una secuencia específica (Zilberman & Henikoff 2007).

*Técnicas de análisis epigenómicos amplios*

Existe una serie de enfoques que permiten el análisis a gran escala de la metilación del ADN. El proyecto epigenoma humano ([www.epigenome.org](http://www.epigenome.org)) ha utilizado métodos estándar de secuenciación para secuenciar una cantidad masiva de ADN tratado con bisulfito de diversos tejidos humanos, y ha identificado un importante número de regiones diferencialmente metiladas de forma tejido-específicas (Eckhardt *et al.* 2006). En otros estudios se utilizaron enzimas de restricción, clonación y secuenciación estándar para analizar casi 14 Mb de ADN humano no metilado y más de 8 Mb de ADN metilado (Rollins *et al.* 2006). Estas aproximaciones, aunque altamente informativas, son costosas e intensamente laboriosas estando por encima de las capacidades de la mayoría de los laboratorios. Existen otras dos técnicas que actualmente son utilizadas por muchos laboratorios para el análisis de la metilación global del genoma: los ensayos de Microarreglos y la Secuenciación de Alto Rendimiento, estas técnicas han sido combinadas con la digestión con enzimas de restricción, la conversión con bisulfito e incluso PCR metilación específica, obteniéndose resultados relevantes en el mapeo de sitios metilados. Sin embargo hoy en día aún siguen siendo técnicas muy caras cuando se quiere analizar un gran número de muestras (Sulewska *et al.* 2007; Zilberman & Henikoff 2007; Schones & Zhao 2008).

Nuestro grupo de investigación conforma un conjunto multidisciplinario de investigadores de genética molecular, biología molecular y genética de poblaciones con el fin de desarrollar un área de epidemiología genética. Para ello es importante contar con técnicas de análisis que puedan aplicarse a grandes números de muestras y a un bajo costo. Con este trabajo tengo como objetivo implementar en nuestro laboratorio una técnica que permita detectar regiones genómicas vinculadas a la susceptibilidad a enfermedades complejas tales como el cáncer, partiendo de muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica. Esta técnica, denominada AIMS (Amplification of intermethylated sites, en inglés), ha sido evaluada por su reproducibilidad y sensibilidad y, ha sido aplicada al análisis de la metilación diferencial en diversos tejidos, tanto normales como en tejidos afectados.

La misma permite amplificar una secuencia de ADN que se encuentre entre dos sitios metilados cercanos en el genoma (entre 100 y 1200 pares de bases).

Algunos de los estudios realizados incluyen la detección de cambios en el estado de metilación de regiones particulares del ADN en líneas celulares tumorales debido a cambios en el ambiente (Sadikovic *et al.* 2004), el estudio de cambios en la metilación global del genoma de gemelos monozigóticos a lo largo de su vida (Fraga *et al.* 2005), la identificación de genes silenciados asociada a hipermetilación de secuencias específicas (Frigola *et al.* 2005a; Frigola *et al.* 2006), y la estimación de diferencias en el estado de metilación global comparando tejido tumoral con tejido sano (Frigola *et al.* 2005b; Rodriguez *et al.* 2006).

La misma es una herramienta clave para detectar metilación diferencial entre genomas, y más aún para entender los mecanismos moleculares que intervienen en la transformación de células normales a células malignas (Frigola *et al.* 2002). Este tipo de técnica tiene la ventaja de que es de fácil y rápido manejo, con una relación costo-efectividad baja, y además permite realizar análisis paralelos de un número grande de muestras (Tanas *et al.* 2010).

---

# OBJETIVOS

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Implementación y evaluación de la técnica de amplificación de sitios intermetilados (AIMS) en el laboratorio para el análisis de los patrones de metilación global del ADN en nuestra población y su posterior utilización en estudios de susceptibilidad al cáncer de mama y/o melanoma esporádicos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Selección de un grupo de muestras de ADN que posean las características adecuadas para la técnica en cuestión.
  - 2) Puesta a punto de los protocolos de digestión del ADN, ligación de adaptadores y posterior amplificación de sitios intermetilados.
  - 3) Optimización de la técnica de electroforesis y el proceso de revelado del gel con Nitrato de Plata, evitando así el uso de radiactividad.
  - 4) Evaluación de la metodología en un grupo de muestras de ADN preexistentes en el laboratorio.
-

# METODOLOGÍA

## *Selección de muestras de ADN*

Se seleccionaron un grupo de muestras a partir de un pool de ADN genómico extraído de sangre periférica de individuos que participaron de otro proyecto de investigación llevados a cabo por nuestro grupo de investigadores, que tenía como objetivo estudiar la ancestralidad genética y el riesgo de cáncer de mama en una población mestiza latinoamericana de Uruguay (Bonilla *et al.* 2010). Dichas muestras habían sido previamente recolectadas en varios hospitales del país.

Todos los datos y muestras fueron tratados en forma totalmente anónima únicamente identificados por un código que no identifica a la persona participante. Todas las personas fueron informadas de los alcances de los estudios y autorizaron la utilización de su muestra y datos para posteriores estudios asociados a la temática del cáncer. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Exp. N° 071140-000847-07, resolución del Consejo de Fac. Medicina de fecha 7 de noviembre de 2007).

La concentración de las muestras de ADN se midió por espectrofotometría (Eppendorf BioPhotometer), determinándose el valor de absorbancia 260/280. Se seleccionaron muestras con una concentración de al menos 100 ng/μl y una relación absorbancia 260 / absorbancia 280 cercana a 2.

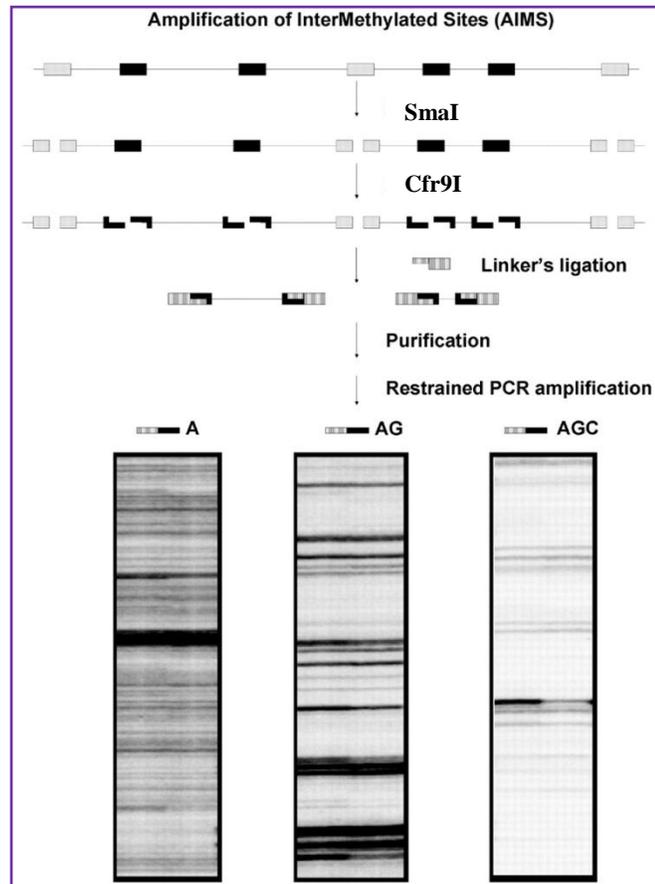
## *Análisis global de perfiles de metilación del ADN mediante amplificación de sitios intermetilados (AIMS)*

Con el fin de poseer en nuestro laboratorio una herramienta para analizar diferencias en los perfiles de metilación del ADN y su localización en el genoma en muestras de pacientes con cáncer, se implementó una técnica de “*fingerprinting*” de metilación de ADN global, mediante la amplificación de regiones entre sitios metilados

(AIMS). Con esta técnica se determina un patrón de metilación constituido por múltiples bandas anónimas, que representan secuencias de ADN flanqueadas por dos sitios metilados, las cuales pueden ser posteriormente aisladas y secuenciadas (Frigola *et al.* 2002).

El procedimiento, que se esquematiza en la Ilustración 3, se basa en dos digestiones sucesivas del ADN, luego la ligación de adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos obtenidos y finalmente la amplificación de los fragmentos ligados (Frigola *et al.* 2002). 1 µg de ADN genómico de cada una de las muestras seleccionadas fue digerido con 20 U de enzima Sma I (Biolabs) durante toda la noche a 30 °C. Dicha enzima es sensible a la metilación y da como resultado extremos romos de ADN no metilado (CCC<sup>^</sup>GGG), dejando los sitios CCCGGG metilados intactos. Seguidamente se digirió el ADN con 4 U del isoesquizómero Cfr9I (Fermentas) durante 4 horas a 37 °C, éste, insensible a la metilación, deja extremos cohesivos (C<sup>^</sup>CCGGG). Ambas reacciones de digestión se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Los adaptadores (Ilustración 4) fueron previamente preparados incubando 1 nmol de cada oligonucleótido (MCF 5'-CCCGGTCAGAGCTTTGCGAAT y Blue 5'-ATTCGCAAAGCTCTGA) a 65 °C durante 2 minutos, y luego dejándolos enfriar a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos.

Para la ligación, el ADN previamente digerido y 5 µl de la mezcla de adaptadores fueron incubados con 2 U de T4 ADN ligasa (Fermentas) durante 2 horas a 16 °C y toda la noche a 4 °C, con una posterior inactivación de la enzima a 65 °C durante 10 minutos. Las reacciones de ligación fueron purificadas mediante el Kit AxyPrep<sup>TM</sup> PCR Cleanup de Axygen Biosciences siguiendo las especificaciones del proveedor, removiendo así los oligonucleótidos de cadena doble o simple que quedaron sin ligarse (< 30 pares de bases). El ADN fue eluído en 25 µl de agua.



**Ilustración 3. Diagrama esquemático de la técnica de AIMS.** El ADN genómico es representado por líneas sólidas con siete sitios de restricción CCGGG. Los sitios no metilados y metilados son representados por cajas blancas y negras respectivamente. Modificado de Figura 1 de (Frigola *et al.* 2002).

Los fragmentos de ADN flanqueados por dos adaptadores ligados fueron amplificados por PCR. Para llevar a cabo esta reacción se utilizaron cebadores cuya secuencia corresponde al oligonucleótido Blue extendido con CCGGG, seguido de 3-4 nucleótidos elegidos arbitrariamente. Dependiendo del número y tipo de nucleótidos agregados al extremo 3' de cada cebador se generaran distintos patrones de bandas, que representarán distintas secuencias intermetiladas. En base a esto, se realizaron tres PCRs diferentes utilizando tres sets de cebadores distintos (Set A, Set B y Set C). Dichos PCRs fueron asignados como PCR A, PCR B y PCR C respectivamente (Ilustración 4).

MCF 5'-	CCCGGT CAGA GCT TT GCGAA T
Blue 3'-	AG T C T CGAAACGCT T A
SET A BlueCTA	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>CTA</u>
BlueTGG	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>TGG</u>
SET B BlueCTG	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>CTG</u>
BlueTGG	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>TGG</u>
SET C BlueCGCG	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>CGCG</u>
BlueCAAC	5'- ATTCGCAAAGCTCTGA-CCGGG- <u>CAAC</u>

**Ilustración 4. Adaptador y Cebadores utilizados en AIMS.** Arriba, Secuencias que conforman los adaptadores ligados. Abajo, Secuencias correspondientes a los cebadores de las tres PCRs que se realizaron. Se señalan en subrayado los nucleótidos agregados arbitrariamente en cada par de cebadores.

Las reacciones de amplificación se realizaron en Gene Amplification PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando 2 µl de ADN ligado como molde, 1,5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), su buffer de reacción 1X, 1,5 mM de Cloruro de Magnesio, 125 µM de dNTPs y 1,1 µM de cada uno de los cebadores, en un volumen final de 25 µl. Para las reacciones A y B se utilizó el mismo programa de ciclado: 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 1 minuto 15 segundos a 74 °C, con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Mientras que para la PCR C se utilizó el siguiente programa: 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C, con la misma etapa de desnaturalización inicial y extensión final que las reacciones anteriores mencionadas.

#### *Optimización de la electroforesis y su tinción con Nitrato de Plata*

Como resultado de las reacciones de amplificación un número significativo de segmentos de ADN de distintos largos fueron amplificados; 10 µl de estos productos fueron desnaturalizados a 98 °C durante 5 minutos, luego se les agregó 10 µl de solución *stop* (ver anexo 1) y se mantuvieron en hielo hasta su utilización. Las muestras desnaturalizadas fueron analizadas en geles de secuencia desnaturalizantes de acrilamida

6% con urea 8 M (ver anexo 1), utilizando una cuba de electroforesis vertical CSQ33 Cleaver Scientific Ltd.

Se evaluaron distintos volúmenes de carga, así como distintos tiempos de corrida electroforética para las distintas reacciones de amplificación (PCR A, B y C), definiéndose un tiempo óptimo de 4 horas para las PCRs A y B, y 5 horas para la reacción C. Todas las electroforesis fueron realizadas con buffer TBE 1X y a una potencia constante de 55 W.

Los geles fueron visualizados mediante tinción con Nitrato de Plata, lo que requirió una optimización del protocolo utilizado hasta ese momento en el laboratorio. Esta optimización se realizó en una primera etapa en geles desnaturalizantes de tamaño medio (15 cm x 15 cm x 1 mm). Una vez que se obtuvo una buena resolución de las bandas en estos geles, se pasó a utilizar el protocolo de tinción optimizado en los geles de secuencia (42 cm x 29 cm x 0.35 mm).

Se probó inicialmente el protocolo de tinción con nitrato de plata original, y luego se probaron distintos tipos de fijadores finales y tiempos de tinción. Finalmente se estableció el más adecuado donde se obtuvo mejor resolución de las bandas y contraste. El protocolo de tinción de los geles desnaturalizantes con Nitrato de plata finalmente optimizado fue el siguiente: 10-20 minutos (u *overnight*) en Fijador 1, 5 minutos de solución oxidante, un lavado rápido (10-20 segundos) con agua bidestilada, 30 minutos de solución de Nitrato de Plata, otro lavado con agua bidestilada, solución de revelado hasta visualizar las bandas con claridad, y Fijador 2 final por 10 minutos (ver Anexo 2).

Durante la optimización, los geles de tamaño medio luego de teñirlos fueron deshidratados en solución reductora y preservados en papel celofán transparente (ver Anexo 2). Todos los vidrios, previo al armado de los geles, eran tratados con SDS, agua y etanol para su limpieza. A su vez para facilitar la manipulación de los geles de secuencia durante la tinción, se trataba uno de los vidrios con una solución de Silane, para adherir el gel al vidrio, mientras que al otro vidrio se le aplicaba una capa fina de silicona en aerosol

(ver Anexo 1). Por otro lado se eliminó la agitación durante el proceso de tinción (debido al tamaño del gel), siendo necesario aumentar los tiempos de fijación 1 y 2 a 30 minutos.

### *Evaluación de la técnica de AIMS*

Luego de haber puesto a punto la electroforesis y la técnica de tinción, se evaluó la técnica de AIMS utilizando un grupo de muestras de ADN correspondientes a 40 mujeres con cáncer de mama esporádico y 40 mujeres sanas como grupo control. Estas muestras se seleccionaron a partir del pool de ADN mencionado anteriormente y con las características ya mencionadas. El grupo control se confeccionó tomando una muestra entre mujeres sanas mayores de 40 años que no presentaban un historial familiar de cáncer, ni estaban emparentados con las personas de las muestras de pacientes. Utilizando estas 80 muestras se aplicó una estrategia caso-control con el fin de comparar los patrones de metilación entre ambos grupos. Se evaluó además la reproducibilidad de la misma realizando tres réplicas del PCR A de un grupo de pacientes y controles previamente seleccionados.

Los patrones de metilación diferencial entre pacientes y controles se determinaron como pérdida de algunas bandas (hipometilación) o presencia de nuevas bandas (hipermetilación).

Las bandas diferenciales resultado de AIMS fueron tratadas como sistemas binarios (presencia/ausencia) y fueron identificadas por su posición relativa en los geles de secuencia y clasificadas en los grupos A, B o C, dependiendo si habían sido analizadas en el PCR A, el B o el C respectivamente. La presencia o ausencia de dichas bandas en el grupo de pacientes y controles fueron anotadas en una tabla de contingencia y la significancia de dichas diferencias entre ambos grupos fue estudiada por prueba de  $\chi^2$ , mediante el programa RxC, el cual utiliza un algoritmo adaptado de este test para bajo número de muestras (Roff & Bentzen 1989).

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

*Selección de un grupo de muestras de ADN con las características adecuadas para la técnica de AIMS.*

El ADN de alta calidad es un prerrequisito a la hora de ser utilizado en técnicas de biología molecular tales como PCR o *Fingerprinting*, ya que proteínas y otros componentes presentes en una muestra de ADN purificado pueden interferir con los procesos de polimerización en los ensayos de PCR, así como la digestión del ADN mediada por las enzimas de restricción. Es importante que las digestiones sean totales y que las reacciones de amplificación sean óptimas ya que esto permite que los patrones de metilación obtenidos tengan replicabilidad, permitiendo la comparación entre distintas corridas electroforéticas. En esta técnica se utiliza 1  $\mu\text{g}$  de ADN de cada muestra, por lo que es necesario trabajar con muestras de al menos 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  para evitar grandes volúmenes de reacción.

La pureza de las muestras fue evaluada en base al criterio de absorbancia 260/280. Éste es uno de los criterios más utilizados para determinar la calidad del ADN (Aljanabi & Martinez 1997), (Dabo *et al.* 1993), (Rada T. & Taboada L. 1998). Se midió la absorbancia a 260 nm de 80 muestras de ADN (pacientes y controles) y a partir de ella se calculó las concentraciones de las mismas. De éstas se seleccionaron solamente 68 (35 pacientes y 33 controles) que poseían una concentración mayor a 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y un índice de absorbancia 260/ 280 entre 1.8 y 2.0.

*Puesta a punto de los protocolos de digestión del ADN, ligación de adaptadores y posterior amplificación de sitios intermetilados.*

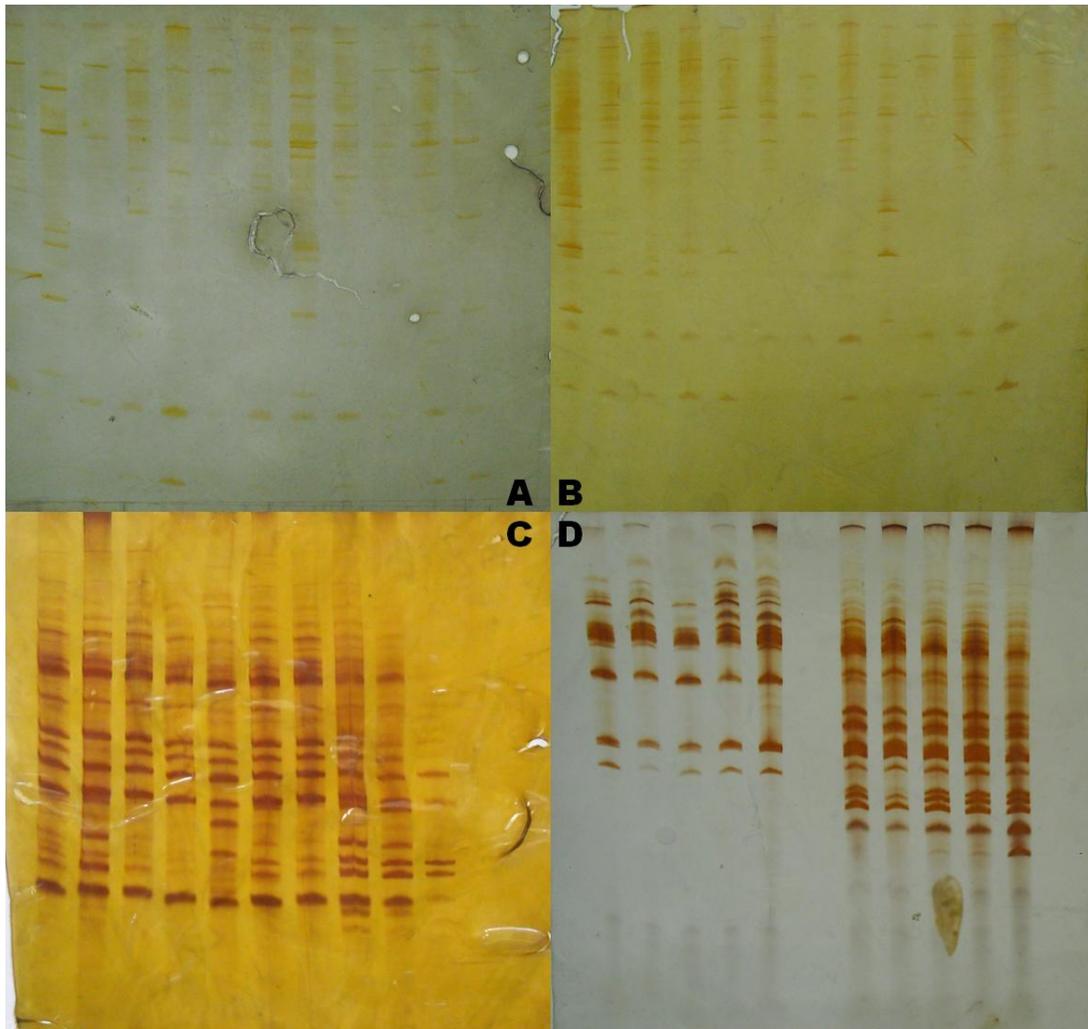
Se probaron las técnicas de digestión, ligación y posterior amplificación por PCR según los protocolos descritos por Frigola (2002). Los resultados fueron los esperados y por ende no se hicieron modificaciones en los mismos.

Siguiendo las condiciones del protocolo original (Frigola *et al.* 2002), se realizó la corrida electroforética en geles desnaturalizantes de Acrilamida:Bisacrilamida 19:1 al 6% con urea 8 M, de los productos de PCR obtenidos mediante las reacciones denominadas PCR A, PCR B y PCR C, descritas anteriormente en metodología. En esta etapa se seleccionaron aquellas muestras que presentaban un patrón de bandas reproducible y consistente para al menos uno de los PCRs (A, B o C). Por lo tanto, se continuó la optimización de la técnica con: 56 muestras para PCR A, 56 muestras para PCR B y 55 para PCR C.

#### *Optimización de la técnica de electroforesis y el proceso de revelado del gel con Nitrato de Plata*

En la técnica descrita por Frigola se utiliza dATPs marcados radiactivamente en la amplificación de los fragmentos flanqueados por dos adaptadores, por lo que el revelado se realiza exponiendo el gel de electroforesis a una placa de radiografía durante tres o cuatro días (Frigola *et al.* 2002). Sin embargo, con el objetivo de evitar la utilización de radioactividad se buscó optimizar el revelado del gel mediante la tinción con Nitrato de Plata. Esta técnica provee de varias ventajas. Primero, el desarrollo y visualización de las imágenes se realiza bajo luz ambiental normal. Así el procedimiento puede realizarse en la mesada de laboratorio sin la necesidad de un cuarto oscuro. Segundo, la imagen se resuelve con la mayor sensibilidad y detalle posible, ya que la plata es depositada directamente en las moléculas dentro de la matriz transparente del gel y no sufre ningún tipo de degradación que pueda provenir de los dispositivos secundarios de visualización, ya sea fluorescencia, autorradiografía, lentes de enfoque, desarrollo de películas o procesamiento digital de la imagen. Tercero y más importante, la tinción con Plata ofrece una alta sensibilidad, y evita el manejo de radioactivos, retrasos en el tiempo de desarrollo y problemas con la eliminación de residuos. Como cuarto punto, si uno lo desea, los geles pueden ser secados y preservados, creando un registro del material original. Pueden ser almacenados indefinidamente sin distorsión creándose un “archivo molecular” ya que las bandas teñidas son ADN “real” que puede ser extraído, amplificado, clonado y secuenciado (Bassam & Gresshoff 2007).

Las técnicas de electroforesis y tinción se probaron primariamente en geles de tamaño medio (15 cm x 15 cm x 1 mm). El protocolo de tinción con Nitrato de Plata utiliza como fijador final Ácido Acético al 5 % (Ilustración 5-A). Dado que luego de la fijación final las bandas se atenuaban haciendo difícil la interpretación del gel, se optimizó este paso evaluando distintos fijadores: Ácido Acético 10 % (Ilustración 5-B), EtOH 10 % / Ácido Acético 5 % (Ilustración 5-C), y EtOH 10 % / Ácido Acético 0.5 % (Ilustración 5-D).



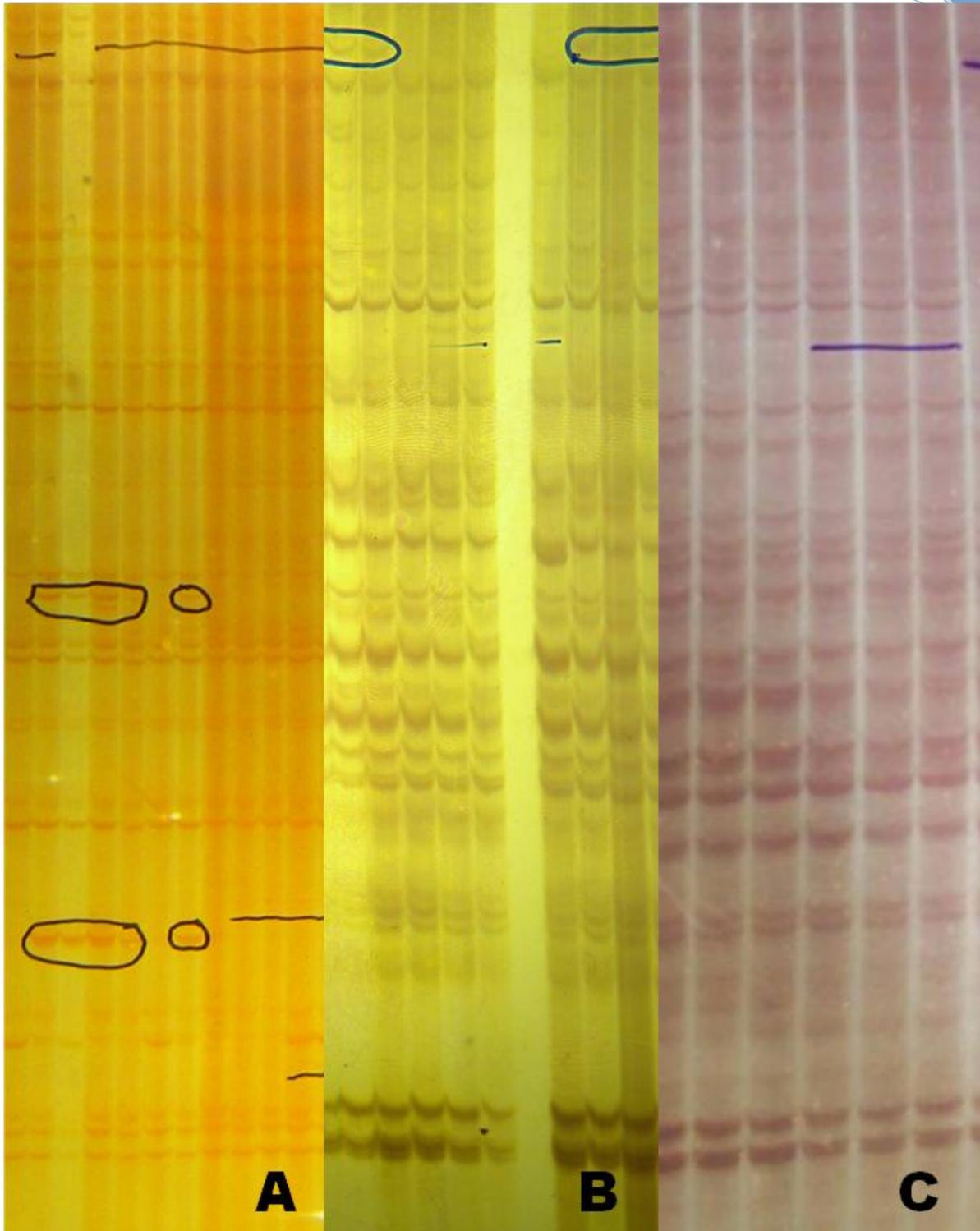
**Ilustración 5. Optimización del proceso de tinción con Nitrato de Plata.** Corridas electroforéticas de los productos de amplificación de AIMS en geles de acrilamida 6%/urea 8M, y teñidos con nitrato de plata. En los 4 casos se utilizó distinto fijador final: A. Ácido Acético 5%; B. Ácido Acético 10%, C. EtOH 10% y Ácido Acético 5%; D. EtOH 10% y Ácido Acético 0.5%. En todos los casos se carga en el gel la misma cantidad de muestra.

Claramente se puede observar que tanto en la Ilustración 5-C como la 5-D el fijador final utilizado en estas instancias fueron los que dieron una mejor resolución. Sin embargo la tinción utilizada en C dificultaba la manipulación del gel debido a cambios en sus propiedades físicas.

Luego de haber conseguido una buena fijación se comenzó a probar las técnicas de electroforesis y de tinción en los geles de secuencia.

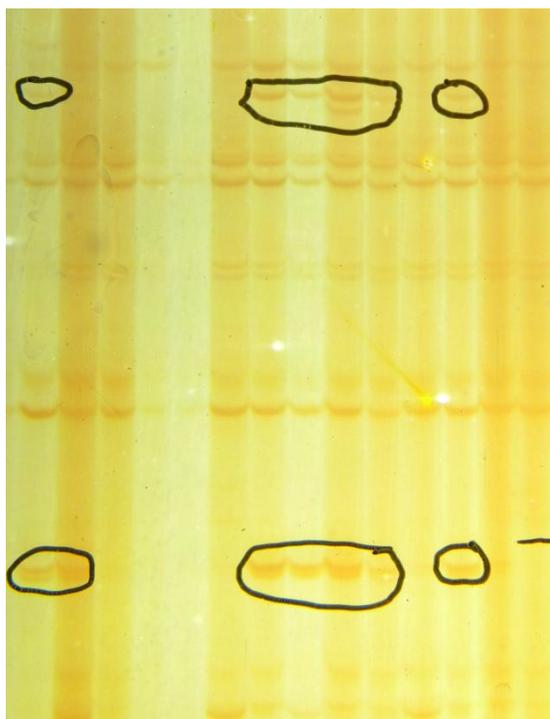
Se optimizaron los tiempos de corrida para cada una de las reacciones de PCR (PCR A, PCR B y PCR C) tomando en cuenta el número de bandas amplificadas y rango de tamaños de las mismas en cada reacción. Como era de esperarse, en el PCR C (Ilustración 6-A) se obtuvieron menor número de bandas respecto a los otros PCRs ya que los cebadores utilizados poseen mayor número de pares de bases que aquellos utilizados para los PCRs A y B (Ilustración 6-B y 2-C) (Frigola *et al.* 2002). El rango de tamaño de bandas amplificadas para los PCRs A y B iba desde menos de 100 pb a más de 1000 pb, mientras que para el PCR C no se amplificaban bandas nítidas menores a 270 pb. Por ello, para obtener una mejor resolución y separación de las bandas amplificadas por la reacción C, se aumentó la duración de la electroforesis a 5 horas respecto a los PCRs A y B que era de 4 horas.

Otro punto que se evaluó para mejorar la definición y resolución de las bandas, permitiendo obtener bandas discretas que pudieran aislarse y caracterizarse en una etapa posterior, fue el tamaño de los pocillos y el volumen de muestra a cargar en la electroforesis. Se probaron tres tamaños diferentes de pocillos: peine de 48, 72 y 96 pocillos. Cuanto más pequeño el pocillo (mayor número de pocillos en el peine), menor cantidad de muestra era necesaria para obtener una buena definición, y permitía a su vez cargar mayor número de muestras por corrida electroforética haciendo más fácil la comparación entre las mismas. Como puede observarse en la Ilustración 6 tanto en la Ilustración 6-A (96 pocillos) como en la 6-B (72 pocillos) o la 6-C (48 pocillos), es posible detectar patrones definidos de bandas discretas.

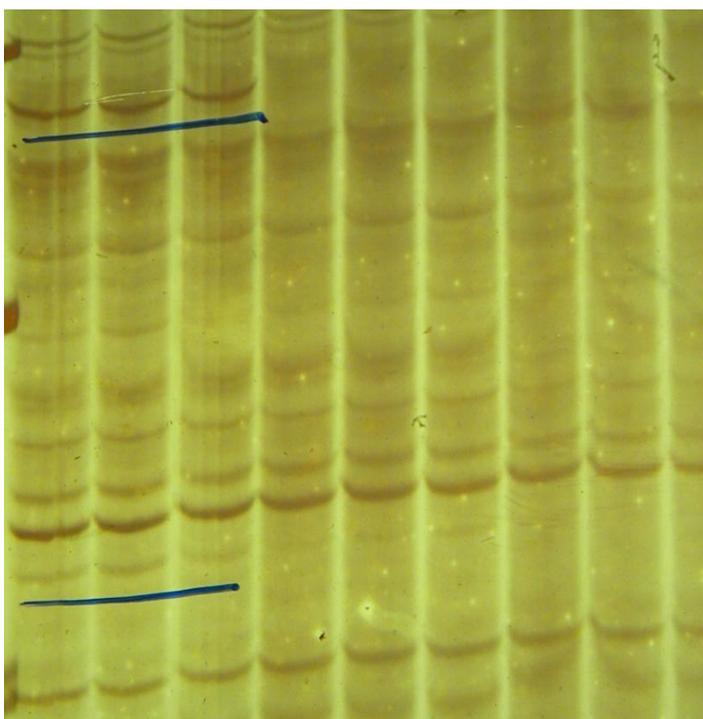


**Ilustración 6. *Fingerprinting* de metilación obtenido mediante AIMS, utilizando distinto tamaño de pocillos en la electroforesis.** A: PCR C utilizando el peine de 96 pocillos, B y C: PCR A utilizando los peines de 72 y 48 pocillos respectivamente. En cada uno de los casos se cargaron 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l y 10  $\mu$ l respectivamente.

Se realizaron diferentes electroforesis sembrando distintas cantidades de muestra utilizando los tres tamaños de peines para determinar cuál sería la cantidad óptima de muestra a sembrar. Finalmente se determinó que para obtener una buena definición y resolución de los patrones permitiendo detectar más finamente cada una de las bandas bastaba sembrar 2  $\mu$ l utilizando el peine de 92 pocillos, mientras que utilizando los peines de 72 y 48 pocillos era necesario cargar al menos 5  $\mu$ l y 10  $\mu$ l respectivamente. Sin embargo, si bien los pocillos más pequeños permitían diferenciar y evidenciar la presencia o ausencia de bandas correctamente utilizando poca cantidad de producto de PCR (Ilustración 7), a la hora de querer aislar una banda para su posterior análisis y caracterización, los pocillos de mayor tamaño eran los más adecuados (Ilustración 8).



**Ilustración 7. Electroforesis del PCR C.** Gel de secuencia desnaturizante de acrilamida 6% con urea 8M, utilizando el peine de 92 pocillos. Marcado con círculos bandas diferenciales detectadas por inspección visual directa.



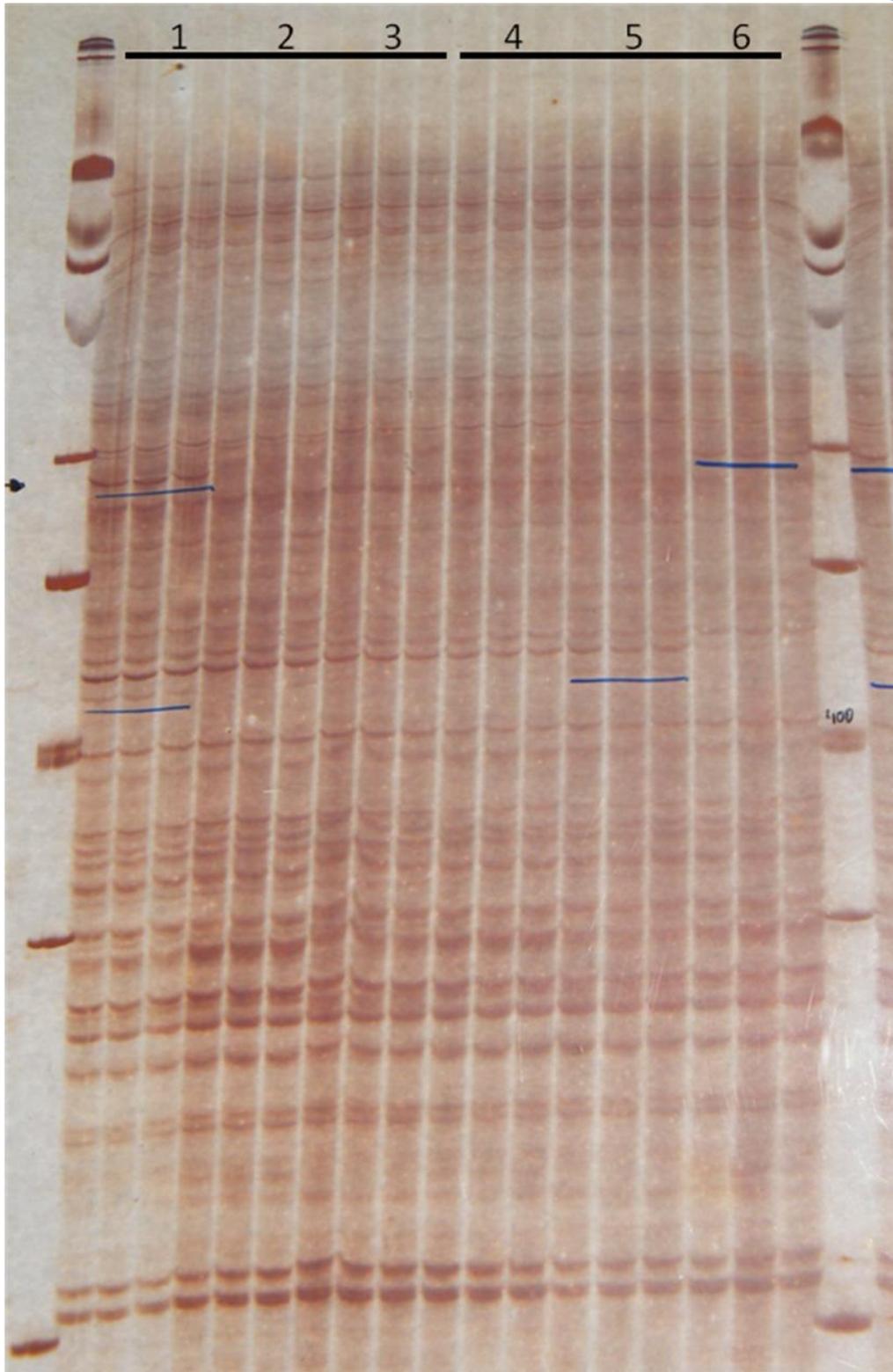
**Ilustración 8. Electroforesis del PCR A.** Gel de secuencia desnaturizante de acrilamida 6% con urea 8M, utilizando el peine de 48 pocillos. Marcado con líneas rectas bandas diferenciales detectadas por inspección visual directa.

*Evaluación de la metodología en un grupo de muestras de ADN preexistentes en el laboratorio.*

Con la técnica de AIMS, electroforesis y tinción con Nitrato de Plata optimizadas, se pasó a la evaluación de la metodología utilizando un grupo de muestras preexistentes en el laboratorio.

La utilidad de esta técnica recae en dos propiedades de este método: la posibilidad de generar gran cantidad de secuencias que representan dos sitios CpGs metilados cercanos y la viabilidad de poder reducir la complejidad del producto para generar patrones legibles. Patrones, con gran número de bandas, resueltos en geles de secuencia pueden ser fácilmente analizados e interpretados, haciendo posible el estudio de un gran número de marcas arbitrariamente elegidas en un gran número de muestras. AIMS es apropiada para escanear metilación en diferentes tipos de secuencias. Dentro de las diferentes secuencias que podemos encontrar representadas en AIMS tenemos por un lado los CpGs metilados que se encuentran dentro de las “islas CpG” (en su mayoría ubicadas en regiones reguladoras de genes formando parte de promotores o regiones intergénicas) y, por otro lado tenemos CpGs aislados en el genoma fuera de las islas fundamentalmente formando parte de secuencias repetidas como SINEs, LINEs, LTRs, etc. (Frigola *et al.* 2002; Jorda *et al.* 2009).

Se utilizó el protocolo optimizado para obtener patrones de bandas bien definidos para cada una de las PCRs. La reproducibilidad de los patrones fue evaluada por triplicado del PCR A de controles y pacientes previamente seleccionadas. Como se ve claramente en la Ilustración 9 los patrones fueron altamente reproducibles, y bandas características de un individuo u otro aparecían en las tres réplicas, demostrando que la tinción con Nitrato de no afecta la replicabilidad de la técnica.



**Ilustración 9.** *Fingerprinting* de metilación obtenido mediante AIMS, utilizando la reacción PCR-A por triplicado, para tres controles (1, 2 y 3) y tres pacientes (4, 5 y 6). El producto de amplificación fue visualizado en gel de acrilamida 6% desnaturizante con urea 8M y teñido con nitrato de plata.

Luego de obtener patrones de bandas bien definidos se pasó al análisis de los mismos. Se analizaron distintos números de bandas para cada uno de los PCRs: 4 bandas para el PCR A, 7 bandas para el PCR B y 11 bandas para el PCR C. Las bandas fueron seleccionadas por inspección visual directa de los geles. En cada gel de secuencia se evaluó presencia o ausencia de aquellas bandas que presentaban diferencias entre pacientes y controles.

Dado que la resolución de las bandas de mayor y menor tamaño no fue óptima para alguna de las muestras en cada PCR, al analizar las bandas individuales, se tomaron en cuenta distinto número de muestras (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de muestras de pacientes y controles utilizados para el análisis de cada una de las bandas.

	<b>Banda</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>PCR A</b>	<b>A1</b>	29	25
	<b>A2</b>	29	25
	<b>A3</b>	25	25
	<b>A4</b>	30	26
<b>PCR B</b>	<b>B1</b>	29	26
	<b>B2</b>	28	24
	<b>B3</b>	26	24
	<b>B4</b>	28	22
	<b>B5</b>	27	18
	<b>B6</b>	28	22
	<b>B7</b>	29	27
<b>PCR C</b>	<b>C1</b>	25	21
	<b>C2</b>	22	21
	<b>C3</b>	23	21
	<b>C4</b>	19	21
	<b>C5</b>	19	21
	<b>C6</b>	30	22
	<b>C7</b>	30	22
	<b>C8</b>	30	24
	<b>C9</b>	30	23
	<b>C10</b>	31	24
	<b>C11</b>	31	24

Tanto para el PCR A como para el PCR B se obtuvieron patrones de bandas definidos para su análisis en un máximo de 56 muestras: 30 pacientes y 26 controles para el PCR A, 29 pacientes y 27 controles para el PCR B. El análisis de los patrones de metilación obtenidos con la reacción de PCR C se realizó en un máximo de 55 muestras: 24 pacientes y 31 controles, dependiendo de qué banda estaba siendo analizada.

De las 22 bandas analizadas, solamente dos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.01$ ), al comparar entre pacientes y controles: bandas C10 y C11 (Tabla 2). La banda C10 se encontraba presente en un 75 % de los controles mientras que solamente el 39 % de los pacientes la presentaban. En cuanto a la banda C11 estaba presente en todos los controles mientras en los pacientes solamente en el 75 %.

**Tabla 2.** Análisis comparativo entre pacientes y controles de las bandas seleccionadas.

Bandas	Pacientes		Controles		P
	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	
A1	29	0	10	3	0.0950
A2	27	2	16	6	0.1180
A3	9	16	19	9	0.1110
A4	18	12	22	16	0.1790
B1	20	9	22	4	0.2120
B2	26	2	22	2	1.0000
B3	22	4	20	4	1.0000
B4	21	7	20	2	0.2600
B5	20	7	17	1	0.1250
B6	16	12	7	15	0.0850
B7	28	1	27	0	1.0000
C1	6	19	3	18	0.4740
C2	7	15	10	11	0.3620
C3	15	8	14	7	1.0000
C4	12	7	9	12	0.2030
C5	6	13	3	18	0.2860
C6	7	23	8	14	0.3720
C7	10	20	4	18	0.3740
C8	16	14	12	12	1.0000
C9	9	21	4	19	0.3360
C10	12	19	18	6	<b>0.0100*</b>
C11	22	9	24	0	<b>0.0070*</b>

Ambos casos se corresponden con pérdidas de la banda (C10 o C11) más frecuentemente en pacientes respecto a los controles indicando en éstos eventos de hipometilación. Se sabe que en células tumorales de diversos cánceres existe una hipometilación global del genoma que contribuye a la progresión tumoral por activación de oncogenes, activación de retrotransposones y/o por aumento de la inestabilidad cromosómica (Veeck & Esteller 2010). De los tipos de tumores sólidos, la hipometilación global del ADN en cáncer de mama es la más evidente con un 50 % de los casos mostrando una reducción en el contenido de 5-metilcitosina cuando se la compara con tejido normal. La hipometilación en este tipo de cáncer afecta principalmente a secuencias repetidas y a ADN satélite pericentromérico, que están normalmente altamente metiladas en células no malignas (Veeck & Esteller 2010). En concordancia con esto nuestros resultados podrían estar indicando eventos de hipometilación a nivel sistémico o en distintos tejidos precedentes a la carcinogénesis que pudieran estar vinculados a la susceptibilidad al cáncer de mama. Para una mejor interpretación de nuestros resultados y un mayor entendimiento de los procesos moleculares subyacentes a este fenómeno es fundamental poder identificar con certeza en qué lugar del genoma se encuentran dichos eventos de hipometilación, cuáles son las características de las secuencias flanqueantes y cómo afecta esta marca en leucocitos al desarrollo tumoral en el tejido mamario. Esto hace necesario y relevante que sea posible aislar la banda del gel de secuencia y así poder reamplificarla, secuenciarla y compararla con una base de datos para poder caracterizarla.

## CONCLUSIONES

---

Esta técnica ha sido evaluada por su reproducibilidad y permite la detección de eventos de hipometilación (perdida de una banda) e hipermetilación (aparición de una nueva banda). Aún evaluando un bajo número de muestras la misma permite detectar diferencias significativas entre dos grupos de muestras. Siendo viable en un futuro poder realizar estudios comparativos a mayor escala, permitiendo detectar regiones genómicas diferencialmente metiladas entre pacientes y controles. Además permite, a partir del gel teñido con Nitrato de Plata, aislar cada banda, reamplificarla y secuenciarla (dato que se ha comprobado en nuestro laboratorio), permitiendo la caracterización de la misma, haciendo posible la búsqueda de marcadores de susceptibilidad de determinadas enfermedades.

Finalmente cabe destacar que no se han reportado hasta ahora estudios de caso-control en poblaciones humanas realizados con esta técnica, por ende nuestro trabajo sería el primero en aplicarla para dichos estudios.

---

# ANEXO 1: Soluciones para corrida electroforética

## SOLUCIONES

- **Acrilamida:bisacrilamida [19:1] 6%, urea 8M**

- ✓ Acrilamida:Bisacrilamida 19:1 30% 75 ml
- ✓ Urea 480.48 grs
- ✓ TBE 1X c.s.p. 1000 ml

- **Solución de Silane**

- ✓ Etanol 2.4 ml
- ✓ Ácido Acético glacial 60  $\mu$ l
- ✓ Bind Silane 3  $\mu$ l
- ✓ Agua c.s.p. 3 ml

- **Solución Stop**

- ✓ Formamida 95 %
- ✓ Na<sub>2</sub>EDTA pH=8 20 mM
- ✓ Azul de bromofenol 0.05 %
- ✓ Xilencyanol 0.05 %

- **TBE 10X**

- ✓ Tris 108 grs
- ✓ Ácido Bórico 55 grs
- ✓ Na<sub>2</sub>EDTA 0.5 M pH=8 40 ml
- ✓ Agua c.s.p. 1000 ml

### TRATAMIENTO DE LOS VIDRIOS

Previo al armado de los geles los vidrios eran tratados para su limpieza y para que el gel quedara adherido a uno de los vidrios. Primero se limpiaban con Solución de SDS 0.1 %, luego agua y finalmente etanol 100 %. Luego se extendía en uno de los vidrios la solución de Silane y en el otro la silicona en aerosol. Se dejaba secar durante 15 minutos ambos vidrios y se volvían a limpiar con etanol 100 % en una sola dirección. Finalmente se dejaban secar nuevamente por 5 minutos y se armaba el gel.

### PREPARACIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA

Todos los geles se prepararon en una proporción de: 10ml de Acrilamida:Bisacrilamida 19:1 al 6 % con Urea 8 M previamente preparada, 100  $\mu$ l de APS (Persulfato de Amonio) 10 % y 4.5  $\mu$ l de TeMed (Tetrametilen, etilen diamina).

Para los geles pequeños se preparaban 30ml de acrilamida mientras que para los geles grandes se preparaban 50 ml.

---

## ANEXO 2: Soluciones para la Tinción con Nitrato de Plata

---

### SOLUCIONES

- **Fijador 1**
  - ✓ Etanol 10%
  
- **Fijador 2**
  - ✓ Etanol 10%
  - ✓ Ácido Acético 0.5%
  
- **Solución Oxidante**
  - ✓ Ácido Nítrico 1.54%
  
- **Solución de Nitrato de Plata**
  - ✓ Nitrato de Plata 0.202%
  
- **Solución Reveladora**
  - ✓ Carbonato de Sodio 2.96%
  - ✓ Formaldehído 0.02%
  
- **Solución Reductora**
  - ✓ Metanol 20%
  - ✓ Glicerol 0.05%

# BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, S.M. & Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* **25**, 4692-4693.
- Ally, M.S., Al-Ghnanem, R. & Pufulete, M. (2009) The relationship between gene-specific DNA methylation in leukocytes and normal colorectal mucosa in subjects with and without colorectal tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 922-928.
- Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. (2007) Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* **2**, 2649-2654.
- Bonilla, C., Bertoni, B., Sans, M. et al. (2010) Ancestría genética y cancer de mama esporádico en una muestra de mujeres uruguayas. . In: 11° Congreso Uruguayo de Oncología (Montevideo).
- Cappetta, M., Silveira, L.D., Bonilla, C., Sans, M., Hidalgo, P., Berdasco, B. & Bertoni, B. (2010) Variación poblacional de los patrones de metilación del ADN en individuos con cáncer de mama esporádico e individuos sanos. In: XII Jornadas Uruguayas de Biociencias (Piriápolis, Uruguay).
- Choi, J.Y., James, S.R., Link, P.A., McCann, S.E., Hong, C.C., Davis, W., Nesline, M.K., Ambrosone, C.B. & Karpf, A.R. (2009) Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* **30**, 1889-1897.
- Dabo, S.M., Mitchell, E.D., Jr. & Melcher, U. (1993) A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. *Anal Biochem* **210**, 34-38.
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R. et al. (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* **38**, 1378-1385.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F. et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10604-10609.
- Frigola, J., Munoz, M., Clark, S.J., Moreno, V., Capella, G. & Peinado, M.A. (2005a) Hypermethylation of the prostacyclin synthase (PTGIS) promoter is a frequent event in colorectal cancer and associated with aneuploidy. *Oncogene* **24**, 7320-7326.
- Frigola, J., Ribas, M., Risques, R.A. & Peinado, M.A. (2002) Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res* **30**, e28.
- Frigola, J., Sole, X., Paz, M.F., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G. & Peinado, M.A. (2005b) Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet* **14**, 319-326.
- Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R.A., Peinado, M.A. & Clark, S.J. (2006) Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* **38**, 540-549.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9821-9826.

- Hou, L., Wang, H., Sartori, S., Gawron, A., Lissowska, J., Bollati, V., Tarantini, L., Zhang, F.F., Zatonski, W., Chow, W.H. & Baccarelli, A. (2010) Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int J Cancer* **127**, 1866-1874.
- Hsiung, D.T., Marsit, C.J., Houseman, E.A., Eddy, K., Furniss, C.S., McClean, M.D. & Kelsey, K.T. (2007) Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 108-114.
- Huang, Y., Nayak, S., R.Jankowitz, Davidson, N.E. & Oesterreich, S. (2011) Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res* **13**, 225.
- Jorda, M., Rodriguez, J., Frigola, J. & Peinado, M.A. (2009) Analysis of DNA methylation by amplification of intermethylated sites (AIMS). *Methods Mol Biol* **507**, 107-116.
- Lim, U., Flood, A., Choi, S.W., Albanes, D., Cross, A.J., Schatzkin, A., Sinha, R., Katki, H.A., Cash, B., Schoenfeld, P. & Stolzenberg-Solomon, R. (2008) Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology* **134**, 47-55.
- Mehler, M.F. (2008) Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol* **86**, 305-341.
- Moore, L.E., Pfeiffer, R.M., Poscablo, C. et al. (2008) Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* **9**, 359-366.
- Qureshi, I.A. & Mehler, M.F. (2010) Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications. *Arch Neurol* **67**, 1316-1322.
- Rada T., A. & Taboada L., G. (1998) Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *BIOFARBO* **6**, 63-68.
- Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G., Ribas, M. & Peinado, M.A. (2006) Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* **66**, 8462-9468.
- Roff, D.A. & Bentzen, P. (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi 2 and the problem of small samples. *Mol Biol Evol* **6**, 539-545.
- Rollins, R.A., Haghghi, F., R., E.J., R., D., Q., Z.M., J., J. & H., B.T. (2006) Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res* **16**, 157-163.
- Sadikovic, B., Al-Romaih, K., Squire, J.A. & Zielenska, M. (2008) Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics* **9**, 394-408.
- Sadikovic, B., Haines, T.R., Butcher, D.T. & Rodenhiser, D.I. (2004) Chemically induced DNA hypomethylation in breast carcinoma cells detected by the amplification of intermethylated sites. *Breast Cancer Res* **6**, R329-337.
- Schones, D.E. & Zhao, K. (2008) Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* **9**, 179-191.

## Bibliografia

---

- Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J., Dabrowska, K. & Chyczewski, L. (2007) Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol* **45**, 315-324.
- Taby, R. & Issa, J.P. (2010) Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* **60**, 376-392.
- Tanas, A.S., Shkarupov, V.V., Kuznetsova, E.B., Zaletaev, D.V. & Strel'nikov, V.V. (2010) [Amplification of intermethylated sites experimental design and results analysis with aims in silico computer software]. *Mol Biol (Mosk)* **44**, 355-365.
- Terry, M.B., Delgado-Cruzata, L., Vin-Raviv, N., Wu, H.C. & Santella, R.M. (2011) DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* **6**, 828-837.
- Veeck, J. & Esteller, M. (2010) Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 5-17.
- Waddington, C.H. (1942) The Epigenotype. *Int J Epidemiol*.
- Wilhelm, C.S., Kelsey, K.T., Butler, R., Plaza, S., Gagne, L., Zens, M.S., Andrew, A.S., Morris, S., Nelson, H.H., Schned, A.R., Karagas, M.R. & Marsit, C.J. (2010) Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* **16**, 1682-1689.
- Zilberman, D. & Henikoff, S. (2007) Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* **134**, 3959-3965.
-