



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES EN EL PATRÓN DE METILACIÓN
DE LA REGIÓN DE HETEROCROMATINA
PERICENTROMÉRICA POR 5-AZACITIDINA EN
LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA

TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

González Barrios
de la Parra
Rodrigo
53 98 68 03
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del tutor

Dr.
Luis Alonso
Herrera
Montalvo

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alejandro
Zentella
Dehesa

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Rafael
Camacho
Carranza

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Alfonso
Dueñas
González

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Judith Isabel
Guzmán
Rincón

7. Datos del Trabajo escrito

Alteraciones en el patrón de metilación de la región de heterocromatina pericentromérica por 5-azacitidina en linfocitos humanos cultivados.

79 p
2007

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, con el apoyo de DGAPA por medio de los PAPIIT (IN207105) y de CONACYT (45875-M).

Dedico este trabajo a mi hermano Luis Carlos, quien me enseñó la realidad de la vida y sus extremos, y en especial a mi hermano Mario quien siempre fue mi ejemplo, mi mentor y la luz de mi infancia y mi adolescencia. Gracias por haber compartido su vida conmigo.

A mi hermano Juan Pablo, quien me enseñó el significado del verdadero valor y paciencia en la vida, quien a pesar de su enfermedad siempre es capaz de buscar la forma de contenerla y enfrentarla. Es a ti y personas como tu a las que dedicaré el trabajo de mi vida, ya que si hay personas que se han ganado han ganado mi total y absoluto respeto son ustedes, los verdaderos guerreros del mundo.

A mis padres quienes me forjaron y me han apoyado, mis eternos aliados, mis guías, consejeros y jueces. Son ustedes quienes siempre me dieron los ánimos y la energía para llegar a ser la persona que hoy en día soy, siempre seré su eterno agradecido.

Y a mis amigos del alma, los cuales aunque no hayan sido mis hermanos de sangre, son mis hermanos de espíritu, dedico este trabajo a ustedes porque son ustedes quienes me han levantado, sostenido y compartido sus vidas conmigo sin ninguna condición. Muchas gracias Israel, Bocha, Mario, Nicolás, Daniel y Frick.

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Luis A. Herrera Montalvo por permitirme permanecer y trabajar en el Instituto Nacional de Cancerología bajo su tutela. Por su paciencia e insuperable apoyo a lo largo del tiempo.

Un especial agradecimiento a Clementina Castro, por enseñarme con paciencia y ser la guía de mi trabajo y la solución de muchos de mis problemas, por ser mi maestra y mentora en las fases iniciales de mi acceso al mundo de la investigación y el trabajo de laboratorio, es a ella a quien debo el rumbo actual de mi vida.

A mis amigos que me han ayudado y sido el bastón donde me he apoyado en la vida, ya que fueron ellos quienes me ayudaron en lo académico y en lo social, en especial a Roxanna (Bocha), Mario, Israel, Nicolás, Erick, Víctor, y a sus familias quienes siempre se han portado como si yo fuera un miembro de las suyas.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias y del laboratorio: Jaquelina, Julia y Armando por su camaradería y honestidad en los errores y aciertos de mi persona.

A mi compañero Didier Prada quien me ayudó y discutió conmigo con emoción y con ideas el abordaje, desarrollo y culminación de este trabajo y de este escrito.

A mis Padres, abuelos, tíos y primos quienes me han enseñado los principios y fundamentos que rigen mi vida y me hacen la persona que soy.

*Mientras perdure el espacio
Y haya seres vivos
Quiero permanecer yo también
Para disipar la miseria del mundo.*

-Oración Budista, 14° Dalai Lama

The Word "cause" is an altar to an unknown god.

-William James

ÍNDICE

Resumen-----	8
Introducción-----	9
1. Metilación del DNA-----	9
1.1- Historia y generalidades-----	9
1.2- Función de la metilación-----	11
1.3- Química de la metilación-----	15
1.4- Familias de Dnmts humanas-----	16
1.4.1-Dnmt1: estructura y función-----	17
1.4.2-Dnmt2: estructura y función-----	19
1.4.3-Dnmt3: estructura y función-----	19
2. Heterocromatina-----	22
2.1-Heterocromatina pericentromérica-----	23
3. Satélites clásicos-----	26
3.1-Definición y función-----	26
3.2- satélite 1-----	28
3.2- satélite 2-----	29
3.3- satélite 3-----	31
4. 5-azacitidina-----	33
4.1-Historia y función-----	33
4.2-Metabolismo de la 5-azacitidina-----	35
Justificación-----	37
Hipótesis-----	37
Objetivo-----	37
Objetivos específicos-----	37
Metodología-----	38
I. Cultivo de linfocitos humanos y tratamiento con 5-azacitidina-----	38
II. Aislamiento del DNA y estudio de la metilación mediante la técnica de bisulfito de sodio-----	38
III. Ligación y transformación-----	40
IV. Secuenciación-----	41
V. Análisis de secuencias-----	42
VI. Prueba de Mann-Whitney-----	42
Resultados-----	42
1. Reacción de Bisulfito y secuenciación-----	42
2. Efecto del tratamiento con 5-azaC en la metilación de la región pericentromérica-----	48
3. Cambios en el patrón de metilación inducidos por 5-azaC-----	50
Discusión-----	56
Conclusión-----	61
Bibliografía-----	62
Anexo1-----	69
Anexo 2-----	70

Resumen

La metilación del DNA es determinante en la regulación de la expresión génica, inactivación del cromosoma X y en la compactación de la heterocromatina. Usualmente ocurre en los sitios 5'-CpG-3' y se asume que raras veces se presenta en sitios no-CpG. Sin embargo, la función de la metilación no-CpG es aún incierta, aunque existe evidencia de su participación en la embriogénesis, en la regulación de la expresión de p53 en algunos cánceres. La heterocromatina pericentromérica es una región altamente metilada, se sugiere que es un factor importante en la condensación del centrómero y previene reordenamientos cromosómicos. Ambas, la heterocromatina centromérica y la pericentromérica están compuestas en parte de regiones repetidas llamadas satélites 1, 2 y 3. Errores en la metilación en esta zona se asocian a desórdenes como el síndrome ICF algunos cánceres e inestabilidad cromosómica. La 5-azacitidina es un inhibidor de las DNA metiltransferasas y por lo tanto es un desmetilante del DNA. Hasta la fecha no se había hecho ningún estudio del efecto de la 5-azacitidina en el satélite 2 en linfocitos humanos cultivados.

En esta tesis se estudió el efecto de la 5-azacitidina (10 mM) durante tres periodos de tratamiento (24, 48 y 72 h) en la metilación de la heterocromatina pericentromérica utilizando la reacción de bisulfito de sodio en células somáticas de dos individuos sanos. Se encontró que el tratamiento con 5-azacitidina sólo tuvo un efecto significativo sobre la metilación de los sitios CpG a las 72 h de tratamiento en ambos individuos. No obstante el número de citosinas CpG desmetiladas sólo representó el 20-25% del total de citosinas CpG, por lo que el efecto de la 5-azacitidina sobre la metilación CpG fue mínimo. Contrariamente se detectó la presencia de un patrón de metilación no-CpG en el fragmento de 400 pb del satélite 2 que se estudió, el cual está compuesto en un 66% por dinucleótidos CpA. Los datos obtenidos muestran un patrón no-CpG dividido en cuatro grupos de respuesta. Este fue el patrón de metilación que se afectó diferencialmente por el tratamiento con 5-azacitidina, y a su vez fue donde se notaron algunas diferencias significativas en la respuesta al tratamiento.

Introducción

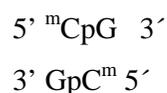
1.-Metilación del DNA

1.1 Historia y generalidades

La complejidad del DNA no sólo se resume a sus cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina), sino que también estas mismas bases pueden presentarse en el genoma de manera modificada por medio de mecanismos epigenéticos.

La metilación del DNA es un fenómeno epigenético clave. Los fenómenos epigenéticos se definen como aquellos cambios hereditarios que repercuten en la función de un gen que no pueden ser explicados por la secuencia del DNA [67]. Dicha modificación fue descubierta por Hotchkiss en 1948 [35] y es la única modificación covalente del DNA que se conoce. Esta es encontrada en sitios específicos del DNA: mientras en algunas especies ocurre en la posición N6 de los residuos de adenina, en otras ocurre en la posición N4 y en el carbono 5 de los residuos de citosina. Esta última es mejor conocida como 5-metilcitosina (m^5C). La metilación del DNA se presenta de diferentes formas a lo largo de casi todos los fila, incluyendo todos los vertebrados, angiospermas, algunas especies de hongos e invertebrados, protistas, y muchas especies de bacterias.

La m^5C es la modificación que se presenta de manera común en eucariontes, del 1 al 8% de las citosinas de las células de eucariontes superiores (incluyendo mamíferos) están metiladas [3, 9,41]. Las m^5C se localizan en el surco mayor del DNA de tal forma que no interfieren con el apareamiento de bases según el modelo de Watson y Crick [39]. Esta modificación ocurre preferencialmente en el dinucleótido C-G, donde la citosina metilada es seguida en su lado 3' por un residuo de guanina; la metilación tiene como blanco preferencial los sitios CpG, aunque también se observa, con menor frecuencia, en citosinas no-CpG. Estructuralmente la metilación sucede de manera bimodal o palindrómica dando la siguiente estructura:



Este tipo de estructura es conocida como completamente metilada, mientras que cuando sólo una hebra del DNA está metilada se conoce como parcialmente metilada o hemimetilada (estructura común en la replicación del DNA), donde el mantenimiento de la metilación depende de lo que ocurra con el DNA hemimetilado. Cuando se presenta la hemimetilación, el sitio no metilado de la hebra complementaria será restaurado a la condición completamente metilada, y ésta será a su vez transmitida por medio de la hebra hija en la siguiente división. Este proceso es estable y en raras ocasiones sucede un error que altere el patrón de metilación.

En base a estudios realizados por Wigler [79] donde se introdujeron de manera arbitraria patrones de m^5C a sustratos de plásmidos, los cuales fueron mantenidos de manera estable durante varios ciclos celulares, se demostró por primera vez que la metilación se conserva a lo largo de un tiempo, con un rango de error muy pequeño. Recientemente, Schubeler y Feng (2000) [68] demostraron que el patrón de metilación fue mantenido esencialmente intacto durante 80 divisiones celulares con una fidelidad del 95% aproximadamente, lo cual indica que a lo largo de 80 generaciones existe un error del 5% en el mantenimiento de la metilación. Por lo que la metilación de m^5C es uno de los medios de propagación de las modificaciones de la cromatina relativamente estables a través de la división celular.

En las células somáticas humanas, las m^5C corresponden a menos del 1% del total de las bases de DNA y afecta al 70-80% de todos los dinucleótidos CpG en el genoma [18, 64]. Por supuesto este promedio conlleva una intrigante variación espacial y temporal, ya que se ha demostrado que el patrón de metilación cambia a lo largo de muchos años [4].

La densidad de grupos m^5C es muy variada a lo largo de los fila, existiendo ejemplos extremos de patrones de metilación como ocurre en algunos nemátodos, como *Caenorhabditis elegans* cuyo genoma carece por completo de grupos m^5C y que a su vez no codifica a la enzima DNA metiltransferasa convencional [18]. En *Drosophila melanogaster* se observa una densidad de metilación muy baja o casi nula, y curiosamente los pocos sitios metilados corresponden a dinucleótidos CpT, a diferencia de los genomas de la mayoría de los invertebrados que poseen niveles moderadamente altos de m^5CpG concentrados en dominios largos de DNA metilado, separados por dominios de longitud equivalente no metilados. En el extremo opuesto están los vertebrados, que poseen la densidad más alta de m^5C en el reino animal. Dicha variedad de densidades en el reino animal, subraya la

posibilidad de que la distribución a lo largo del genoma refleja una diferente función para el sistema de metilación [9,18].

Los patrones de metilación no varían entre sexos. En un estudio en fibroblastos y líneas celulares de cáncer de colon, se vio que existe una alta similitud en los patrones de metilación del DNA de autosomas de ambos sexos [75]. Mediante estudios de inmunoprecipitación de DNA metilado, y los primeros análisis que se hicieron de alta resolución de metilación del DNA, se detectó que los niveles de metilación más altos tienden a estar localizados generalmente en las bandas R de los cromosomas, y en mucho menor grado en las bandas G. A su vez estos trabajos demostraron que los niveles más altos de metilación se encuentran en los cromosomas ricos en genes. Por lo que concluyeron que la densidad de genes correlaciona con la densidad de la metilación [4].

Sin embargo, las secuencias con mayores niveles de metilación son las regiones repetitivas del DNA, es decir las regiones satélites alfa, 1, 2 y 3, así como las secuencias LINE y SINE, y los promotores de genes improntados que residen en el cromosoma X [4, 9,18, 28, 29 y 39].

1.2-Función de la metilación del DNA

Las funciones biológicas de la metilación del DNA son fundamentalmente diferentes entre eucariontes y procariontes. En bacterias, la metilación juega un papel central en la restricción del hospedero a los fagos de DNA, mientras que en eucariontes no existe evidencia convincente de que éste sea un mecanismo de restricción de virus. En bacterias, la metilación ocurre principalmente en residuos de adeninas en varios taxa, y se sabe que es importante durante la reparación del mal apareamiento de hebras, este fenómeno no ocurre en eucariontes, como tampoco la metilación de adeninas [4].

En eucariontes superiores, en especial en mamíferos, la metilación tiene varias funciones. Una de las más importantes es la represión de la expresión génica. Existen varios estudios, uno de los más característicos es el de Chih Lin Hsieh y cols (1994) [9] donde generaron un minicromosoma con cuatro diferentes densidades de metilación, 0% metilado, 7% metilado (con sitios CpG en todos los sitios HhaI), 23% metilado, y 100% metilado (con sitios CpG en todos los sitios HhaI, HpaII y FnuDII), los cuales fueron transfectados en fibroblastos humanos. Estos minicromosomas tenían el gen de expresión de luciferasa. Sus resultados

demonstraron que el simple hecho de presentar un 7% de metilación disminuía de 3-10 veces la expresión del gen, mientras que el estar 100% metilado disminuía la expresión del gen reportero entre 500 y 1000 veces [37].

Otro evento asociado a la represión, y sin lugar a dudas una de las características más relevantes del patrón de metilación de vertebrados, son las “Islas CpG”. Las islas CpG son regiones ricas en G+C (>55%) que contienen una gran cantidad de sitios CpG, las cuales, normalmente se localizan en las terminaciones 5' de los promotores de muchos genes humanos [18]. Actualmente se tienen detectadas alrededor de 29 000 islas CpG en el genoma humano, localizándose en el 76% de los promotores, y tienen una longitud de 0.4 a 3 Kb [4, 18]. Generalmente las islas de los promotores de los genes se encuentran desmetiladas en los estadios tempranos del desarrollo, en todos los tipos de tejidos. Incluso se ha visto que estas siguen desmetiladas aún cuando su gen asociado está apagado. Pero cuando estas islas se encuentran metiladas se convierten en represores génicos, y el gen que tienen asociado queda establemente silenciado durante el desarrollo [18]. Sin embargo, una fracción significativa de las islas CpG en seres humanos es propensa a una metilación progresiva en ciertos tejidos durante el envejecimiento, lo cual sucede también en algunas células cancerosas y también en líneas celulares inmortalizadas. Este fenómeno sucede de manera natural pero a un ritmo muy lento, y está asociado a la metilación *de novo* que se comentará más adelante [18, 64].

El patrón de metilación es removido en los espermatozoides y durante las primeras fases de la embriogénesis, posiblemente para evitar el silenciamiento de genes importantes durante el desarrollo, y mantener así un genoma totipotencial, cuya diferenciación en parte está regulada por el patrón de metilación que se va formando por acción de las DNA metiltransferasas *de novo*. El patrón de metilación es diferente según el tipo celular, y la conservación de éste es llevada a cabo por la metiltransferasa de mantenimiento, pero dicha conservación no es perfecta y a lo largo de los años el patrón de metilación es susceptible a cambios, lo cual se ha propuesto como una posible causa de la transformación maligna [4, 29, 71].

La represión génica de las islas CpG está asociada a otra de las funciones de la metilación del DNA que es la impronta génica. El estado de metilación cambia en los promotores que son sujetos a un control tejido específico. Si está metilado el gen su transcripción se inhibe, y viceversa. Ambas, la metilación y desmetilación del DNA, ocurren durante la embriogénesis fundamentalmente. Por lo que todas las diferencias alélicas son perdidas en el desarrollo de

las células germinales primordiales en el embrión, independiente del sexo, los patrones previos de metilación son borrados. Dicho patrón se restablece en estadios tardíos de la embriogénesis e impuesto diferencialmente según el sexo. Este patrón y expresión diferencial dependiente de si el gen es heredado por el padre o la madre se conoce como impronta génica, y establece una diferencia en el comportamiento de los alelos heredados de cada uno de los progenitores; es decir, por medio de una metilación monoalélica en 5^mCpG se inactiva la expresión de un alelo.

Otra de las funciones conocidas de la metilación del DNA es la inactivación de uno de los cromosomas X en las mujeres, el cual ocurre en cada ciclo celular y es azaroso en cualquiera de los cromosomas X [73].

Existe evidencia de que los niveles de metilación del DNA están conectados a una amplia organización de la cromatina, donde el DNA no metilado usualmente da lugar a la eucromatina, que es la región codificante del cromosoma o activa para la expresión génica; mientras las regiones altamente metiladas dan lugar a otra conformación llamada heterocromatina, la cual es inactiva y altamente condensada, pero no de manera permanente, ya que cuenta con mecanismos de relajación para poder replicarse. La evidencia actual sugiere que esto sucede no por la metilación *per se*, sino más bien por una gama de proteínas que se unen a los sitios 5^mCpG; proteínas conocidas como proteínas de unión a 5-metilcitosina (MBD), dichas interacciones contribuirán a la inhibición de la transcripción de promotores metilados.

La más prominente de las proteínas de unión al 5^mCpG es la proteína de unión a metilcitosina 2 (MeCP2) que fue propuesta como la proteína represora global de los promotores metilados [28]. A su vez han sido reportadas otras proteínas que interactúan con CpG, llamadas proteínas de unión a CpG metilados 2 (Mbd2) que se unen con alta afinidad a 5^mCpG en comparación al análogo desmetilado [10]. La MeCP2 media su efecto inhibitor, probablemente, a través del reclutamiento de la histona desacetilasa 1 (HDAC1) y a Sin3A con el propósito de desacetilar las histonas cercanas a esos sitios 5^mCpG. Por lo que se entiende que MeCP2 usa a HDAC1 para inactivar a la cromatina [61]. De hecho, mutaciones en MeCP2 promueven un aumento en la acetilación de la histona 3 (H3) [69]. El efecto contrario se observa cuando MeCP2 y MBD1 se asocian con una metilasa de histonas,

resultando en el aumento de la metilación de la H3. Lo cual indica que la metilación del DNA regula más de una modificación de las histonas [5].

Un ejemplo de la interacción de MeCP2 con genes metilados se encuentra en la expresión del gen que codifica al factor neurotrófico (BDNF) en células neuronales. La activación de dicho gen es concebida mediante dos mecanismos involucrando a MeCP2. En uno, el gen BDNF es desmetilado lo cual disminuye la unión de MeCP2 dramáticamente. En el otro camino, MeCP2 es modificado mediante una fosforilación resultando en la pérdida de la afinidad de la proteína al DNA. Ambos procesos afectan la unión de MeCP2 al DNA, cuya consecuencia es la apertura de la estructura de la cromatina, evento seguido por la transcripción del gen [5].

Mutaciones en MeCP2 provocan desórdenes en el desarrollo neuronal, por ejemplo el síndrome de Rett en los seres humanos, y una enfermedad muy semejante en ratones. La mutación provoca la pérdida del reconocimiento de 5^mCpG por MeCP2 y tiene como consecuencia un retraso mental, a su vez el doble mutante resulta letal e embriogénesis [69]. También en ratones que carecen de MBD1 se presentan defectos en el sistema nervioso, lo cual indica que varias proteínas de unión a 5^mCpG son requeridas en el funcionamiento adecuado del sistema nervioso [69].

La metilación es un importante portador de información epigenética, sin embargo, el hecho de que ocurra en m⁵C es paradójico, ya que el que la citosina se encuentre metilada en el carbono 5 le confiere la desventaja crucial de ser más propensa a mutaciones, esto se debe a que la desaminación de esta base modificada resulta en una transición mutante de mC→T. Mientras que la desaminación de la citosina no metilada resulta en la transición a uracilo, el cual es reconocido y reparado eficientemente por la vía uracil-deglicosilasa [66]. Lo anterior da como resultado que los sitios m⁵C sean sitios calientes (hot spots) para mutaciones, que por sí solos representan el 30% de las mutaciones puntuales en la línea germinal y de las mutaciones somáticas adquiridas.

1.3-Química de la metilación del DNA

El grupo de enzimas responsables de realizar la metilación son conocidas como DNA metiltransferasas (Dnmt), la primera fue descubierta en el año de 1964 por Gold y Hurwitz en un estudio en *Escherichia coli*. Once años después de este hallazgo, Riggs y Holliday & Pugh [32] predijeron la existencia de dos clases generales de Dnmt. Unas enzimas *de novo* que se encargarían de establecer el patrón en secuencias específicas en el desarrollo temprano y otras que se encargarían de mantener el patrón de metilación durante la división celular por medio de la metilación de CpG hemimetiladas producido por la replicación semiconservadora. Dichas predicciones fueron confirmadas mientras el conocimiento del fenómeno de metilación aumentaba, cuando Gruenbaum y colaboradores (1982) descubrieron la primera Dnmt en mamíferos, enzima que hoy en día es conocida como Dnmt1 [66]. Estudios posteriores encontraron a tres miembros más de las DnmTs en mamíferos, Dnmt 2, 3a y 3b, así como otras Dnmt en plantas, como las cromometilasas [4, 18,29].

La metilación del DNA es introducida después de la replicación, y antes se creía que sólo se llevaba a cabo en la fase S del ciclo celular; en estudios recientes [26] se ha visto que las DnmTs no son lo suficientemente rápidas como para seguir el paso a la velocidad de la fase S, por lo que el evento de mantenimiento de la metilación se extiende a lo largo de la fase G2 y M del ciclo, por medio de un sistema de interacción de MBDs, DnmTs y de histonas. Esta continuidad de la función de metilación *de novo* a través de G2 y M sucede preferentemente en la región de heterocromatina constitutiva, y es dependiente de los sitios N terminal de las DnmTs [26, 29].

Las DnmTs usan S-adenosil-L-metionina (SAM) como fuente primaria de grupos metilo para transferirlo a las bases del DNA [21,22, 27]. El grupo metilo de SAM unido a un ion sulfonio, el cual desestabiliza termodinámicamente la molécula y hace que el grupo metiol de la metionina sea muy reactivo contra un ataque nucleofílico por el nitrógeno, oxígeno y átomos de azufre y carbocationes activados.

Las 5mC DnmTs están compuestas de dos subunidades, una catalítica conservada en la región carboxilo terminal y una región amino terminal variable. El evento clave de la catálisis es el ataque nucleofílico que la enzima hace al carbono 6 de la citosina blanco. Este ataque es generado por el grupo tiol de los residuos de cisteína del motif PCQ (motif IV) formando un aducto 5,6-dihidropirimidina. La formación de dicha unión covalente activa al carbono 5 hacia un ataque electrofílico que lleva a la adición del grupo metilo al carbono 5 de la

citosina, seguido por la eliminación del protón de la posición 5 y la resolución de un intermediario covalente (Santi, modificado por Verdine 1983) [18, 29] . El ácido glutámico del aminoácido del motif ENV (motif VI) es el que estabiliza al complejo DNA-Proteína. El acercamiento de la trayectoria de las cadenas del aminoácido catalítico a las posiciones 5 y 6 de la pirimidinas en el DNA de cadena doble es interrumpido por la posición de las bases vecinas. Este problema estérico es resuelto mediante un fenómeno conocido como eversión de base o *DNA flipping* de la hélice del DNA lo cual lleva a la inserción de la citosina al sitio activo del dominio catalítico. Una vez que se llevó a cabo la donación del grupo metilo, el intermediario resultante se resuelve por una β -eliminación de la enzima al carbono 6 por medio de la abstracción de un hidrógeno del carbono 5, con lo que se libera la enzima [4,29, 42].

Las Dnmts poseen 10 secuencias motif que son conservadas incluso en bacterias. Los motif conservados tienen un alto valor predictivo en la identificación de nuevas Dnmts, y ha sido la manera en que casi todos han sido identificados. La región entre el motif VII y IX se encarga de los contactos específicos con la secuencia del DNA en bacterias, por lo que se le llama el dominio de reconocimiento de blanco. En el caso de las Dnmts de mamíferos el reconocimiento se le atribuye a los dominios que se lo localizan en la región N- terminal, que son los encargados de las interacciones proteína-proteína y de la localización de las mismas.

1.4-Familias de Dnmts humanas

En eucariontes ya se han descrito varias Dnmts. La Dnmt 1 fue la primera en describirse en mamíferos y está muy conservada en eucariontes, después se descubrieron las Dnmt 2 y 3. Todas conservan claramente el sitio carboxilo terminal (C-terminal) caracterizado por ser el catalítico y poseer 10 motif funcionales, la variación ocurre en la región amino (N-terminal) terminal.

1.4.1-Dnmt 1: estructura y función

La enzima Dnmt 1 está conformada por un largo dominio N terminal y el dominio conservado C-terminal. El dominio C-terminal es igual al de la mayoría de las Dnmts, y se

encuentra unido al dominio N-terminal por medio de una región en bisagra constituida por repetidos de lisina-glicina. El dominio N-terminal es el dominio regulatorio y alberga motifs con diferentes funciones. Posee una región llamada rica de carga que contiene diferentes codones de inicio, y se sabe que interactúa con represores transcripcionales Dmap; también la región reguladora posee una señal de localización nuclear llamada NLS, un dominio de interacción al antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA), una región dirigida al foci de replicación, y un dominio de unión a Zn^{2+} rica en cisteína. El dominio de zinc está constituido por ocho residuos de cisteína conservados en dos grupos CXXCXXC y dos cisteínas aisladas. Ya que un solo dominio CXXCXXC...C es capaz de unirse a un ion Zn^{2+} , el dedo de zinc de la Dnmt1 posee dos de estas estructuras uniendo dos iones de zinc. Se cree que el dedo de zinc está implicado en la unión al DNA. Una parte del dominio regulatorio posee homología con la proteína polibromo 1 de pollos, y se sabe que este dominio contiene dos dominios BAH los cuales están involucrados en la interacción proteína-proteína. Se sabe que los dominios BAH se encuentran comúnmente en proteínas asociadas a la cromatina. Se supone que el papel de dominio polibromo participa en el transporte de la Dnmt1 a la horquilla de replicación. En resumen, la función del dominio N-terminal de la Dnmt1 parece ser el transporte intracelular y la regulación de la actividad catalítica de la enzima.

Esta enzima no funciona en la célula de manera aislada, y se ha visto que interactúa con muchas proteínas por medio del dominio N-terminal. Por ejemplo, la Dnmt1 interactúa directamente con las enzimas modificadoras de histonas como la metiltransferasa de histonas SUV39H1, y con las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC2. También se ha visto que son capaces de interactuar con otras proteínas de unión a sitios CpG como las MBD2, MBD3 y la MeCP2, y con la proteína de unión a heterocromatina HP1 [4, 51].

La actividad de la Dnmt1 es esencial en células de mamíferos, esto se demostró en ratones deficientes de la Dnmt1 los cuales mueren durante la gestación. En ellos se vio una reducción significativa en los niveles de metilación del DNA. Se ha observado que la metilación del DNA está fuertemente coordinada con su replicación, si la Dnmt es inhibida, se interfiere con la replicación del DNA.

En cuanto a su actividad metiladora, la Dnmt1 es altamente específica para metilar los sitios CpG. En estudios *in vitro* se demostró que la capacidad metiladora de esta enzima es de 15 a 50 veces mayor en hebras hemimetiladas que en las no metiladas [14], lo cual sugirió la base

de la función de esta enzima. Esta enzima mantiene la metilación del DNA copiando el patrón de metilación existente durante la replicación. Sin embargo, la razón estructural que determina esta preferencia a sitios CpG aún no ha sido elucidada.

Curiosamente, a pesar de que la Dnmt1 tiene una enorme homología con las Dnmts de procariontes, y que posee todos los motifs conservados de las Dnmts, el dominio catalítico de la Dnmt1 no es suficiente para que se de la actividad enzimática. La actividad enzimática sólo se observa en presencia de una parte substancial del dominio N-terminal. Parece que esto ocurre por medio de interacciones intra-moleculares entre los dos dominios, provocando un cambio conformacional en el dominio catalítico e induciendo así una conformación activa. Dicha hipótesis fue fortalecida con la observación de que una metilación pre-existente activa alostéricamente al centro catalítico de la Dnmt1 [14]. En la forma activa, la preferencia de la Dnmt1 por el DNA hemimetilado disminuye debido a que la actividad de la enzima se inclina ahora hacia el DNA no metilado; esto parece implicar a los residuos 284-287 y al dominio de zinc de dominio N-terminal [14]. Este intrincado proceso de activación del metabolismo de la Dnmt1 podría sugerir que también esta enzima puede jugar un papel como metiladora *de novo* del DNA [29].

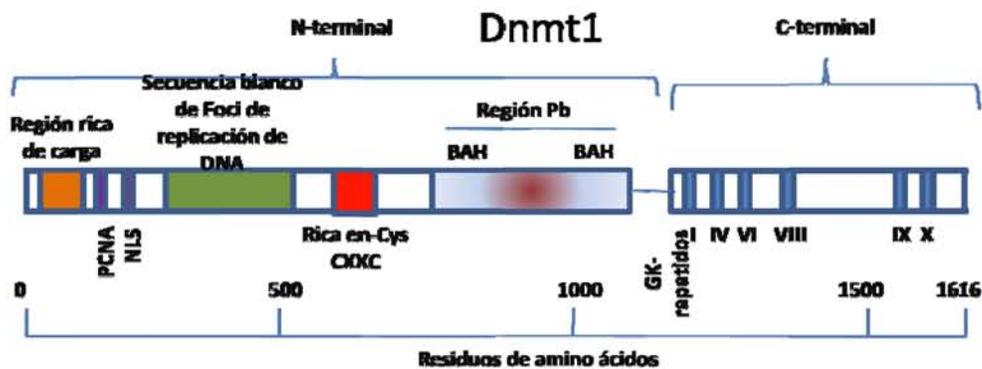


Figura 1- Diseño esquemático de la estructura de la Dnmt1 humana (1616 aa), representando los aminoácidos funcionales. Región rica de carga: contiene varios puntos de inicio para la traducción y el sitio de interferencia para DMAP1. PCNA: sitio de interacción a PCNA; NLS: señal de localización nuclear; región rica en Cys: motif de unión de zinc rico en cisteína (tipo dedo de zinc ATRX); región PB: región homóloga a la proteína polibromo 1, contiene dos dominios BAH; repetidos de GK: repeticiones glicina-lisina. En la región C-terminal, I,

IV, VI, VIII, IX y X son los motifs funcionales catalíticos conservados en todas la DNA metiltransferasas.

1.4.2-Dnmt2: estructura y función

La Dnmt2 fue reportada en 1998, y ha sido encontrada en todos los eucariontes, tanto en organismos que muestran metilación como en aquellos que no. La Dnmt2 carece del largo dominio N-terminal, pero su pequeño dominio N-terminal es diferente al conocido de las demás Dnmts, este dominio corto varía mucho en procariotes, y está asociado a la unión específica a un blanco de DNA. Recientemente se demostró una débil pero reproducible actividad catalítica como metiltransferasa de esta enzima tanto *in vivo* como *in vitro*. La especificidad de la enzima no es conocida, pero la evidencia sugiere que tiene preferencia por sitios CG, o CT y CA. Hasta la fecha la función biológica de la Dnmt2 no ha sido explicada.

1.4.3-Dnmt3: estructura y función

La familia de las Dnmt3 consiste de tres enzimas: Dnmt3a, Dnmt3b y la Dnmt3L. Aunque estas tres proteínas están altamente relacionadas, son codificadas por genes separados. En cuanto a su estructura ésta es similar a la Dnmt1, con un dominio catalítico, y contienen todos los motifs conservados de las Dnmts. Las diferencias entre las tres Dnmt3 se encuentran en el dominio N-terminal, donde la Dnmt3a y 3b contienen un dominio tipo ATRX rico en cisteína y un dominio PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina), el primero, también llamado dominio PHD, contiene 50 residuos aproximadamente y se encuentra principalmente en proteínas involucradas en la regulación de la transcripción en eucariontes, las cuales se caracterizan por un motif conservado Cys-His-Cys₃ de unión a zinc. Este dominio se dobla formando así un dedo de zinc que une a dos iones de Zn²⁺. Dando lugar a una estructura nuclear de unión a zinc, junto con unas asas que son los posibles candidatos de las interacciones con otros dominios y ligandos. En la Dnmt3a, el dominio PHD por sí solo es suficiente para reprimir la transcripción, independientemente de su actividad de metiltransferasa. Mientras en la Dnmt3b el dominio PWWP es capaz de unirse al DNA en estudios hechos *in vitro*. Parece que es este mismo dominio el que funciona como blanco hacia la cromatina para la función de metiltransferasas *de novo*.

En cuanto a su función, las Dnmt3a y Dnmt3b metilan dinucleótidos CpG sin preferencia por el DNA hemimetilado, por lo que se les asignó la función de metiladoras *de novo* [59]. Esto ha sido confirmado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [37].

Ambas enzimas son capaces de sustituir sus funciones, sin embargo, cada uno posee papeles especializados, y se ha sugerido que metilan y mantienen diferentes blancos del DNA. Un ejemplo se presenta en el síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anomalías faciales) el cual está asociado a una mutación que afecta la función de la Dnmt3b causando una hipometilación pericentromérica en la región de los satélites clásicos, [25,27]. En estos pacientes la Dnmt3a es normal por lo que se puede suponer que esta no es capaz de reemplazar la función de la Dnmt3b en estas regiones cromosómicas.

Además de la función de metilar sitios CpG, la Dnmt3a y 3b son capaces de metilar citosinas no-CpG [29]. Hasta la fecha la función biológica de este tipo de metilación es desconocida, pero por su naturaleza se sabe que no puede ser mantenida por la Dnmt1 debido a la alta especificidad de ésta por sitios CpG. La enzima que parece ser responsable principalmente de la metilación no-CpG es la Dnmt3a la cual tiene preferencia por metilar sitios flanqueados por pirimidinas en vez de purinas [29].

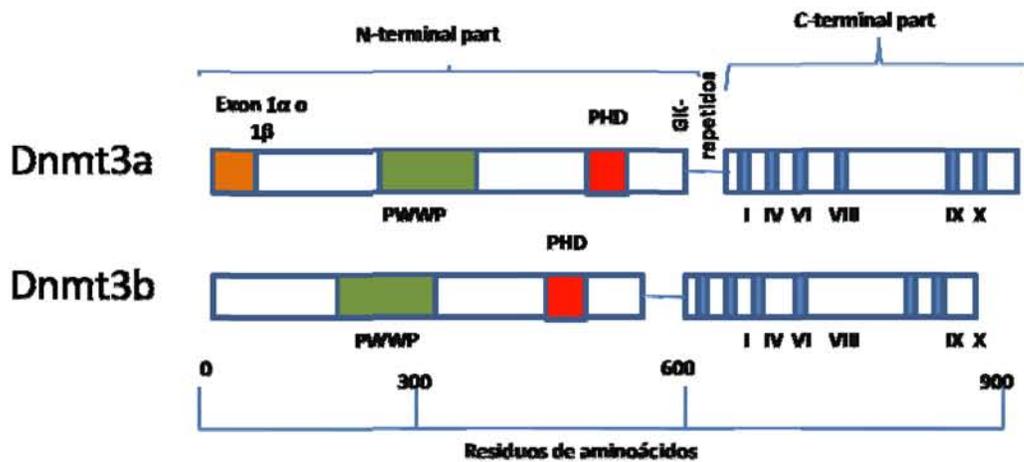


Figura 2- Diseño esquemático de las enzimas Dnmt3a y 3b. En la región C-terminal, I, IV, VI, VIII, IX y X son los motifs funcionales catalíticos conservados en todas la DNA metiltransferasas. En la región N-terminal se encuentran el dominio PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina), el dominio PHD (*Plant Homodomain*) y la región de sitios de inicio para las isoformas 1α y 1β de la familia de la Dnmt3a en el exón 1.

A pesar de su homología, la manera en que metilan el DNA ambas enzimas es distinta mecanísticamente, ya que mientras la Dnmt3a realiza la función de manera distributiva, la Dnmt3b la realiza de manera procesiva. Se sabe que la Dnmt3b metila las regiones repetidas pericentroméricas con un alto contenido de sitios CpG, por medio de actividad procesiva, la Dnmt3b metila esta región del DNA en una ventana de tiempo corta. Esta velocidad de metilación no puede ser remplazada por la Dnmt3a, posiblemente por su mecanismo de distribución de metilación, el cual es mucho menos eficiente para metilar regiones del DNA con un alto contenido de CG. Pero aunque cuantitativamente la Dnmt3a es menos eficiente, cualitativamente es superior, ya que esta enzima es dirigida de manera eficiente hacia los blancos que debe metilar. Incluso hay evidencia de que esta enzima está involucrada en el establecimiento de patrones de metilación en genes de una sola copia [18,29].

Interesantemente la Dnmt3b se sobrexprea en varios tumores, mientras los niveles de Dnmt3a sólo aumentan modestamente, esto sugiere que la Dnmt3b juega un papel importante en la tumorigenesis. Esto se explica por el mecanismo de distribución de metilación diferencial entre ambas enzimas, el cual lleva a cabo una mayor metilación intrínseca en el caso de la Dnmt3b a diferencia de la Dnmt3a [29].

El tercer miembro de la familia, la Dnmt3L, es homóloga a las enzimas 3b y 3a. En su dominio N-terminal sólo posee el dominio PHD, y su dominio C-terminal sólo se extiende hasta el motif VIII. Además, todos los residuos fundamentales para la catálisis de la enzima están mutados o deletados, lo cual lleva a creer que esta enzima no posee ninguna actividad catalítica. Se ha observado que es capaz de interactuar con la Dnmt3a y 3b, así como con las desacetilasas de histonas; y que se expresa similarmente a la Dnmt3a y 3b durante la gametogénesis y la embriogénesis. Pero su función no ha sido entendida aún.

2. Heterocromatina

La palabra cromatina viene de griego *Kroma* que significa color por lo que cromatina significa “cuerpo colorido”, las definiciones originales de los tipos de cromatina fueron hechas por las diferencias en la tinción o picnosis de la cromatina, estas observaciones las realizó Fleming en 1882. Históricamente, mediante estudios de microscopía, la cromatina se dividió en dos dominios: la eucromatina y la heterocromatina. La eucromatina es una forma de cromatina que se descondensa durante la interfase, se encuentra presente la histona 4 (H4)

acetilada, mientras que la heterocromatina es definida como regiones de cromatina que permanecen citológicamente condensadas y densamente teñidas a lo largo del ciclo celular [51].

Existen dos tipos de heterocromatina: la heterocromatina constitutiva y la facultativa. La primera se encuentra en regiones como la que rodea a los centrómeros, que es llamada heterocromatina pericentromérica, la telomérica, y en la región de organización nucleolar. Se sabe que este tipo de cromatina se duplica tardíamente durante la fase S, y que forma regiones enriquecidas con secuencias repetitivas, donde la presencia de la H4 acetilada está muy reducida [9]. A diferencia de la heterocromatina constitutiva, la facultativa es regulada en el desarrollo, fue definida por Brown en 1966, quien observó que los cromosomas funcionales de *Sciara*, *Coccidos*, y otros insectos, eran heterocromatinizados para la diferenciación y desarrollo de los machos. En el caso de mamíferos, la heterocromatina facultativa es observada en la inactivación del cromosoma X (Xi) en hembras, parece que la función de este proceso va hacia la regulación de la dosis de productos de genes del cromosoma X. El Xi tiene muchas similitudes con la heterocromatina constitutiva, es replicado tardíamente en la fase S, retiene una heterocromatina condensada durante la interfase, llamada cuerpo de Barr, y la H4 está hipoacetilada [9].

La heterocromatina tiene varios componentes, el primero en detectarse fue la proteína asociada a la heterocromatina (Hp1), la cual está altamente conservada en los organismos. En mamíferos se han encontrado tres proteínas Hp1: Hp1 α , Hp1 β (M31), y la Hp1 γ (M32). Se cree que las Hp1 están involucradas en el silenciamiento de genes, se encuentran a lo largo del genoma y están conservadas desde levaduras hasta seres humanos.

Otra modificación de la heterocromatina es la metilación de la H3 en la lisina 9 (meH3K9), la cual es una de las modificaciones epigenéticas más robustas, y parece que es permanente en la naturaleza, debido a que se encuentra en todos los organismos. Un dato interesante, es que las meH3K9 se localizan mediante anticuerpos fluorescentes en las bandas G de los cromosomas, la cuales son un patrón de bandeo que se observa en cromosomas en metafase; a su vez la acetilación de las H4 forma bandas que se correlacionan con las bandas R [9].

2.1-Heterocromatina pericentromérica

La heterocromatina pericentromérica es un típico ejemplo de heterocromatina constitutiva. Esta posee funciones potencialmente importantes para la segregación cromosómica y la expresión de genes [51].

La heterocromatina pericentromérica está constituida por varias regiones repetidas ricas en A+T, incluyendo elementos de DNA transponibles, y repeticiones de satélites, estos satélites en el caso de ratones son llamados satélites mayores, en el caso de los seres humanos son los satélites clásicos 2 y 3 [25,38]. Debido a su yuxtaposición a la región centromérica, no es de sorprenderse que la organización de las regiones pericentroméricas sea vital para asegurar la correcta segregación cromosómica, y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Estas regiones han sido implicadas en el silenciamiento de genes que ocurre cuando genes eucromatínicos se localizan en la heterocromatina adyacente como resultado de rearrreglos y transposición; este fenómeno fue originalmente reportado en *D. melanogaster* y se le llamó variegación posición-efecto [13, 51], actualmente se ha implicado a este fenómeno a la HP1.

Existen isoformas de la HP1, éstas son similares en su secuencia de aminoácidos y organización estructural, pero difieren en su localización. En su mayoría se encuentran localizadas en la heterocromatina centromérica, pero la HP1 β y en particular la HP1 γ se localizan también en sitios de la eucromatina. La especificidad de la HP1 α es en las regiones pericentroméricas. Las Hp1 son proteínas pequeñas de alrededor de unos 25 KDa y contienen una región N-terminal conservada conocida como “cromodominio”. El cromodominio es una secuencia motif común en muchas proteínas, en el caso de la HP1 es crucial para su interacción con la meH3K9; este dominio es conocido por su función en la organización de la cromatina y la regulación de la expresión génica, como en las proteínas del grupo Polycomb y la Suv39h1. Seguido del cromodominio se encuentra una región de bisagra variable y un dominio conservado C-terminal llamado dominio cromosombra, el cual es una secuencia motif relacionada al cromodominio en su secuencia de aminoácidos pero sólo ha sido reportada en la familia de proteínas HP1. Se ha visto que en el caso de la región en bisagra, ésta es capaz de unirse al DNA y a la cromatina de manera secuencia-específica. La región en bisagra es el dominio menos conservado en la familia de las HP1, lo que indica que ésta es la que puede conferir la selectividad de las HP1 para unirse a sitios específicos y diferentes

moléculas, las que a su vez dirigen a las distintas isoformas de la HP1 a diferentes localizaciones.

La organización de las HP1 es tipo multipartita lo que permite que varias proteínas puedan interactuar e unirse simultáneamente a ella, por lo que se ha llegado a la idea de que las HP1 posiblemente funcionen como un adaptador estructural, que es vital para el ensamblaje de complejos macromoleculares en la cromatina [51].

El compañero de unión más prominente de la HP1 α , es la meH3K9 (metilación de la H3 lisina 9). Los residuos de lisina pueden ser mono, di, y tri-metilados *in vivo*, y recientemente por análisis detallados se ha demostrado que la HP1 tiene una afinidad preferencial por los péptidos de H3 que estén trimetilados en la lisina 9 [16]. La encargada de introducir las modificaciones de metilación en la lisina 9 es la enzima Suv39h1, que puede unirse a la HP1 [51]. Esto llevó a concebir la idea de la propagación de la heterocromatina pericentromérica, que involucra que las meH3K9 se unan a la HP1, la que reclutará más H3K9 metiltransferasas.

En el caso de la heterocromatina pericentromérica se ha visto que ésta posee un enorme número de meH3K9 trimetiladas, por lo que considerando que la afinidad de la HP1 a este tipo de histonas tiene una fuerza del enlace baja, se necesitan varios sitios meH3K9 para mantener altas cantidades de HP1 α de manera estable en la heterocromatina pericentromérica. Es importante hacer notar que la unión de HP1 a la meH3K9 no es estable, lo que provoca que ésta se desprenda y vuelva a unirse repetidamente; esto podría explicar el que algunos genes que se localizan en la heterocromatina pericentromérica en ciertos momentos expresan RNA.

Adicionalmente las HP1 interactúan con las Dnmt1 y Dnmt3, hecho que implicaría un papel de estas proteínas en el mantenimiento y propagación de la metilación 5meC. A su vez por medio del dominio cromosoma la HP1 se une a la subunidad p150 del factor de ensamblaje de cromatina 1 (CAF1) [56], que se ha relacionado con la deposición de histonas durante la reparación y replicación del DNA. Por sí misma CAF1 interactúa con un factor de la replicación del DNA conocido como antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA), que provee una unión molecular a la reparación y replicación del DNA.

La estabilidad de la heterocromatina también se basa en otras proteínas asociadas a la 5mCpG. La más prominente de las proteínas de unión al 5mCpG es la MeCP2 que fue propuesta como la proteína represora global de los promotores metilados [28]. A su vez han sido reportadas otras proteínas que interactúan con CpG; por ejemplo, Mbd2 que se une con alta afinidad a 5mCpG en comparación al análogo desmetilado [10]. La MeCP2 media su efecto inhibitor ya que recluta directamente a la histona deacetilasa 1 (HDAC1) y a Sin3A con el propósito de desacetilar las histonas cercanas a esos sitios 5mCpG. Por lo que hasta la fecha hay dos mecanismos por los que las HDAC llegan al DNA uno por medio de MeCP2 y otro por medio del complejo PCNA-Dnmt1 [4].

Sorprendentemente se ha observado que un componente de RNA es importante en la formación de la heterocromatina pericentromérica y la localización de la HP1. Esto se observó en experimentos con células de ratones tratadas con RNasa A que indujo la pérdida de la localización de la HP1. Este descubrimiento llevó a que se propusieran dos explicaciones: la primera, donde la arquitectura dependiente del RNA de la heterocromatina puede permitir que las regiones N-terminales de meH3K9 se junten en una configuración específica requerida para la acumulación de HP1 en la heterocromatina pericentromérica; la segunda posibilidad es que este componente de RNA se une directamente a la región en bisagra de HP1 y así promueve la organización arquitectónica del dominio entero [55].

El mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica es muy importante, y requiere de muchas proteínas y moléculas. Durante la replicación, el estado de heterocromatina debe propagarse correctamente, por lo cual se ha propuesto el modelo de propagación de la heterocromatina. Este modelo comienza con la hebra parental heterocromática, en la cual la HP1 está asociada con la meH3K9 trimetilada, y con el componente de RNA estabilizador. El pasaje de la horquilla de replicación promueve la disociación de las histonas modificadas nucleosomales, lo cual lleva a la destabilización y a la pérdida de los sitios de unión de HP1. La proteína PCNA es la que subsecuentemente crea nuevos sitios de unión reclutando a CAF1, que asiste en la deposición *de novo* de histonas. El continuo intercambio de formas de HP1 unidas y libres asegura la plasticidad del dominio, donde CAF1 se une a HP1 y, por medio de esto, HP1 recluta a la Dnmt1 y a la Dnmt3b especialmente hacia la región pericentromérica, así como a las desacetilasas de histonas (HDAC) con el fin de que se lleve a cabo la metilación de los sitios CpG y la desacetilación de la H4. Cabe mencionar que cuando se integran las nuevas histonas normalmente la H4 viene acetilada desde su síntesis.

Después, el dímero CAF1-HP1 recluta a Suv39h para la metilación de la H3K9, lo cual trae como consecuencia la aparición de nuevos sitios de unión para HP1. A continuación se asocia el componente estructural de RNA unido a HP1 con el DNA sintetizado recientemente y formando ya la cromatina, este RNA ayuda a la organización arquitectónica de todo el dominio [51, 55].

3. Satélites Clásicos

3.1- Definición y Función

Los satélites son secuencias repetitivas que se encuentran en el DNA. En eucariontes, estos componentes representan más del 3.5% del genoma. El término satélite fue usado por primera vez para definir el resultado que se obtenía al realizar un análisis de gradiente de densidad por ultracentrifugación del DNA con CsCl. Este tipo de gradientes provocan que el DNA forme una banda en una posición correspondiente a su propia densidad, la cual es generada por la composición que posea de A:T y G:C. Por lo que fracciones del DNA que difieran en el contenido de G:C en más del 5% usualmente pueden ser separadas en el gradiente de densidad. Los estudios demostraron que en el DNA de eucariontes se pueden distinguir dos tipos de materiales al ser centrifugado por gradientes de densidad por CsCL. La mayor parte del genoma forma un fragmento continuo que es representado por un amplio pico centrado en la densidad correspondiente al contenido de G:C promedio del genoma. Esta es llamada banda principal. El otro material es un pico o picos de menor tamaño que poseen una densidad diferente, a estas bandas menores se le llamó “satélites del DNA”. La banda principal contiene el 92% del genoma y es centrado en una densidad de 1.701 g/cm^3 (correspondiente al promedio de G:C del 42% típico en mamíferos), mientras el pico menor representa al 8% restante que posee una distinta densidad, la cual es de 1.690 g/cm^3 .

Mientras la densidad del DNA es una función de la composición de las bases, una pequeña variación en la secuencia lleva a una amplia variación en la densidad, por lo que la definición por densidad de los satélites representa sólo al acomodo de grupos de elementos que no están relacionados pero que poseen la misma composición de bases del DNA. Por lo que la definición de los satélites por su densidad se fue volviendo insatisfactoria. Prosser y sus colegas propusieron una definición de los satélites basándose en la secuencia del componente

principal de cada una de las fracciones boyantes de densidad. Los satélites I, II y III, se llamaron ahora 1, 2 y 3. Esta definición sólo tomó en cuenta la repetición más abundante en cada familia de cada fracción. El satélite 1 corresponde a la composición de dos secuencias ricas en A+T de 17 pb a 25 pb de largo [62, 72]. Los satélites 2 y 3 se definieron como dos familias relacionadas que contienen una frecuencia repetida de 5 pb (ATTCC). El satélite 2 se caracteriza por poseer sitios frecuentes de HInf1 y de Taq1, entre sus 5 pb que son pobremente conservados, mientras el satélite 3 se caracterizó como la secuencia (ATTCC)_nAYTCGGT, y genera una escalera perfecta de 5 pb al ser digerido con HInf1 [62].

Se sabe que la desmetilación de los satélites causa rupturas cromosómicas y rearrreglos seguidos por una descondensación de la heterocromatina [30,44]. A su vez, la disminución en los niveles de metilación de los satélites durante el envejecimiento *in vitro* e *in vivo* han sido reportados en ratones y bovinos [34, 36] así como en seres humanos, y ha sido documentado que uno de los blancos específicos de la desmetilación durante el envejecimiento sucede en los satélites clásicos [71]. También este grupo de investigadores encontraron que preferencialmente aparecían micronúcleos que contenían la heterocromatina constitutiva de los cromosomas 1, 9 y 16 en fibroblastos humanos que se encontraban en un proceso de senescencia replicativa y senescencia prematura mediada por un tratamiento con 5-azacitidina, por lo que concluyeron que la desmetilación de la heterocromatina podría sugerir una asistencia en la senescencia replicativa a través de una inestabilidad cromosómica.

En estudios recientes se ha visto una relación entre defectos en las enzimas metiladoras del DNA y los satélites, donde deficiencias en la Dnmt3b conducen a una hipometilación selectiva en ciertas regiones heterocromáticas tanto en seres humanos como en ratones [25, 27, 60,82]. Dicha hipometilación ocasionada por deficiencias en la Dnmt3b ha sido asociada al síndrome ICF, en el que se observa una hipometilación en los satélites 2 y 3 en la heterocromatina pericentromérica, que normalmente se encuentran fuertemente metilados. La hipometilación pericentromérica de los satélites conduce a una descondensación de estas regiones y a otras anomalías citogenéticas características del síndrome ICF. A su vez ha sido reportado que en el caso de los satélites, la hipometilación puede jugar un papel en la regulación de genes de orden mayor [25].

3.2- Satélite 1

El satélite 1 se sugiere como el satélite que apareció más recientemente, ya que el nivel máximo de divergencia que presenta es del 8 a 9% en las secuencias analizadas [62]. Este genera tres fragmentos, de 775, 875 y 820pb, al ser digerido con la enzima Hinf I [84], los cuales forman a la unidad repetida tándemica de 2.47kb de largo. Los fragmentos de 875 y 820pb son muy ricos en A+T y consisten de largas cadenas de poli dAdT y secuencias relacionadas entre si, mientras el fragmento de 775pb es rico en G+C y posee un miembro de la familia Alu por secuencia repetida [84]. Esta secuencia tándemica de 2.47pb del satélite 1, se encuentra repetida 2000 veces en el cromosoma Y de humanos y un número menor de copias en los telómeros de algunos autosomas y del cromosoma X [84].

A su vez el satélite 1 se caracteriza por hacer escaleras de fragmentos menores a los 150pb cuando es digerido con la enzima Rsa I. Fue mediante estudios con Rsa I que se identificó la estructura mediante la cual está conformado el satélite 1, el cual consiste en dos fragmentos relacionados de secuencias ricas en A+T de 17 y 25pb a los cuales Prosser, et al, les designaron el nombre de unidades de secuencia A y B [62]. Donde a las variaciones de 1pb de la secuencia A las denominaron A1 y A2, y a las 6 variaciones de la secuencia B se les denominaron B1a, b y c y B2a, b y c, según su parecido entre ellas [62]. Las secuencias repetidas de las unidades A y B están claramente relacionadas, donde las unidades repetidas tipo A puede que se hayan derivado de dos repetidos relacionados de 7 o 8pb con la siguiente secuencia: 5'-A-t/c-A-T-(C)-A-A-A- 3'. Una vez que Prosser, et al. [62], identificaron las unidades A y B observaron que los fragmentos formados por Rsa I consistían en unidades repetidas de A y B, arregladas como multímeros, A-B, A-B-A, B-A-B, A-B-A-B, B-A-B-A y A-B-A-B-A, donde dichos multímeros eran generados por la pérdida de sitios para Rsa I entre A y B. A su vez se ha encontrado un componente menor de la familia de estas secuencias que está constituido por trimeros de la unidad B, que es por alguna razón resistente a la digestión con Rsa I [62].

3.3- Satélite 2

El satélite 2 del DNA es una de las secuencias repetitivas que se describieron en primera instancia en seres humanos [62]. El satélite 2 está constituido por dos secuencias repetidas en tándem, ATCCATTCG y uno o dos ATG, donde la secuencia consenso es por lo tanto de 23 a 26 pb de largo. La definición del satélite 2 se basa a su vez en tres fragmentos de DNA producidos al ser digerido el DNA genómico por Hinf1. Las secuencias del satélite 2 son

fácilmente distinguidas por medio de *Southern blot* en los cromosomas 1 y 16. El satélite 2 en el cromosoma 16 posee una organización de orden mayor a 6.2 Kb, y el cromosoma 1 posee 3 unidades específicas a satélite 2 de 1.3, 1.8 y 2.3 Kb [25, 38].

Los satélites 2 y 3 participan en la organización de la heterocromatina, ya que poseen varios sitios CpG en su estructura lo que ha provocado que la mitad de los sitios CpG del satélite 2 hayan sido reemplazados por CA o TG, indicando que el satélite 2 no está completamente desmetilado incluso en estadios germinales. Se ha observado que 36 de cada 38 sitios CpG del satélite 2, observados fuera de la posición esperada por la secuencia consenso son aparentemente mutaciones puntuales, nueve de ellas resultan de la mutación de C a G como en CCATT→CGATT, 13 resultan de la mutación de A→G, como en CCATT→CCGTT, y 14 de la mutación de T→G, como en ATG→ACG. El número de dichas CpG *de novo* es aproximadamente igual al número esperado de un proceso aleatorio.

La metilación en el satélite 2 es muy común y aunque los pentámeros CGAAT no son tan abundantes, se sabe que en una unidad típica del satélite 2 de 1.3 Kb hay aproximadamente 69 sitios CpG, pero sólo hay uno o dos sitios para BstB1, enzima que se utiliza para revisar la metilación del satélite 2, por lo que el método de análisis mediante esta enzima de restricción representa menos del 3% de los sitios CpG que en realidad se encuentran en el satélite 2 [25]. A pesar de que el contenido de GC en el satélite 2 sea alrededor del 40%, la proporción de sitios CpG presentes son estadísticamente similares al valor esperado de C y G de las islas CpG [27, 38]. El único análisis de metilación realizado en el satélite 2, usando modificación con bisulfito de sodio, comprueba la desaminación de las citosinas desmetiladas a uracilos, las cuales son detectados como timinas en la secuenciación, mientras que las citosinas metiladas se mantienen conservadas durante la reacción. En este estudio se observó el patrón de metilación en un repetido de 330 pb el cual representa al 75% de las citosinas CpG del satélite 2. El resultado fue que entre el 62 y 87% de los sitios CpG están metilados en cultivos normales de linfoblastos y fibroblastos, mientras que en pacientes con el síndrome ICF sólo el 12% de los sitios CpG se mantenían metilados [27]. Esto resalta la posibilidad de que la hipometilación en el satélite 2 genera una descondensación de la región de heterocromatina pericentromérica preferencialmente de los cromosomas 1, 9 y 16, cromosomas donde se encuentra de manera más abundante la secuencia repetida del satélite 2. A su vez, se observó una heterogeneidad en la composición del satélite 2, donde la densidad de metilación es

capaz de generar un patrón de variación a lo largo de la secuencia repetida que también podría ser una heterogeneidad entre las secuencias repetidas en los diferentes cromosomas.

El satélite 2, al igual que el cromosoma X inactivado y otras regiones heterocromáticas, normalmente se replica tardíamente en ciclo celular. En células de pacientes con el síndrome ICF, el tiempo de replicación está alterado y sucede mucho antes de lo esperado, lo cual correlaciona con el nivel de hipometilación del satélite 2. Esta replicación temprana parece ser una de las causas de la descondensación de los cromosomas [27]. A su vez, se sabe que la hipometilación de los repetidos del satélite 2 correlaciona con las pérdidas y ganancias de todo o una gran parte del brazo largo de los cromosomas 1 y 16, y se ha sugerido como factor relacionado con la progresión tumoral de varios tipos de cáncer [63, 80]. Por lo que se propone que la ejecución de la senescencia por medio de la desmetilación del DNA en células normales puede jugar un papel importante en la prevención de la génesis de tumores o de la malignidad de los mismos debido a re-arreglos cromosómicos [71].

3.4- Satélite 3

El satélite 3 fue definido por la alteración de numerosos pentámeros de CCATT por la secuencia CGGGT [62]. En este satélite la organización en tándem de 5 pb a veces se ve nublada por variaciones y la pérdida de periodicidad en una pequeña extensión de bases, pero a su vez dicha pérdida de periodicidad está limitada a regiones discretas. Un ejemplo es una secuencia de 49 pb que no pertenece a la organización del satélite 3, observada en la secuencia de 1797 pb de largo de pHS36 [38], y dos inserciones de 60 pb truncadas de elementos Alu, con una homología del 86% identificada en la secuencia de 1366 pb de largo de pTRS-47. Una fracción menor de las variaciones en la secuencia del satélite 3 son provocadas por deleciones de una base o por inserciones, pero dichas alteraciones de la periodicidad de 5 pb no generan una distinta periodicidad dentro de los límites de la secuencia disponible.

En la mayoría de las secuencias del satélite 3, la minoría de los pentámeros son idénticos a los de la secuencia consenso, que son permutaciones de CCATT, y la mayoría de los pentámeros son secuencias variantes como son CCAAGT o CGATT o CCGTT. Algunas de estas secuencias son frecuentes en una clona determinada y diferentes o ausentes en otras. Un ejemplo de esto se encuentra en la clona pTRS-47 la cual consiste en un 31% de secuencias

CCACT, mientras esta secuencia de 5pb se encuentra sólo en 1% de los 3564 pb de la secuencia de pHY10 y también se encuentra en un 7% en pKS36. Estas variantes características están esparcidas a todo lo largo del satélite sin ningún patrón aparente en la mayoría de las secuencias. A su vez grandes fluctuaciones en la frecuencia de estas secuencias variantes y en su esparcimiento local a lo largo del satélite podrían llegar a sugerir una subfamilia del satélite la cual podría ser reconocida incluso de una secuencia corta. En contraste, en los estudios que se realizaron con análisis de enzimas de restricción mostraron que la organización de orden mayor de una periodicidad de largo alcance (1 a 6kb) está superimpuesta a unidades pequeñas en todos los satélites estudiados. Como ilustración se encuentra DYZ1, el cual posee un sitio de HaeIII (GGCC) que se repite cada 3564 pb. Entonces la alta dispersión regular de las secuencias variantes contrasta con el esparcimiento local de las variantes.

Los pentámeros que componen al satélite 3 poseen sitios CpG y están ampliamente metilados y por lo mismo son sujetos a una alta tasa de mutación de C→T. Los pentámeros que contienen sitios CpG tanto en el satélite 2 como en el 3, son las partes más variables del DNA repetitivo, y son potencialmente útiles para reconocer al satélite 3. Del 5 al 15% de los pentámeros contienen dinucleótidos CpG. Esta frecuencia se explica por la expansión del satélite 3, o por la sobremetilación en líneas germinales, o bien por mutaciones específicas a favor de la ocurrencia de dinucleótidos CpG. Al ser metilados se espera que sucedan las transiciones típicas que darían cambios expresados como TG o CA, como TGATT o CAATT, pero dichas mutaciones no son frecuentes en el satélite 3. Por lo que, 15 y 22 de cada 713 pentámeros son TGATT y CAATT respectivamente.

En diferentes fragmentos del satélite 3 se encuentra una distribución no aleatoria de secuencias que contienen CG. En el caso del cromosoma 14 las secuencias específicas de satélite 3 contienen ocho CGGGT y un CGAGT, mientras en el cromosoma Y en pHY10 (DYZ1) no contiene ningún CGGGT pero posee 15 CGAGT [57]. Estudios de desmetilación en células senescentes de líneas de fibroblastos embrionarios humanos (TIG-9), observaron que el 70% de los residuos de 5-metilcitosina en el satélite 3 eran perdidos, en contraste con el satélite 2 que se comportaba muy parecido al genoma total. Por lo que la desmetilación en secuencias del satélite 3 tiene una tasa mayor en comparación al genoma total y al satélite 2 a pesar de que la desmetilación del DNA ocurra en varias regiones del DNA durante los pasajes celulares [71].

El satélite 3 tiene una característica distintiva, es el sitio donde ocurren principalmente las translocaciones de tipo robertsonianas en seres humanos, la hipótesis es que el hecho de que son ricos en G, promueven la recombinación cromosómica por la formación de estructuras tetraplex. Este hallazgo fue localizado en el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos distales a los satélites alfa y proximales al satélite beta del DNA [22].

4. 5-azacitidina

4.1- Historia y función

La 5 azacitidina (5-azaC) es un inhibidor de la metilación del DNA, que fue aprobado por la FDA para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos en mayo del 2004. Esta droga es un nucleósido análogo de la citosina que induce la desmetilación del DNA por medio de la inhibición de las Dnmts [12, 42]. La 5-azaC también es un agente clastogénico debido a su incorporación al DNA y a la interferencia con la topoisomerasa II. Es un análogo de la citosina que posee un átomo de nitrógeno en la posición 5 en vez de un grupo metilo.

Originalmente la 5-azaC fue desarrollada como un agente citotóxico. Con el advenimiento de la epigenética y el descubrimiento de que era un agente hipometilante, se vio la utilidad de la 5-azaC en el tratamiento de cánceres en donde genes supresores de tumores se encuentran inactivos por la hipermetilación de sus regiones promotoras. Hoy en día la 5-azaC es usada en el tratamiento de leucemia aguda mieloide y síndromes mielodisplásicos, y se están llevando a cabo los estudios fase I y fase II en diferentes cánceres, que incluyen al cáncer colorectal, de cabeza y cuello, carcinomas renales y melanomas malignos [42].

La 5-azaC y su análogo 5 azadeoxicitidina (5-azadC) son inhibidores de las Dnmts. Esto se explica por la química del proceso de metilación del DNA, recordemos que al llevarse a cabo la unión covalente entre el residuo de citosina y la Dnmt por medio de un ataque nucleofílico del tiolato de la cisteína en el carbono 6 del anillo de la citosina y termina con la remoción de un hidrogeno del carbono 5. Cuando la 5-azaC y la 5-azadC remplazan a la citosina en del DNA, el carbono 6 de la citosina reacciona con el tiolato de cisteína de la enzima y forma un aducto 5,6-dihidropirimidina, la enzima permanece unida covalentemente bajo condiciones

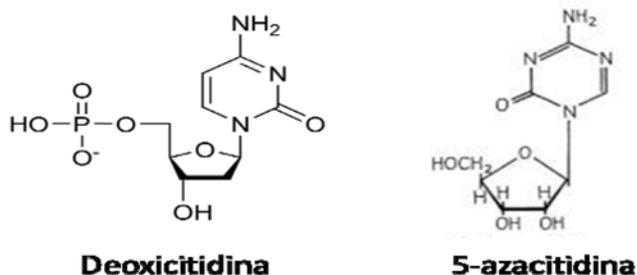
fisiológicas y no puede ser liberada del residuo 5-azadC, teniendo como consecuencia la disminución de la concentración de Dnmts funcionales en la célula. El resultado de este fenómeno es la disminución en la metilación genómica [42].

Anteriormente se pensaba que el efecto citotóxico de la 5-azaC y la 5-azadC se debía a su intercalamiento en el DNA reemplazando a la citosina y generando la desmetilación de genes. Pero una vez que se tuvo bien establecida la química de la reacción de metilación se vio que el efecto citotóxico dependía principalmente de la unión covalente e irreversible de la droga con el DNA. Esto fue demostrado en células de ratones en los cuales se compararon células silvestres contra células heterocigotas y homocigotas en una mutación de las Dnmts, encontrándose que en aquellas células mutadas había una resistencia a la 5-azadC a dosis mucho mayores que en las normales [42]. Esto también se comprobó en ratones con las mismas mutaciones. Un hallazgo interesante es que en aquellos ratones heterocigotos, que tenían dos veces menos Dnmt que la concentración normal, tenían pocas consecuencias biológicas y vivían más de 2 años a pesar del tratamiento con 5-azadC en su gestación. Por lo que el nivel de Dnmt en vez de ser una alteración indefinida, es la principal determinante de la toxicidad. La importancia de esto reside en que es un predictor del efecto del tratamiento con 5-azaC y 5-azadC en tumores malignos, donde aquellos cánceres que sobreexpresen la Dnmt son más sensibles al tratamiento, y aquellos tumores con variantes que expresen menos Dnmts serán más resistentes al tratamiento [42].

Ambos medicamentos llevan a un acortamiento en el tiempo de vida de las células en cultivo [13, 33], y a su vez generan la senescencia prematura seguida de la reducción de niveles de metilación normal, esto fue observado en fibroblastos humanos [83]. Dicha senescencia prematura no fue observada en cultivos de fibroblastos deficientes de p21, lo que sugiere que esto puede ocurrir por una activación del punto de monitoreo en respuesta al daño en el DNA o por lesiones causadas por el efecto desmetilante de la 5-azaC, en vez de ser por una activación transcripcional de genes particulares por la desmetilación del DNA.

Se ha observado que la 5-azaC promueve la fragmentación y elongación de cromosomas [48]. A su vez, es bien conocido que una pequeña dosis de 5-azaC y de 5-azadC, inhibe la condensación de la heterocromatina constitutiva en células humanas, especialmente en la región pericentromérica de los cromosomas 1, 9, 16 y en el brazo largo del cromosoma Y en linfocitos humanos [23, 24]. A su vez se demostró que el tratamiento con 5-aza-C en cultivos

de linfocitos genera que estos cromosomas sean excluidos preferencialmente del núcleo generando micronúcleos [23]. Es en estos cromosomas donde se encuentra principalmente y con mayor abundancia las repeticiones de los satélites clásicos 2 y 3 [27, 38,72]. También es en esta región donde se ve predominantemente la tinción con un anticuerpo específico de 5-metilcitosina en metafases de humanos [49]. De la misma manera el tratamiento de líneas celulares embrionarias y de leucocitos con diferentes dosis de 5-azaC indicó que a altas concentraciones las aberraciones cromosómicas y rearrreglos, en especial en los cromosomas 1 y 16, eran más frecuentes, y que incluso en concentraciones citotóxicas mínimas de 5-azaC y de 5-azadC se inducían formaciones inusuales de rearrreglos cromómicos en las regiones pericentroméricas, principalmente anomalías numéricas así como rearrreglos entre los cromosomas 1, 9, y 16 [78]. Estas anomalías en el cromosoma 1 han sido reportadas en cáncer de mama y en el tumor de Wilms, así como en otros tipos de cáncer [5, 40].



4.2- Metabolismo de la 5-azacitidina

El cambio de un carbono por un nitrógeno de la posición 5 del anillo heterocíclico de la citidina resulta en una marcada inestabilidad química. El producto de la apertura del anillo, N-formilamidinribofuranosil guabilurea, puede ser reciclado aunque también es susceptible a descomposición [47]. Este mecanismo de acción no sólo juega un papel en el mecanismo de acción sino también es un problema en el uso clínico de la 5-azaC. La 5-azaC puede ser desaminada por la citindesaminasa hacia 5-azauridina (5-azau), la cual es un compuesto menos tóxico. Si esta desaminación es inhibida por la tetrahidouridina, la toxicidad de la 5-azaC aumenta [50].

La 5-azaC entra a las células de mamíferos por medio de un mecanismo de transporte de nucleósidos el cual es compartido con otros nucleósidos. El paso inicial en su activación es la conversión de 5-azaC monofosfato (5-azamp) por la uridina-citidina cinasa [45]. Una vez en

estado de 5-azamp, es fosforilada hacia 5-azaC di y trifosfatada por las cinasas CMP-UMP-dCMP y la cinasa nucleósido difosfato, respectivamente. 5-azaC-trifosfato es durante varias horas el metabolito dominante en las células tratadas con 5-azaC, y es posible que sea incorporado en el RNA, pero no está definido cómo sucede esta incorporación. 5-azaC-difosfato es reducido por la reductasa ribonucleotídica a un dioxinucleótido difosfato (5-azadC), este difosfato es fosforilado por la cinasa nucleósido-difosfato hacia 5-azadC trifosfato (5-azadCTP), el cual a su vez es incorporado eficientemente al DNA por medio de la DNA polimerasa α y β [Figura 4] [50, 58]; Cancer Hot drugs; www.nature.com/reviews/drugdisc).

Figura 4- Representación esquemática de la vía metabólica de la 5-azacitidina.

Justificación

La heterocromatina pericentromérica es un componente de los cromosomas que parece ser esencial para la segregación adecuada de éstos así como para el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Algunas enfermedades en seres humanos se han relacionado con alteraciones en la heterocromatina pericentromérica, entre ellas el síndrome ICF, caracterizado por la presencia de inestabilidad cromosómica y por defectos en la formación del centrómero. Los patrones de metilación del DNA de los satélites 2 y 3 que se encuentran dentro de las regiones pericentroméricas están altamente metilados en condiciones normales, y no se sabe cuál es el papel de estos patrones de metilación en el mantenimiento de la estabilidad de estas regiones. Hasta la fecha no se ha estudiado el efecto en el patrón de metilación de esta región por una técnica tan específica para su observación como es la secuenciación seguida de la reacción de bisulfito.

Hipótesis

El tratamiento con 5-azaC alterará el patrón de metilación de los sitios CpG del satélite 2 de las regiones pericentroméricas de manera proporcional a la duración del tratamiento.

Objetivo general

Evaluar si existe un efecto en el patrón de metilación del satélite 2 con respecto al tratamiento con 5-azaC.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de la 5-azaC en la metilación con respecto al tiempo de tratamiento.
2. Evaluar si existe un patrón específico de metilación CpG y no-CpG en esta región y su correlación con los tiempos de tratamiento

Material y métodos

Cultivo de linfocitos y tratamiento

Se realizó el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica completa tomada de dos individuos sanos utilizando el medio RPMI 1640 suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% de L-Glutamina (Sigma). Las células se cultivaron durante tres periodos de estudio: 24, 48 y 72 h de exposición a 5-azaC (10 μ M) con sus respectivos controles; se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (anexo 2.I).

Aislamiento del DNA y estudio de la metilación mediante la técnica de bisulfito de sodio

Una vez transcurrido el periodo de tratamiento de cada cultivo se aislaron los linfocitos del medio y se extrajo el DNA utilizando un método convencional con proteinasa K, alcohol isoamílico y fenol cloroformo (anexo2.II). Una vez extraído el DNA, se realizó la reacción de bisulfito con el fin de obtener el patrón de metilación en los periodos de tratamiento y sus controles, así como en una muestra de 5 ml de sangre que se tomó de los dos individuos para obtener el patrón normal de metilación *in vivo*, a este le llamamos periodo 0 h.

La reacción de bisulfito permite observar cada una de las citosinas tanto CpG como no-CpG mediante una secuenciación de la región de interés, donde aquellas citosinas que se encuentran desmetiladas son convertidas por medio de una desaminación a uracilos y serán detectadas en la secuenciación como timinas [17, 53]. A diferencia de las técnicas convencionales de enzimas de restricción sensibles a sitios metilados CpG, en donde, estas citosinas no pueden ser observadas en su totalidad, ya que las enzimas sólo toman aquellas citosinas que posean una secuencia específica reconocida por la enzima. En el caso del satélite 2 es sabido que por medio de enzimas de restricción sólo se observa aproximadamente el 5% de los sitios CpG [38].

La reacción con bisulfito comenzó con una digestión del DNA genómico total con la enzima BamH1; se digirieron de 2 a 4 μ g de DNA con una unidad de la enzima. Una vez digerido, se precipitó el DNA con NaOAc 2 M y etanol al 100 y 70%. Se realizó la reacción de bisulfito de sodio con las recomendaciones para secuencias con los altos niveles de CG y para las regiones altamente compactas de heterocromatina [74] (anexo2.III).

Una vez realizada la reacción de bisulfito, se amplificó un fragmento del satélite 2 de 400 pb con primers modificados especialmente para esta técnica [27]. Los primers modificados para bisulfito son degenerados, es decir, poseen variaciones en la secuencias representadas por la letra R, lo que implica que en esa posición puede haber G o A. En el caso de primer sat2biup-2r hay dos “R” por lo que existen cuatro diferentes primers en esos oligos correspondiendo a las permutaciones posibles que existen en la secuencia.

En total se emplearon tres juegos de primers:

Primer juego

Sat2-384U 5'- ATGGAAATGAAAGGGGTCATCATCT-3'

Sat2-781L 5'- ATTCGAGTCCATTCGATGATTCCAT-3'

Los cuales amplifican el DNA satélite 2 no modificado.

Segundo juego

Sat2-biup-1f, 5'- TTGAATGGAAATGAAAGGGGTTATTA-3'

Sat2biup-2r, 5'-C[R]AATCCATTC[R]ATAATTCCATTCC-3'

Los cuales amplifican DNA satélite modificado con bisulfito en una región muy similar de 400 pb y que confirma una conversión exitosa.

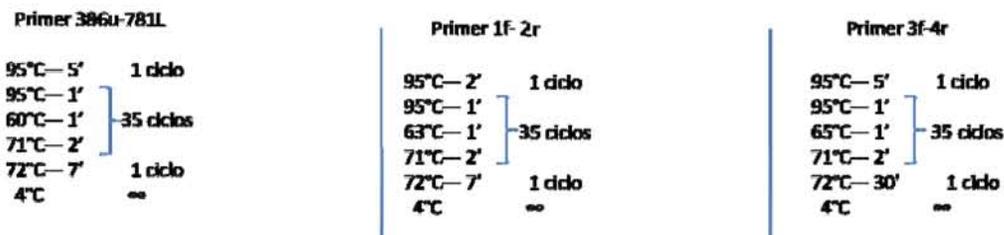
Tercer juego

sat2biup-3f, 5' TGGAAATGAAAGGGGTTATTATTA- 3'

sat2biup-4r, 5'-AATCCATTCCATTCCATTC[R]ATA-3'

Estos primers amplifican el producto previo de una manera más específica 382 pb.

El ciclaje de los primers fue el siguiente:



Las muestras amplificadas se corrieron en geles de agarosa al 2.5%, junto con un marcador de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron con luz UV en el fotoiluminador *UVP-Biolmaging controller, Hammamatsu camera*, y fueron visualizados con el programa *Labworks 4.5*. Después de la amplificación con la primera ronda de primers degenerados biup 1f y 2r, fue necesario purificar el producto de la reacción para eliminar la presencia de estos oligos en la amplificación con los primers anidados biup 3f y 4r. La purificación fue realizada con el kit de purificación de PCR QIAquick de QIAGEN, siguiendo las instrucciones de la compañía fabricante (anexo2.IV).

Ligación y transformación

La ligación se realizó tomando el resultado de la amplificación con los primers anidados biup3f y 3r. Se usó el *kit InsTAclone PCR Cloning* (Fermentas), según las especificaciones del fabricante. La transformación se realizó en las bacterias DH5 α tomando una cepa congelada que se tenía en el laboratorio. Estas se hicieron químicamente competentes con el método de CaCl₂ 100 mM/Tris 10mM, a pH 7.5. La transformación se realizó siguiendo las instrucciones del *kit InsTAclone PCR Cloning* (Fermentas), con la única modificación del uso de 2 ml de medio SOC en vez de 1 ml como plantea el fabricante. Una vez transformadas, las bacterias se cultivaron en cajas de petri con 20 ml de medio LB sólido que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, durante una noche (12 a 14 h) a 37°C. Sólo aquellas bacterias que habían sido eficientemente transformadas sobrevivieron en el cultivo y desarrollaron colonias. Ya crecidas las colonias, se seleccionaron con un asa bacteriológica 36 colonias y se sembraron en placas con 20 ml de medio LB sólido que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, durante 12 a 14 h a 37°C. Después se tomaron las colonias seleccionadas y se cultivaron en tubos de ensayo de 15 ml que contenían 4 ml de medio LB con 50 μ g/ml de ampicilina y se incubaron en un agitador a 37°C (Shaker Bath de Orbit) 12 a 14 h (anexo2.V).

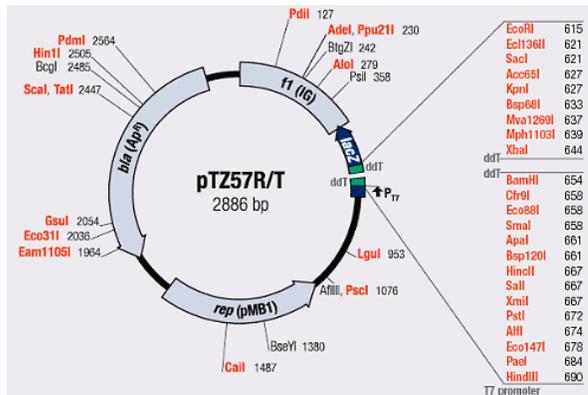


Figura 5. Mapa del vector pTZ57R/t

A las bacterias transformadas y crecidas en medio líquido, se les realizó una extracción de plásmidos usando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las instrucciones de la compañía.

De los plásmidos extraídos se tomaron 300 ng de DNA y se digirieron con las enzimas HIndIII y EcoR1 en el buffer React 2 durante más de 4 h con el fin de buscar las clonas que poseían los fragmentos de 400 pb de satélite 2 que necesitábamos. Por cada periodo de tratamiento se cultivaron y extrajeron 30 clonas de bacterias transformadas, con el fin de obtener al menos 6 clonas con el fragmento de 400 pb (anexo2.V).

Secuenciación

Después de que las clonas fueron seleccionadas, se realizó la secuenciación de las muestras. Esta fue realizada utilizando el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE BIOSYSTEMS) y se usó Big DyeTM TERMINATOR V3.1 CYCLE SEQUENCING KIT". La secuenciación se realizó mediante el primer -20 M13, 5.1 pmoles por reacción. Usando de 250 a 350 ng de DNA y 4 µl de Big Dye por muestra. El PCR se calculó para un volumen de 10 a 20 µl, dichas concentraciones están diseñadas según las recomendaciones del fabricante para secuencias con altos índices de GC's. El ciclaje de la secuenciación fue el siguiente (anexo2.VI):

97°C---7min 1 ciclo
 97°C---30 segundos
 50°C---15 segundos 50 ciclos
 60°C---4 minutos
 4°C

Análisis de las secuencias

El producto obtenido fue purificado utilizando columnas de sephadex G-50 fine o utilizando acetato de sodio y etanol. El análisis de los cromatogramas obtenidos por la secuenciación se realizó utilizando los programas Chromas pro 2.0 y el programa Bioedit (anexo 2.VII). Las secuencias fueron alineadas y comparadas con la secuencia del satélite 2 publicada en el proyecto genoma humano (obteniéndola por medio del *genome browser* de NCBI) y analizadas utilizando Office Word 2007 comparando base por base la secuencia consenso del *genome browser* con los cromatogramas de cada clona, donde aquellas secuencias que no tuvieran una similitud casi idéntica a la del genoma humano eran descartadas. El patrón de las secuencias se realizó haciendo una matriz de 1 y 0 en Office Excel 2007, donde 1 representa citosinas desmetiladas y 0 representa citosinas metiladas. Se analizaron 104 clones en total.

El análisis estadístico de los resultados fue hecho utilizando la prueba no paramétrica Mann-Whitney con ayuda del software estadístico MinitabTM (anexo 2, VIII).

Resultados

Reacción de bisulfito y secuenciación

Con el fin de determinar el efecto del tratamiento con 5-azaC a una dosis 10 μ M en el satélite 2 de linfocitos humanos, las células se expusieron durante tres periodos diferentes: 24, 48 y 72 h. Los cultivos fueron cosechados al término del tratamiento y el DNA fue extraído para evaluar la metilación del satélite 2 mediante la reacción de bisulfito de sodio. Se empleó el procedimiento propuesto por Hassan et al (2001) para observar un fragmento de 400 pb del satélite 2, el cual posee 20 sitios CpG que es un numero representativo de la estructura de los pentámeros que conforman el satélite 2.

La primera ronda de primers, los primers modificados sat2biup 1f y 2r según el reporte de Hassan et al., (2001) amplificaba un fragmento único, no obstante, nosotros obteníamos un bandeo diferencial donde además de la banda correspondiente a 400 pb se observaron bandas de 200 pb y superiores a 400 pb (Figura 7).

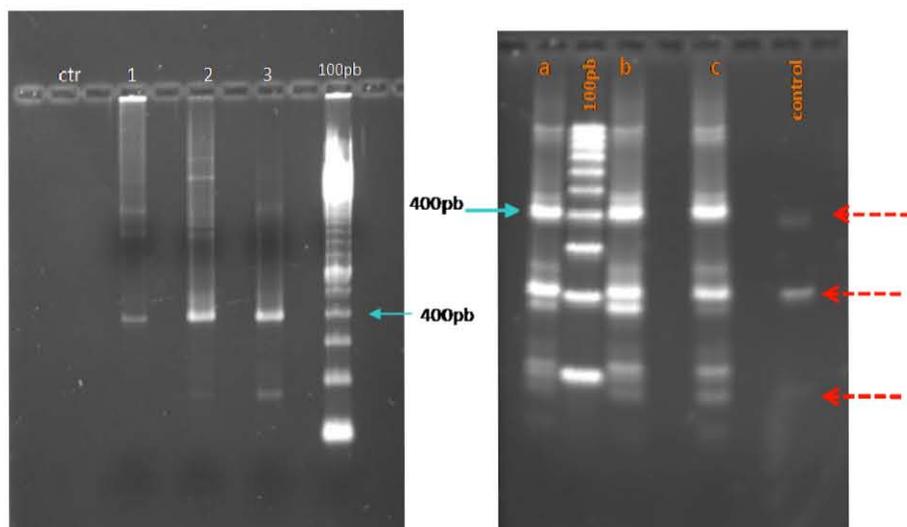


Figura 7. Amplificación de primers sat2biup 1f y 2r, geles de agarosa al 2.5%, muestran amplificaciones con los primers modificados sat2biup 1f y 2r. (→) Marcan el peso molecular de 400pb; (---->) marcan los dímeros formados por los primer; 1, 2 y 3 son las muestras de los tres periodos con un el ind1 y a, b y c son con el ind2.

Ese bandeo se intentó evitar aumentando la temperatura de alineamiento del PCR en muestras que no contenían DNA, sin embargo, al menos tres bandas eran siempre amplificadas en el

caso de sat2biup 1f y 2r, mientras el dímero que forman sat2biup 3f y 4r era removido a mayor temperatura (Figura 8). A su vez se buscó estandarizar la temperatura que evitaba la formación del bandeo en las muestras amplificadas por sat2biup 1f y 2r (Figura 9).

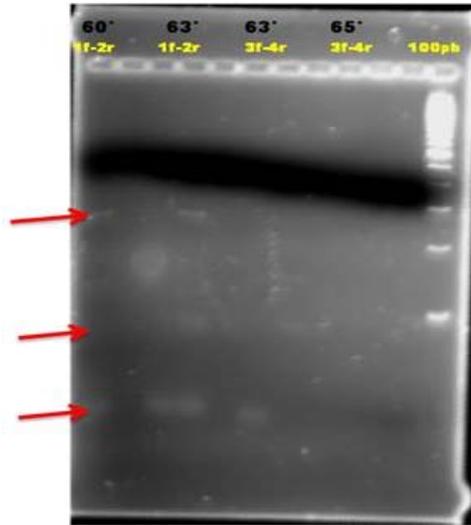


Figura 8- amplificación con muestras sin DNA, Gel de agarosa 2.5%, muestra las pruebas de temperatura de alineamiento de los dos juegos de primer modificados, 60°C a 63°C en el caso de sat2biup 1f-2r y de 63°C a 65°C en el caso de sat2biup 3f-4r. Las flechas rojas muestran los dímeros. Ninguna muestra contenía DNA para la amplificación.

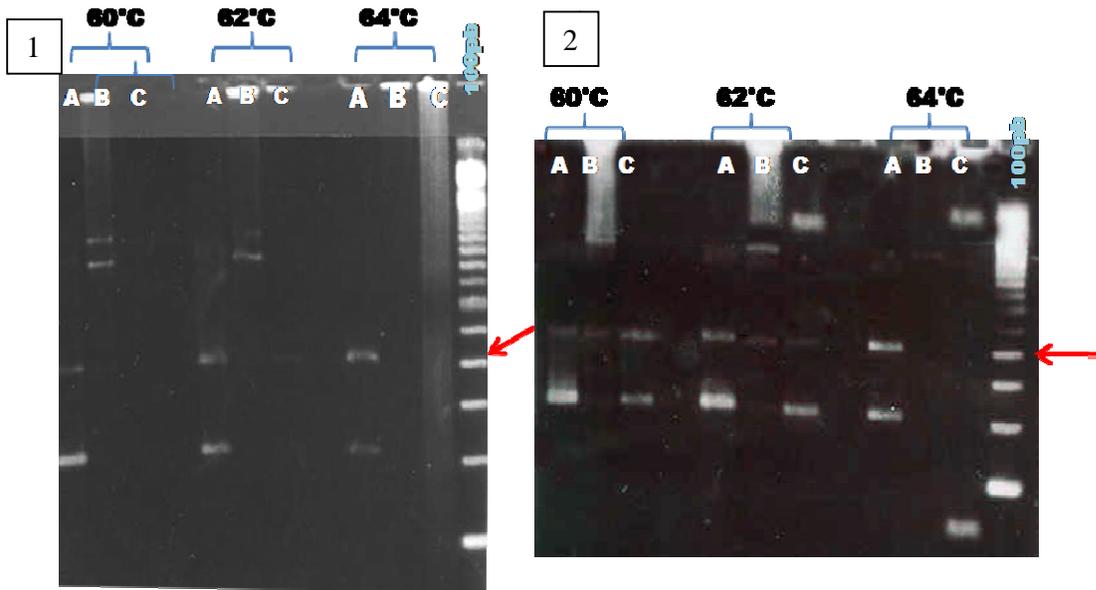


Figura 9- Amplificación de estandarización con sat2biup 1f-2r Gel de agarosa 2.5%, muestra las pruebas de temperatura de alineamiento, 60°C a 62°C y 64°C, donde 1) PCR utilizando 3mM de MgCl por muestra y 2) PCR utilizando 2.5mM de MgCl por muestra. En el caso de

sat2biup 1f-2r se vio que la mejor amplificación esta entre 62 y 64°C. Las flechas rojas muestran el peso de 400pb; A y B eran las muestras de DNA de diferentes individuos; C, es el control de cada amplificación.

Dichas bandas que surgían en el control negativo parecían ser dímeros provocados por la estructura de los primers degenerados. Después de la amplificación con sat2biup 1f y 2r se purificaron las muestras para eliminar la presencia de esos oligos para la amplificación con los primers anidados sat2biup 3f y 4r, el objetivo fue amplificar de manera más específica el fragmento de 400 pb, produciendo un fragmento de 380 pb aproximadamente (Figura 10).

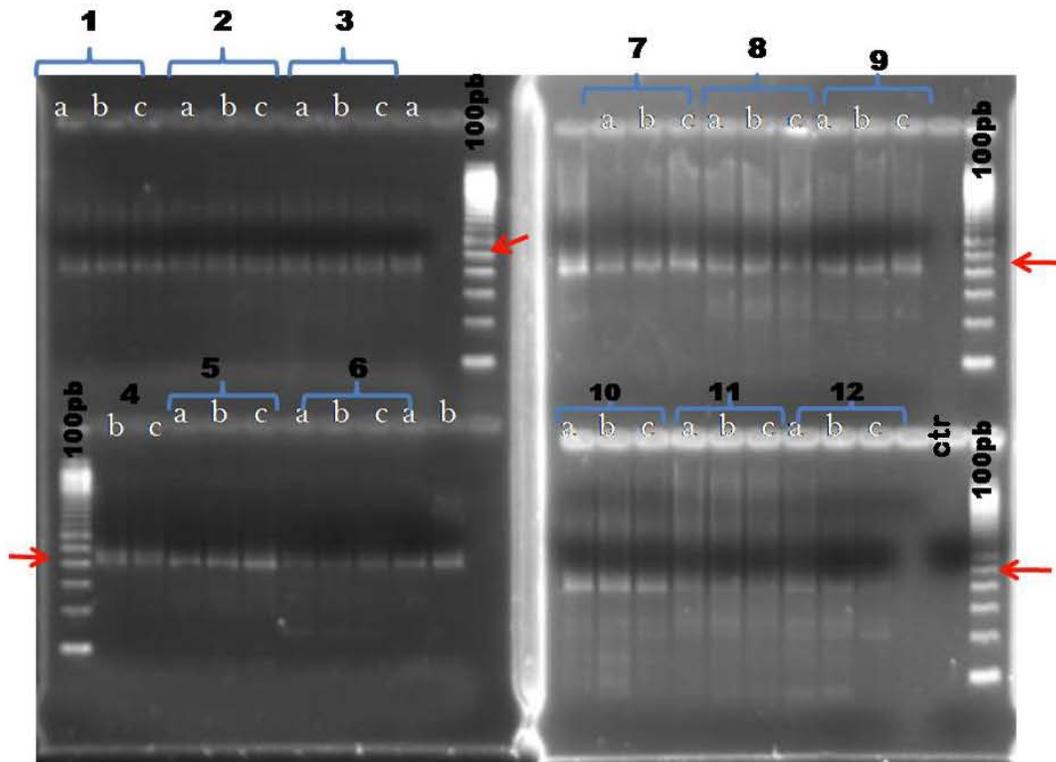


Figura 10- Amplificación con sat2biup 3f-4r ,gel de agarosa al 2.5%, muestran la amplificación de cada uno de los periodos de estudio en los dos individuos con su repetición; 1,2,3,7,8,9 son del ind 1 y 4,5,6,10,11y12 del ind2; ctr, es el carril control de la amplificación; las flechas rojas marcan el peso de 400 pb.

A pesar de ser primers anidados que según la publicación de Hassan et al (2001), deberían de amplificar únicamente el fragmento de 400pb, se seguían obteniendo varias bandas de diferentes pesos moleculares. Se intentó cortar la banda del 400 pb del gel de agarosa, para así tener sólo el fragmento deseado para la ligación con el plásmido pTZ53R/T del kit

INTAclone, pero nunca se logró obtener una buena purificación de la banda y cuando se intentó realizar la ligación esta mostraba una eficiencia menor a 20 clonas aún concentrando las bacterias. Por lo que se realizó una ligación directa del producto de la amplificación con los primers Sat2biup 3f y 4r. Esta ligación siempre fue exitosa con una dilución 1:1000 para así poder seleccionar las clonas y ser cultivadas en un medio con 50 µg/ml de ampicilina y finalmente realizar la extracción de los plásmidos. Una vez que se extrajeron los plásmidos, las muestras de cada clona fueron digeridas con las enzimas HindIII y EcoR1, con el fin de separar el fragmento de 400 pb del plásmido ptz53R/T. Debido a todos los diferentes fragmentos que amplificaban los primers de las 30 clonas extraídas por cada periodo del tratamiento y sus respectivos controles, sólo el 22% de las muestras tuvieron el fragmento deseado para nuestro estudio. (Figura 11).

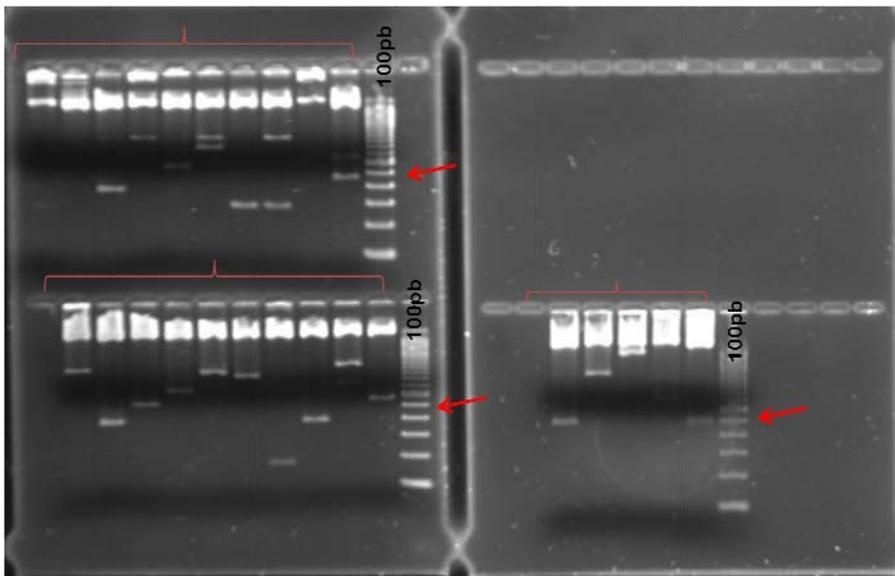
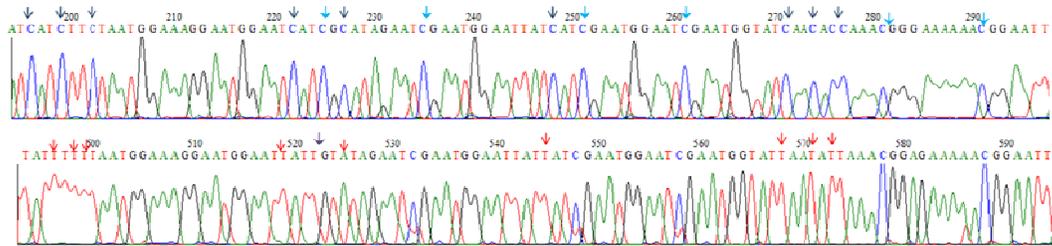


Figura 11- Digestión de clonas, gel de agarosa al 2.5%. Diferentes fragmentos obtenidos después de la digestión con una unidad de HindIII y EcoR1; en paréntesis se encuentran las diferentes clonas digeridas; las flechas rojas marcan el peso de 400 pb.

Una vez identificadas las clonas con el fragmento de interés, estas fueron secuenciadas como se explicó en la metodología y se analizaron con el programa Chromas pro 2.0 y Bioedit (Figura 12 y 13).

A



B

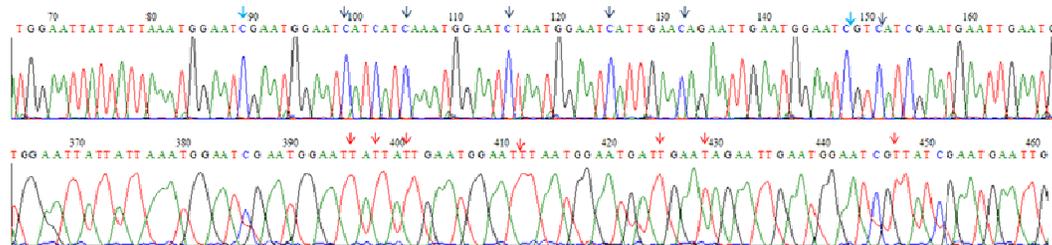


Figura 12. Cromatogramas de una parte de la secuencia del satélite 2. A) Muestra la diferencia entre una secuencia metiladas tanto en citosinas CpG como en no-CpG (cromatograma superior) y una secuencia desmetiladas por el tratamiento (inferior); B) otra parte de la secuencia del satélite dos donde se comparan secuencias metiladas tanto en citosinas CpG como en no-CpG (cromatograma de superior) y una secuencia desmetilada por el tratamiento (inferior). Las flechas negras marcan las citosinas no-CpG y las rojas las citosinas no-CpG desmetiladas, las flechas azules marcan a las citosinas CpG.

A) Secuencia del satélite 2 (380pb) reportada en base de datos de Santa Cruz

TGAAATGAAA**GGGGT****CATCAT**CATAATGGAAT**CG**CATGGAAT**CATCAT**CAAATGGAAT
CGAATGGAAT**CATCAT**CAAATGGAATCTATGGAATCATTGAA**C**AGAATTGAATGGAA
T**CGT**CAT**CG**AATGAATTGAATGCAAT**CAT**CGAATGGTCT**CG**AATGGAAT**CAT**CTTCTAAT
GGAAAGGAATGGAAT**CAT**CGCATAGAAT**CG**AATGGAATTAT**CAT**CGAATGGAAT**CG**AAT
GGTATCAA**CCCAA****CG****AGAAAAA****CG**GAATTAT**CG**AATGGAAT**CG**AGAGAAT**CTT**CGA
A**CGG**AC**CC**GAATGGAAT**CAT**CTAATGGAATGGAATGGAATAAT**CC****CG**GACT**CG**AATG
CAAT**CATCAT****CG**AATGGAATGGAATGGAA

B) Secuencia del satélite 2 (380pb) modificada por bisulfito

TGAAATGAAA**GGGGT****TATTATT**TAATGGAAT**CGT**ATGGAAT**TATTATT**TAATGGAAT
CGAATGGAAT**TATTATT**GAATGGAATTAATGGAAT**TATTATT**AGAATTGAATGGAAT**C**
GTTAT**CG**AATGAATTGAAT**TATTATT**GT**CG**AATGGTT**CG**AATGGAAT**TATTATT**TAATGGA
AAGGAATGGAAT**TATTATT**TAT**TG**TATAGAAT**CG**AATGGAATTAT**TATTATT**CGAATGGAAT**CG**AATGGT
ATTAA**TATT**AAA**CG****AGAAAAA****CG**GAATTAT**CG**AATGGAAT**CG**AAGAGAAT**TT**CGA
A**CG**GAT**CG**AATGGAAT**TATTATT**TAATGGAATGGAATGGGATAAT**TATTATT****TG**GAT**CG**AATGT
AATTATTAT**CG**AATGGAATGGAATGGAATAA

Figura 13. Secuencia de 380 pb del satélite 2. **A)** secuencia del satélite 2 reportada en la base de datos de Santa Cruz. **B)** secuencia del satélite 2 modificada por bisulfito al 100% que se encontró a las 48hT del ind 2. En gris se marcan las citosinas no-CpG y en amarillo las citosinas CpG, en rojo se marcan las secuencias clave para identificar el fragmento.

2.- Efecto del tratamiento con 5-azaC en la metilación de la región pericentromérica

El número de citosinas desmetiladas observadas en las células no tratadas se mantuvo entre 2 y 4, en sitios CpG, y entre 7 y 9 en sitios no-CpG, independientemente del tiempo de cultivo. Los resultados mostraron una diferencia en la desmetilación inducida por la 5-azaC en citosinas de sitios CpG y no-CpG. La 5-azaC produjo una desmetilación significativa en sitios CpG sólo después de 72 h mientras que este compuesto indujo una desmetilación importante en las citosinas de sitios no-CpG desde el inicio del tratamiento (Figura 14).

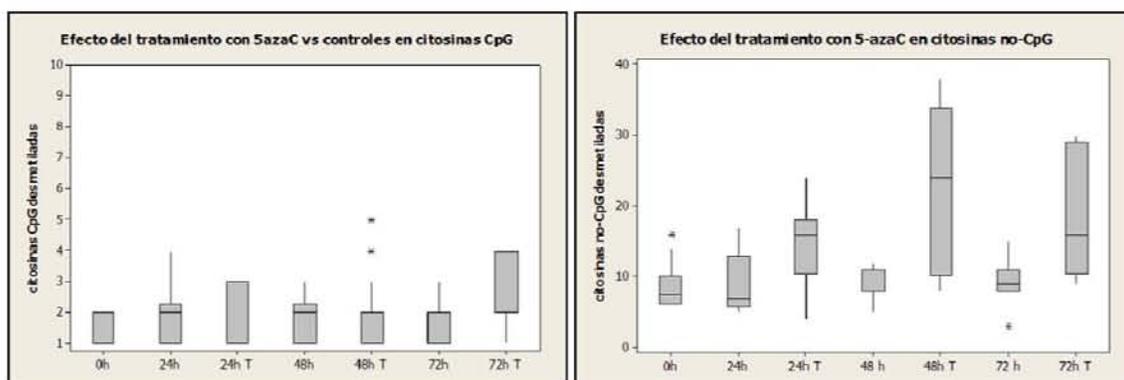


Figura 14. Efecto del tratamiento con 5-azaC 10 μ M en los sitios CpG del satélite 2 (derecha) y no-CpG (izquierda). Los asteriscos significan datos que están muy alejados del resto de los datos de esa población, la T significa muestras tratadas con 5-azaC.

Al comparar las medianas del total de citosinas desmetiladas en los diferentes tiempos de tratamiento con sus respectivos controles se encontraron diferencias significativas (Tabla 1, y Figura 15). A las 24 h de tratamiento la mediana de citosinas no-CpG desmetiladas fue de 16 ($p= 0.008$), a las 48 h la mediana fue de 24 ($p=0.0001$) y a las 72 h la mediana fue de 29 ($p=0.001$). La única diferencia significativa encontrada en la desmetilación de citosinas no-CpG entre los diferentes periodos de tratamiento fue entre las 24 y las 48 de tratamiento con 5-azaC ($p=0.03$).

Tabla 1. Efecto del tratamiento con 5-azaC en la metilación del satélite 2 de sitios no-CpG (izquierda) y CpG (derecha), en amarillo se encuentran la comparación de medianas que resultó estadísticamente significativa con la prueba Mann-Whitney.

Prueba Mann Whitney en no CpG	P con 95% de confianza	Prueba Mann whitney en CpGs	P con 95% de confianza
no CpG 0h vs no CpG 24h	0.4753	CpG 0h vs CpG 24h	0.2461
no CpG 0h vs no CpG 48h	0.8975	CpG 0h vs CpG 48h	0.1199
no CpG 0h vs no CpG 72h	0.4346	CpG 0h vs CpG 72h	0.4317
no CpG 0h vs no CpG 24h Tratado	0.0008	CpG 0h vs CpG 24h tratado	0.4537
no CpG 0h vs no CpG 48h Tratado	0	CpG 0h vs CpG 48h tratado	0.155
no CpG 0h vs no CpG 72h Tratado	0.0006	CpG 0h vs CpG 72h tratado	0.0007
no CpG 24h vs no CpG 48h	0.5715	CpG 24h vs CpG 48h	0.95
no CpG 24h vs no CpG 72h	0.4617	CpG 24h vs CpG 72h	0.8334
no CpG 24h vs no CpG 24h Tratado	0.0081	CpG 24h vs CpG 24h tratado	0.6706
no CpG 24h vs no CpG 48h Tratado	0.0004	CpG 24h vs CpG 48h tratado	1
no CpG 24h vs no CpG 72h Tratado	0.0061	CpG 24h vs CpG 72h tratado	0.0348
no CpG 48h vs no CpG 72h	0.5096	CpG 48h vs CpG 72h	0.7175
no CpG 48h vs no CpG 48h tratado	0.0001	CpG 48h vs CpG 48h tratado	0.9254
no CpG 48h vs no CpG 72h tratado	0.001	CpG 48h vs CpG 72h tratado	0.0144
no CpG 72h vs no CpG 72h tratado	0.0166	CpG 72h vs CpG 72h tratado	0.0272
no CpG 24h tratado vs no CpG 48h T	0.0301	CpG 24h tratado vs CpG 48h T	0.5947
no CpG 24h tratado vs no CpG 72h T	0.3389	CpG 24h tratado vs CpG 72h T	0.0032
no CpG 48 h tratado vs no CpG 72hT	0.5388	CpG 48h tratado vs CpG 72h T	0.02

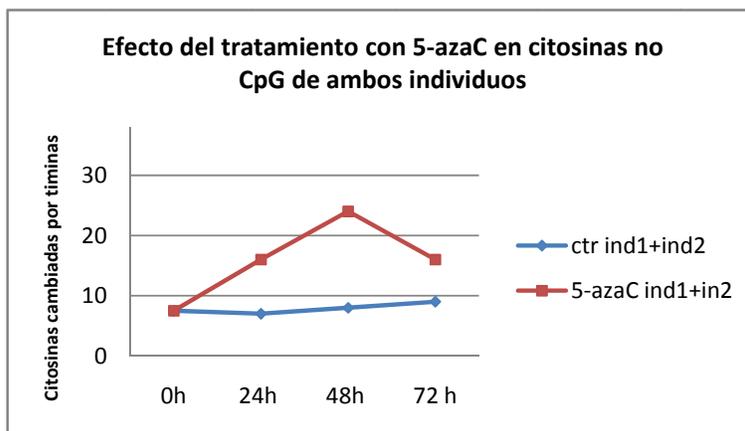
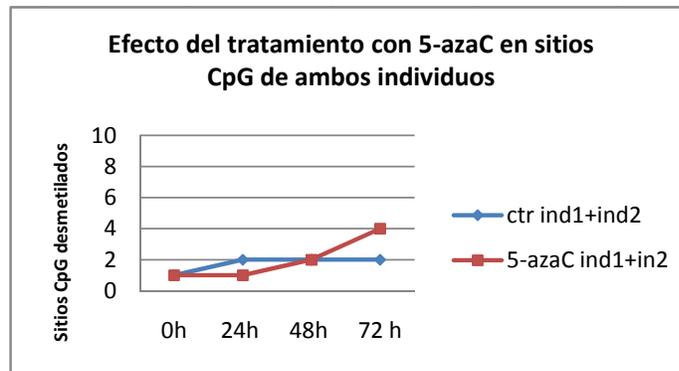


Figura 15. Gráfica de medianas que muestra el efecto del tratamiento con 5-aza 10 μ M en sitios CpG (arriba) y no-CpG (abajo).

3.- Cambios en el patrón de metilación inducidos por 5-azaC

Con el fin de observar si existía un patrón de metilación específico del satélite 2 en linfocitos humanos cultivados y si el efecto del tratamiento con 5-azaC inducía una desmetilación específica en ciertos sitios, se organizó una matriz donde se analizó citosina por citosina de la secuencia amplificada. Se consideró como un patrón sólo cuando la citosina involucrada cambiara por timina en más del 50% de las clonas secuenciadas por cada periodo de tratamiento. Los resultados mostraron que en los sitios CpG la citosina 18 se encuentra desmetilada incluso en los cultivos no tratados, y que no hubo un efecto significativo en el patrón de metilación con el tratamiento con 5-azaC en las citosinas CpG (Figuras 16 y 17).

patrón CpG	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11	CpG12	CpG13	CpG14	CpG15	CpG16	CpG17	CpG18	CpG19	CpG20
0h	0.21	0	0	0	0.056	0	0	0	0	0.055	0	0	0	0	0	0	0.055	1	0	0
24h	0	0	0	0	0.125	0.25	0	0.125	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	1	0.5	0
48h	0.2	0	0.2	0	0	0.167	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0.334	1	0.1	0.1
72 h	0.145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0.167	1	0.1	0.1
24 h T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.22	0	0.035	0	0	0.1	0.017	0.035	1	0.135	0
48 h T	0	0.034	0.118	0.25	0.017	0	0.017	0.017	0	0	0	0.035	0	0	0.1	0.017	0.035	1	0.135	0
72h T	0.25	0	0	0	0	0	0.125	0	0.125	0	0	0.5	0.375	0	0	0.375	0.375	0.75	0.25	0

Figura 16. Patrón de metilación y efecto del cultivo y del tratamiento con 5-azaC 10 µM en las citosinas CpG, en verde se muestran las citosinas desmetiladas en la población de estudio de manera natural; en azul las citosina desmetiladas de manera aleatoria por el tratamiento con 5-azaC.

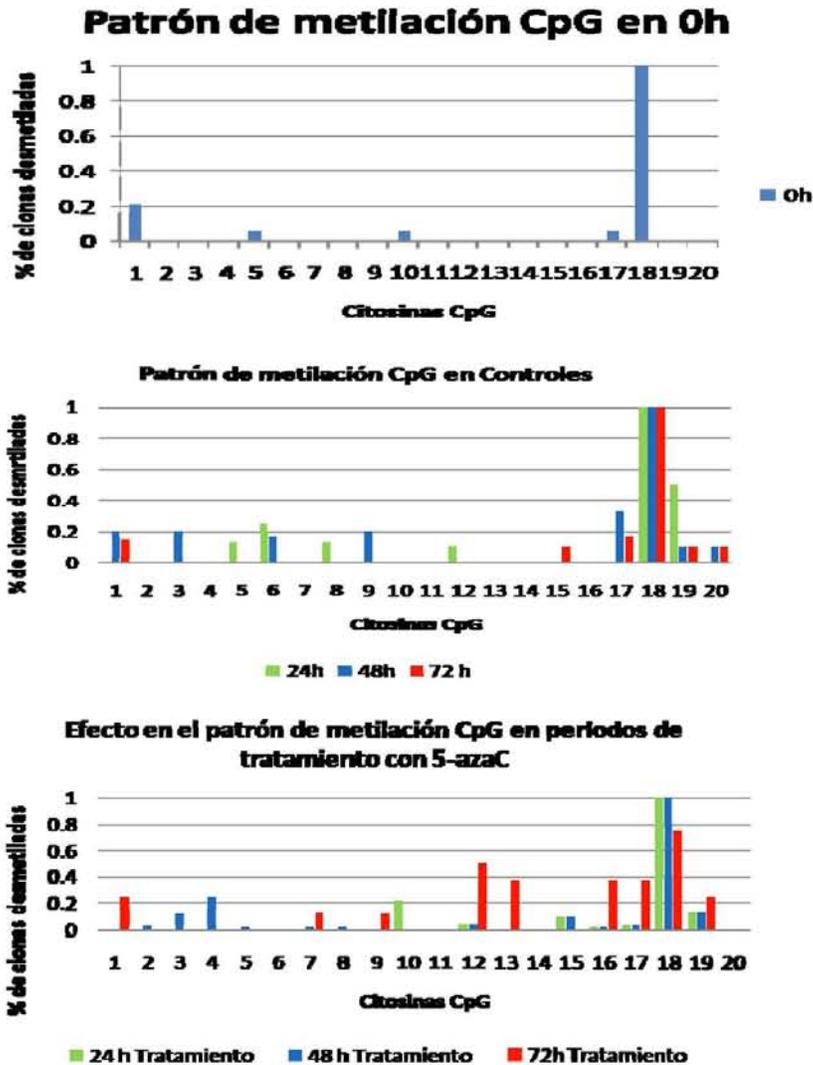


Figura 17. Representación esquemática del patrón de metilación CpG *in vivo* (gráfica superior izquierda), en periodos controles (gráfica superior derecha), y en los periodos de tratamiento con 5 azaC 10 μ M (inferior izquierda).

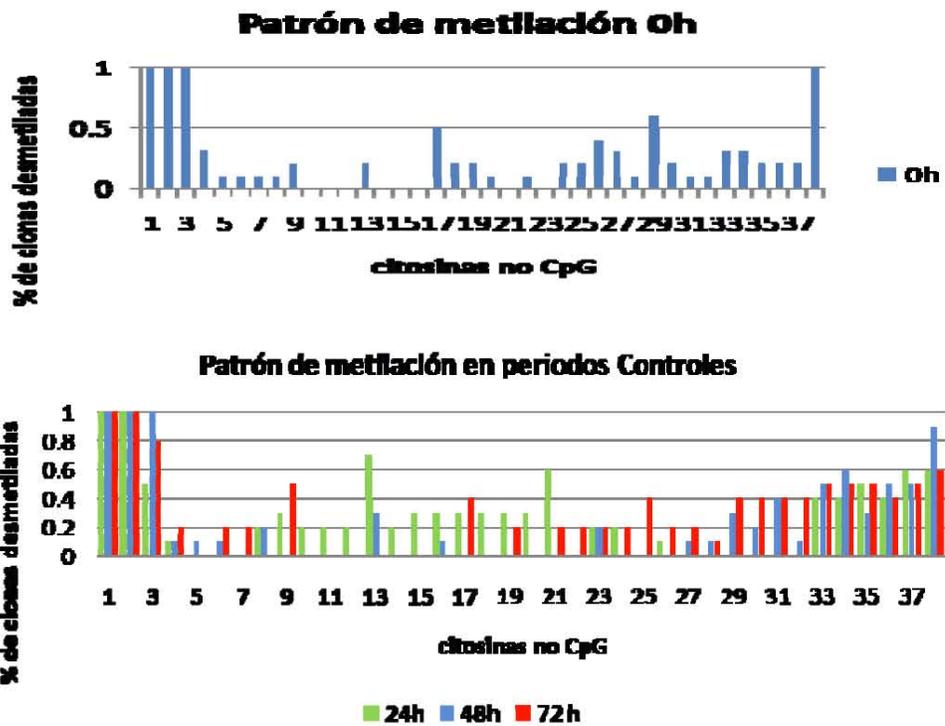
En contraste, las citosinas no-CpG mostraron un patrón de desmetilación más constante, pudiendo distinguirse cuatro grupos (Figuras 18 y 19):

- 1) Las citosinas no-CpG que se encuentran desmetiladas desde el inicio del cultivo (0 h) hasta las 72 h en cultivos tratados y no tratados, que son las citosinas 1, 2, 3 y 38;
- 2) Las citosinas no-CpG que se desmetilan únicamente con el tratamiento con 5-azaC, que son las citosinas 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, y 23 a 32;
- 3) Aquellas citosinas no-CpG que se desmetilan por efecto del cultivo celular, que son las citosinas 33 a 37; y

4) Citosinas no-CpG que se desmetilan sólo en alguno de los periodos de cultivo o tratamiento, coincidiendo sólo la citosina 13 en las 24 h del control y del tratado.

patrón no CpG	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38			
0h	1	1	1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0.5	0.2	0.2	0.1	0	0.1	0	0.2	0.4	0.3	0.1	0.6	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	1				
24h	1	1	0.5	0.1	0	0	0	0.2	0.3	0.2	0.2	0.7	0.7	0.9	0.5	0.3	0.3	0.6	0	0.2	0.2	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.6	0.6		
48h	1	1	1	0.1	0.1	0	0.2	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0.4	0.4	0.1	0.5	0.6	0.3	0.5	0.5	0.9
72h	1	1	0.8	0.2	0	0.2	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0.2	0	0.2	0.7	0.7	0.4	0.7	0.2	0.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6		
24 h T	1	1	1	0.8	0.7	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2	0.4	0	0	0.5	0.7	0.8	0.6	0	0.6	0.6	0.7	0.9	0.5	0.6	0.8	0.5	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.7	0.8	1				
48 h T	1	1	0.8	0.7	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4	0.6	0.4	0.4	0.7	0.3	0.4	0.6	0.6	0.2	0.3	0.8	0.7	0.7	0.3	0.6	0.6	0.7	0.8	0.9	1					
72h T	1	1	1	0.7	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3	0.6	0.4	0.4	0.7	0.3	0.4	0.6	0.6	0.2	0.3	0.8	0.7	0.7	0.3	0.6	0.6	0.7	0.8	0.9	1						

Figura 18. Patrón de metilación obtenido por la agrupación de resultados de ambos individuos, en verde: patrón de citosinas no metiladas en ningún periodo del estudio; amarillo: citosinas no-CpG que se desmetilan por senescencia in vitro; Rojo: citosinas no-CpG desmetiladas únicamente por el efecto de la 5-azaC; azul: citosinas desmetiladas en solo uno de los periodos de estudio.



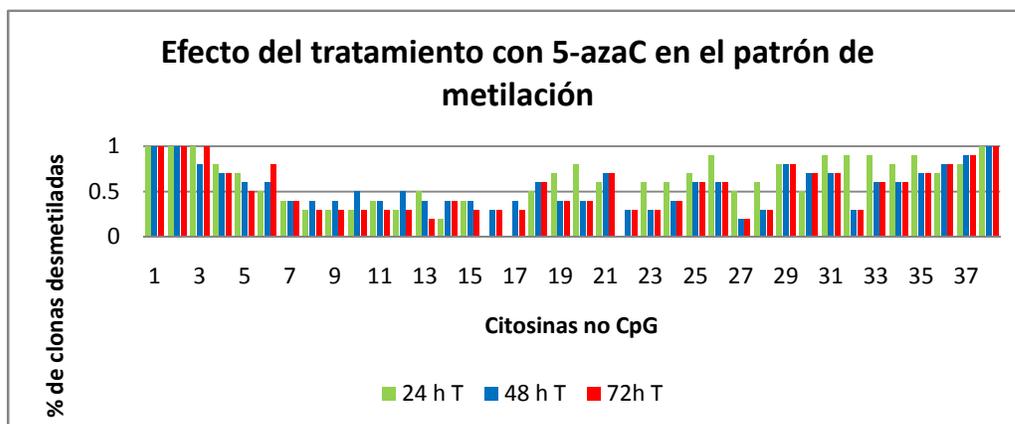


Figura 19. Representación esquemática del patrón de metilación en el periodo de 0h, en los periodos controles y en los periodos de tratamiento con 5-azaC 10 μ M de las citosinas no-CpG.

Se observó que en su mayoría las citosinas no-CpG eran del dinucleótido CpA (65.8%), seguidas por dinucleótidos CpT (21.0%) y por el dinucleótido CpC (13.1%). A su vez, la mayoría de las citosinas no-CpG desmetiladas por el tratamiento con 5-azaC correspondieron al dinucleótido CpA y CpC (Tabla 2).

Tabla 2. Dinucleótidos no-CpG, y su posición.

Dinucleótidos	# de citosinas	% de citosinas	Posición de los diferentes dinucleótidos en el fragmento de 400pb
CpA	25	65.8	1,2,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,18,21,22,23,24,31,34,36,37,38
CpT	8	21.0	3,11,17,19,20,28,32,35
CpC	5	13.2	25,26,29,30,33

Es importante hacer notar que se encontraron algunas diferencias en los patrones de metilación observados en las células de ambos individuos. Sólo a las 72 h de tratamiento, las citosinas 1 y 12 se encontraron desmetiladas en más del 50% de las clonas del individuo 1 (Figura 20, arriba). Mientras en el individuo dos se observó que desde las 24 h de cultivo, sin tratamiento, se desmetilaron las citosinas 6 y 19 en más del 50% de las clonas, y a las 48 h se desmetiló preferencialmente la citosina 17. El tratamiento a las 24 h mostró una

desmetilación preferencial en la citosina 12 y 17, las cuales también se desmetilaron a las 72 h de tratamiento junto con las citosinas 13 y 16 (Figura 20 abajo).

En cuanto al patrón de metilación de los sitios no-CpG, fue claro que las citosinas 1, 2, 3 y 38 no se encuentran metiladas *in vivo* en ambos individuos. En el ind 1 las citosinas 17 y 29 no se encuentran metiladas a las 0 h, no obstante que se detectaron metiladas en el 100% de las clonas en los demás tiempos de cultivo. El tratamiento produjo resultados similares entre ambos individuos (Figura 21).

Patrón CpG	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11	CpG12	CpG13	CpG14	CpG15	CpG16	CpG17	CpG18	CpG19	CpG20
0h	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	1	0	0
48h	0.4	0	0.4	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.2	0.2
72h	0.286	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	1	0	0.25
24hT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.222	0	0	0	0	0	0	0.222	1	0	0
48hT	0	0	0.2	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	1	0.2	0
72hT	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0.5	0.25	0	0	0.25	0.25	1	0.5	0

Patrón CpG	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11	CpG12	CpG13	CpG14	CpG15	CpG16	CpG17	CpG18	CpG19	CpG20
0h	0.222	0	0	0	0.111	0	0	0	0	0.111	0	0	0	0	0	0	0.111	1	0	0
24h	0	0	0	0	0.25	0.5	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
48h	0	0	0	0	0	0.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.667	1	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	1	0	0
24hT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.25	0	0	0	0.75	1	0	0
48hT	0	0.067	0.033	0.1	0.033	0	0.033	0.033	0	0	0	0.067	0	0	0	0.033	0.067	1	0.067	0
72hT	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0

Figura 20. Patrón de metilación y efecto del cultivo y del tratamiento con 5-azaC 10 μ M en los individuos 1 (matriz de arriba) y del individuo 2 (matriz de abajo) en sitios CpG.

individuo CpG	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38		
0h	1	1	1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	1		
24h	1	1	1	0.2	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.2	0.2	1	
48h	1	1	1	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	1	
72h	1	1	1	0.37	0.29	0	0.29	0.25	0	0.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	1	
24hT	1	1	1	0.63	0.25	0.13	0	0	0	0.29	0	0.5	0.25	0.35	0	0.22	0.44	0.36	0.22	0	0.22	0.22	0.35	0.79	0.22	0.25	0.67	0.67	0.78	0.78	0.78	0.56	0.78	0.44	0.56	0.44	0.56	1		
48hT	1	1	1	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	1	0	0	0	0	0	0.2	0	0.2	0.6	0.6	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	1
72hT	1	1	1	0.75	0.5	0.75	0.95	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1

patrón CpG	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38							
0h	1	1	1	0.12	0.22	0.13	0.13	0.39	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0.11	0.11	0.25	0	0.11	0	0.44	0.38	0.67	0.56	0.11	0.22	0.33	0.11	0.22	0.56	0.56	0.44	0.33	0.22	1								
24h	1	1	1	0	0	0	0	0.5	0.28	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0	0.28	0.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.47	0.47	1	0.33	1		
48h	1	1	1	0	0	0	0	0.88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67	0.67	1	0.67	1	
72h	1	1	1	0	0	0	0	0.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.67	0.67	1	1	1
24hT	1	1	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.67	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
48hT	1	0.91	0.91	0.88	0.77	0.77	0.78	0.33	0.45	0.47	0.4	0.37	0.37	0.3	0.3	0.3	0.38	0.37	0.37	0.38	0.4	0.15	0.17	0.17	0.3	0.3	0.28	0.3	0.75	0.46	0.46	0.49	0.48	0.46	0.51	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4				
72hT	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Figura 21. Patrón de metilación y efecto del cultivo y del tratamiento con 5-azaC 10 μ M en los individuos 1 (matriz de arriba) y del individuo 2 (matriz de abajo) en las citosinas no-CpG.

Las pocas diferencias estadísticamente significativas entre ambos individuos se encuentran en el control de 24 h ($p=0.02$) y en el tratamiento a las 24 h ($p=0.048$) en el caso de los sitios CpG, mientras en las citosinas no-CpG las diferencias se vieron a las 0 h ($p=0.008$) y en el control de 24 h (0.015) (Tabla 3).

Prueba Mann whitney en CpG	P con 95% de confianza	Prueba Mann whitney en no CpG	P con 95% de confianza
CpG 0h ind1 vs 0h ind 2	0.2039	no CpG 0h ind1 vs 0h ind 2	0.0079
CpG 24h ind1 vs 24h ind 2	0.0193	no CpG 24h ind1 vs 24h ind 2	0.015
CpG 48h ind1 vs 48h ind 2	0.7047	no CpG 48h ind1 vs 48h ind 2	1
CpG 72h ind1 vs 72h ind2	0.3397	no CpG 72h ind1 vs 72h ind2	1
CpG 24h T ind1 vs 24h T ind 2	0.0482	no CpG 24h T ind1 vs 24h T ind 2	0.075
CpG 48h T ind1 vs 48h T ind2	0.2072	no CpG 48h T ind1 vs 48h T ind2	0.0801
CpG 72h T ind1 vs 72h T ind2	0.4733	no CpG 72h T ind1 vs 72h T ind2	0.5369

Tabla 3. Comparación de los resultados del individuo 1 vs el individuo 2 en los sitios CpG (izquierda) y no-CpG (derecha), en amarillo se encuentran la comparación de medianas que resultó estadísticamente significativa con la prueba Mann-Whitney.

Discusión

La metilación del DNA es un evento epigenético clave para la regulación de la expresión génica, la compactación de heterocromatina, y la estabilidad de la misma [4, 18, 29, 51, 55]. Los satélites son unidades repetitivas que conforman una gran parte de la heterocromatina centromérica y pericentromérica. Los satélites clásicos 2 y 3 son dos de los componentes más abundantes de la heterocromatina pericentromérica, y se ha sugerido que participan de manera importante en la estabilidad de las regiones pericentroméricas, siendo importante su conservación para la estabilidad de la estructura del cinetocoro. Estos satélites están fuertemente metilados; se sabe que cuando ocurren errores en la metilación de éstos se presentan fenómenos de descondensación de cromosomas donde las secuencias repetidas del satélite 2 y 3 son abundantes, como los cromosomas 1, 9, 16, e incluso se ha relacionado con síndromes como el ICF [25, 27, 31, 38].

La secuencia en tándem del satélite 2 en linfocitos humanos fue descrita por Hollis y Hindley en 1988. Se sabe que en una unidad repetida típica del satélite 2, de 1.3 Kb, hay aproximadamente 69 sitios CpG, pero sólo hay uno o dos sitios para BstB1, enzima que se utiliza para revisar la metilación del satélite 2, por lo que el método de análisis de metilación mediante el uso de esta enzima de restricción representa menos del 3% de los sitios CpG que en realidad se encuentran en el satélite 2 [27]. Por lo que fue hasta el año 2001 que se realizó

por primera vez un estudio del patrón de metilación en el satélite 2 mediante una técnica más específica, la reacción de bisulfito de sodio [27] tomando un fragmento representativo del satélite 2 de 400 pb que contiene 20 sitios CpG, los cuales se encontraron metilados en un 85% en linfoblastos y fibroblastos.

En el presente estudio se emplearon linfocitos humanos cultivados, observándose metiladas entre 90 y 95% de las citosinas CpG, donde la citosina CpG 17 siempre estaba desmetilada o se había convertido en un sitio TpG por desaminación (Figuras 15, 16 y 20). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con 5-azaC no tiene un efecto significativo en los niveles de metilación de los sitios CpG, y los cambios en su mayoría parecen deberse al cultivo celular, ya que únicamente se encontró un cambio significativo después del tratamiento con 5-azaC después de 72 h. Es posible que el satélite 2 posea un mecanismo que le confiera resistencia al efecto desmetilante causado por la inhibición de las Dnmts y del intercalamiento de la 5-azaC en el DNA al momento de la división celular [12,42].

Por otro lado, los resultados demostraron que las citosinas no-CpG no eran modificadas por la reacción de bisulfito desde el inicio del tratamiento. Esto es muy interesante ya que se sabe que la reacción de bisulfito modifica a las citosinas no-CpG con una eficiencia mínima del 96% [19] (Frommer et al 1994), por lo que se asumía en varios estudios que la metilación no-CpG es más un artefacto de la reacción de bisulfito que el resultado de un proceso natural de metilación [74]. La metilación no-CpG ha sido un debate científico; por convención la metilación del DNA en mamíferos se asume que ocurre preferencialmente en sitios CpG [4, 18,29]. Sin embargo, la metilación no-CpG ha sido reportada en algunos estudios científicos, donde se ha visto que en células del bazo humano, puede representar hasta el 55% de la metilación [81]. Otros trabajos incluso sugieren que este tipo de metilación es un indicador temprano del desarrollo de la carcinogénesis [29, 48].

La mayoría de los estudios donde la metilación no-CpG ha sido reportada han utilizado células embrionarias [64] o bien la región promotora del elemento repetitivo humano LINE-1 de fibroblastos fetales [6]. Se ha reportado que del 15 al 20% de la metilación en células embrionarias humanas ocurre en dinucleótidos no-CpG [64].

La función de la metilación no-CpG es desconocida al igual que sus implicaciones evolutivas. La única propuesta hecha hasta el momento es que la metilación no-CpG surge después del

evento de desmetilación en la embriogénesis, donde actúan las enzimas metiladoras *de novo*, que son mucho menos específicas para sitios CpG, como la Dnmt3a la cual tiene preferencia por dinucleótidos CpA. La expresión de las enzimas de la familia Dnmt3 es mucho mayor en células embrionarias que en células adultas, y al llevar a cabo la metilación *de novo* son asistidas por la Dnmt1 que va a completar la metilación en los sitios hemimetilados CpG, por lo que quedan los sitios CpG metilados de manera simétrica y varios sitios no-CpG metilados asimétricamente. Dicha metilación no-CpG disminuye cuando la expresión de las Dnmt3 se reduce en las células diferenciadas, por lo que la detección de la metilación no-CpG es difícil de observar en células diferenciadas [64].

Los resultados de este trabajo mostraron una frecuencia de metilación en citosinas no-CpG en células no tratadas y no cultivadas (periodo 0 h), esta metilación mostró un patrón constante sin variaciones individuales y que se mantiene a lo largo del cultivo (Figuras 15 y 17). El tratamiento con 5-azaC indujo un efecto espectacular en la metilación de estos sitios no-CpG, a mayor tiempo de tratamiento, mayor fue el efecto de desmetilación. Se encontraron algunas diferencias individuales en el patrón de metilación después del tratamiento con 5-azaC, no obstante es importante recalcar que las secuencias repetitivas del DNA son difíciles de comparar debido a su enorme heterogeneidad y variabilidad entre individuos ya que son regiones sujetas a deleciones, duplicaciones y translocaciones robertsonianas [27, 38, 64, 71], lo cual en parte explica las diferencias que se encuentran entre los individuos de estudio. Curiosamente las únicas diferencias significativas entre los dos individuos se encontraron en el control de 24 h ($p=0.02$) y en el periodo de tratamiento de 24 h ($p=0.0482$) en el caso de los sitios CpG, y a su vez en los sitios no-CpG las diferencias entre individuos se encontraron en el periodo 0h ($p=0.0079$) y del control de 24h ($p=0.015$) (Tabla 3), lo cual implica que inicialmente ambos individuos eran similares pero no iguales, no obstante durante el cultivo celular y después del tratamiento se comportaron muy parecido. Unas diferencias interesantes aunque no fueron estadísticamente significativas se dieron a las 48 h de tratamiento en el individuo 2, donde se encontraron las únicas clonas con una desmetilación no-CpG del 92 al 100%, y a las 72 h de tratamiento la 5-azaC tuvo un fuerte efecto clastogénico en el fragmento del satélite 2 estudiado, ya que varias de las clonas habían perdido más de 50 pb. Este efecto clastogénico de la 5-azaC es conocido y se cree que puede desarrollarse al momento que la Dnmt se une covalentemente a la 5-azaC insertada en el DNA; dicha unión es irreversible, al no poderse remover el aducto 6-dihidropirimidina [42].

Con el fin de entender mejor el comportamiento de los niveles de metilación en el satélite 2 de linfocitos humanos así como el efecto del tratamiento de la 5-azaC, se agruparon los datos de ambos individuos. La 5-azaC desmetiló significativamente sitios CpG sólo después de 72 h de tratamiento ($p=0.0007$; Figuras 18,19 y Tabla 2). Por lo que concluimos que existe una resistencia en los sitios CpG al efecto desmetilante de la 5-azaC en el satélite 2 de la heterocromatina pericentromérica. En cuanto a los sitios no-CpG, la 5-azaC disminuyó significativamente su metilación en los tres periodos de tratamiento (Tabla 4). Se observó que el efecto máximo de desmetilación no-CpG se alcanzó después de las 48 h de tratamiento, descendiendo a las 72 h a un nivel similar al observado a las 24 h (Figuras 18,19).

Considerando la resistencia a la 5-azaC encontrada en los sitios CpG y el hallazgo de una metilación no-CpG que representa el 58.6% de la metilación del satélite 2 en linfocitos humanos, se buscó si existía un patrón de metilación no-CpG específico o si este era un evento aleatorio y asimétrico. El resultado encontrado mostró un patrón claro tanto en los sitios CpG como en los sitios no-CpG el cual fue muy similar en ambos individuos (Figuras 18 y 19). En este patrón se observó que de los sitios CpG, la citosina del dinucleótido CpG 17 no se encuentra metilada y que es posible que sea incluso ya un dinucleótido TpG. El efecto de la 5-azaC se observó principalmente en las citosinas CpG 1, 12 y 13 a las 72 h (Figura 19). En cuanto al patrón de metilación de los sitios no-CpG, las citosinas no-CpG 1, 2, 3 y 38 no se encontraron metiladas *in vivo* (periodo 0 h). En los periodos de cultivo de 24, 48 y 72 h, se pudo ver que el patrón se fue modificando en la región central del fragmento (Figura 20), esto podría ser causado por el envejecimiento *in vitro* de las células y por la pérdida de la estabilidad del satélite 2 en los diferentes pasajes de cultivo [38, 64, 71].

El tratamiento con 5-azaC resultó ser específico, en especial para las citosinas no-CpG 4, 5, 6, 7, 29 y 35, donde se afectó el patrón diferencialmente en cada periodo. En las citosinas no-CpG se encontraron cuatro grupos de citosinas que se modificaron diferencialmente con el tratamiento y el cultivo (Figura 19): 1) las citosinas no-CpG que se desmetilaron desde las 0 h hasta las 72 h en células tratadas y no tratadas, que son las citosinas 1, 2, 3 y 38; 2) las citosinas no-CpG que se desmetilaron únicamente con el tratamiento con 5-azaC, que son las citosinas 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, y 23 a 32; 3) las citosinas no-CpG que se desmetilaron como resultado del cultivo celular, que son las citosinas 33 a 37; y 4) las citosinas no-CpG que se desmetilan en sólo uno de los periodos de estudio. Esto nos indica que las citosinas no-CpG se desmetilan dependiendo de su posición, es decir se trata de una desmetilación específica.

Con el fin de entender esta especificidad, el tipo de dinucleótidos formados por las citosinas no-CpG. En el fragmento que se estudió del satélite 2 humano, el 65.8% de las citosinas (25 citosinas de 38) no-CpG correspondieron al dinucleótido CpA, 21 % (8 citosinas de 38) al dinucleótido CpT y el 13.2 % restante (5 citosinas de 38) al dinucleótido CpC (Tabla 5). Donde el 92% de los dinucleótidos CpA, y el 87.5% de los dinucleótidos CpT así como el 100% de los dinucleótidos CpC se encontraron metilados. Estos datos concuerdan con el porcentaje de metilación no-CpG observado en células embrionarias, donde el nivel de metilación es del 68 al 91% de los CpA y CpT; la presencia de un menor nivel de CpT y CpC metilados se debe a que la frecuencia de estos dinucleótidos es mucho menor que la de CpA [43, 64]. También se sabe que la metilación en CpA es causada por la Dnmt3a, ya que esta enzima tiene preferencia a estos sitios, pero también metila CpT y CpC aunque en menor grado [4, 18, 29]. En el mismo estudio se propuso que la metilación en CpA es posible que se deba a un error de detección de la enzima a dinucleótidos CpG, interesantemente la metilación no-CpG es específica en embriogénesis a ciertas secuencias y zonas del DNA [64].

Se ha sugerido que la metilación embrionaria no se pierde del todo en las regiones pericentroméricas [51] , por lo que nuestros resultados pueden reflejar una reminiscencia de la metilación embrionaria en el satélite 2. Otra posibilidad se explica con la co-localización de la Dnmt3a y 3b en la región de heterocromatina pericentromérica [1], de manera que aunque la expresión de estas enzimas en células somáticas adultas disminuya, se localizan preferencialmente en esta zona, siendo factible que la Dnmt3a al ser menos específica para CpG, propague una metilación no-CpG. No se sabe hasta el momento si la Dnmt3b está asociada a la metilación no-CpG, pero al ser muy específica para CpG puede que no sea responsable de la metilación no-CpG.

Hasta la fecha no existe ningún reporte de metilación no-CpG en la región de heterocromatina pericentromérica, por lo que su función y causa tendría que confirmarse en otros estudios. Un posible papel de este tipo de metilación es el mantenimiento del complejo de heterocromatina necesario para mantener la compactación y estabilidad de la heterocromatina pericentromérica estable.

Conclusión

En el presente trabajo se observó que el tratamiento de linfocitos humanos cultivados con 5-azaC no afecta significativamente a los sitios CpG metilados, indicando que existe una resistencia al tratamiento con este agente desmetilante en estas regiones. Este fue un resultado inesperado y sugiere que existe algún mecanismo de mantenimiento de la metilación en el satélite 2 el cual podría estar siendo realizado por las Dnmts *de novo*. Este hallazgo es importante debido a la posible participación de la estructura pericentromérica en la segregación cromosómica correcta a pesar de los cambios en los niveles de metilación.

Otro resultado interesante fue la presencia de metilación no-CpG, en especial en los dinucleótidos CpA, en los que el efecto del tratamiento con 5-azaC fue muy claro desde los 24 h. Además, se encontró un patrón específico de metilación no-CpG, el cual tuvo una respuesta clara en ciertas citosinas tanto al tratamiento como al cultivo celular, identificando así cuatro grupos en el patrón: aquellas citosinas que no están metiladas; las citosinas que se desmetilan únicamente con el tratamiento con 5-azaC, las cuales son en su mayoría CpA y CpT, tal como se ha visto en células embrionarias; las citosinas que se desmetilan durante el cultivo; y las citosinas que se desmetilan en sólo uno de los periodos de estudio. Este es el primer reporte en el que se observa la metilación no-CpG en células humanas somáticas adultas así como de la presencia de CpGs metiladas resistentes a 5azaC y que pone de manifiesto la presencia de patrones de desmetilación en estas citosinas.

Hasta el momento no se sabe la función de la metilación no-CpG, ni cómo la célula puede heredar este tipo de patrón de metilación, ni cómo es que se mantiene en el satélite 2 de linfocitos, pero es muy importante determinar si este tipo de metilación tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma y la estabilidad de las regiones pericentroméricas. La presencia de la metilación no-CpG es generalmente ignorada e incluso se llega a considerar inexistente, sin embargo, es bien sabido que las enzimas metiladoras *de novo*, en especial la Dnmt 3a, es capaz de metilar citosinas adyacentes a purinas o pirimidinas, por lo que sería importante estudiar en un futuro la expresión de estas Dnmts al darse el tratamiento con 5-azaC, así como investigar si las proteínas MBDs son capaces de interactuar con los sitios no-CpG, confiriendo así un mantenimiento de la estructura de la heterocromatina pericentromérica.

Referencias

1. Bachman Kurtis E., Rountree Michael R., y Baylin Stephen B. (2001) Dnmt3a and Dnmt3b Are Transcriptional Repressors That Exhibit Unique Localization Properties to Heterochromatin. *J. Biol. Chem*, 276, (34); 32282–32287.
2. Bernardino J, Roux C, Almeida A, Vogt N, Gibaud A, Gerbault Seureau M, Magdelenat H, Bourgeois CA, Malfoy B, Dutrillaux B; DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet* 1997, 97: 83-89.
3. Bestor TH. And Coxon A. (1993) Cytosine methylation; the pros and cons of DNA methylation. *CurrBiol*. Jun 1: 3 (6) 384-6.
4. Bird Adrian. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*. 16; 6-21.
5. Brito-Babapulle, V., y Atkin, N.B. (1981). Break points in chromosome 1: abnormalities of 218 human neoplasm. *Cancer Genet. Cytogenet*. 4; 215-225.
6. Burden Alice F., Manley Nathan C., Gartler Stanley M., Laird Charles D., Hansen Scott R. (2005). Hemimethylation and Non-CpG Methylation Levels in a promoter region of human LINE-1 (L1) repeated elements. *J. Biol. Biochem*. 280 (15); 14413-14419.
7. Chih-Lin Hsieh. (1994) Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Molecular and Cellular Biology*, Aug. 14(8); 5487-5494.
8. Clark Susan J., Harrison Janet, Cerril L. Paul y Frommer Marianne (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines: *Nucleic acids Research*. 22 (15):2990-2997.
9. Colot V., Rossignol JL. (1999) Eukariotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays*, May; 21 (5); 402-11.
10. Cooper D.N and Youssoufian H.(1988) the CpG dinucleotide and human genetic diseases. *Hum. Genet*. 78:151-155
11. Cowell Ian G. ,Rebecca Aucott, Shantha K. Mahadevaiah, Paul S. Burgoyne, Neville Huskisson, Silvia Bongiorno, Giorgio Prantera, Laura Fanti., Sergio Pimpinelli, Rong Wu · David M. Gilbert, Wei Shi, Reinald Fundele, Harris Morrison, Peter Jeppesen, Prim B. Singh. (2002). Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma*, 111; 22–36.
12. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429; 457-463.
13. Fairweather, D.S., Fox, M., Margison, G.P., (1987). The in vitro lifespan of MRC-5 cells is shortened by 5-azacytidine induced demethylation, *Exp. Cell Res*. 473; 153-159.
14. Fatemi M., Hermann A., Pradhan S. and Jeltsch A. (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol*. 309: 1189–1199.

15. Fernandez, J.L., Vazquez Gundin, F., Rivero, M.T., Goyanes, V., Gonsalvez, J. (2001). Evidence of abundant constitutive alkali labile sites in human 5bp classical satellites DNA loci by DBD-FISH. *Mutat. Res.* 473; 163-168
16. Fischle, W. *et al.* (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
17. Frommer Marianne, Louise E. McDonald, et al (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Genetics.* 89:1827-1931.
18. Goll May Grace and Bestor Timothy. (2005) Eukariotic Cytosine Methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74;481-514.
19. Gollin Sussanne M. (2005), Mechanism leading to chromosomal instability. *Seminars in Cancer Biology*, 15: 33-42.
20. Gravholt CH, Friedrich U, Caprani M, Jørgensen AL. (1992) Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* ;14(4):924-30
21. Guang-zhi Qu, Louis Dubeau, Ajita Nayaran, Mimi C. Yu, Melanie Ehrlich (1999) Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumours of different malignant potential, *Mutation Research.* 423:91-101.
22. Guan-zhi Qu and Melanie Ehrlich, (1999), Demethylation and expression of methylated plasmid DNA stably transfected into HeLa cells. *Nucleic Acids Research*, 27(11): 2332-2338.
23. Guttenbach M., y Schmid, M. (1994). Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 211; 127-132.
24. Haaf, T., Schmid, M., (2000). Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenet. Cell Res.* 211; 127-132.
25. Hansen RS, Wijmenga C, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CMR, Gartler SM. (1999). The Dnmt 3b DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96; 14412-14417.
26. Hariharan P. Easwaran, Lothar Schermelleh, Heinrich Leonhardt, M. Cristina Cardoso. (2004) Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO.* 5 (12); 1181-1186.
27. Hassan K.M. Anwarul, Norwood Thomas, et al. (2001) Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF Syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication. *Human Genetics.* 109:452-462.
28. Hendrich B. Bird A. (1998) Identification and characterisation of a family of mammalian methyl-CpG Binding Proteins. *Mol. Cell. Biol.* Nov: 18(11) 6538-6547.
29. Hermann A., Growher H. and Jelsch. (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *CMLS.* 61; 2571-2587.
30. Hernandez, R. Frady, A., Zhang, X.Y., Varela, M., Ehrlich, M. (1997). Preferential induction of chromosome 1 multibranched figures and whole arm deletion in human

- pro B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet. Cell Genet.* 76; 196-201.
31. Hitoshgi Tsuda, Teruko Takanabe, Yae Kanai, Takashi Fukotomi, y Setsuo Hirohashi (2002) Correlation of DNA Hypomethylation at Pericentromeric Heterochromatin Regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *American Journal of Pathology*; 161:859-866.
 32. Holliday R. and Pugh JE. (1975) DNA modification mechanism and gene activity during development. *Science*, Jan 24; 187(4173); 226-32.
 33. Holliday, R. (1986). Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro lifespan of human diploid fibroblast. *Exp. Cell Res.* 166; 543-552.
 34. Hornsby, P.j., Yang, L., Gunter, L.E., (1992). Demethylation of satellite I DNA during senescence of bovine adrenocortical cells in culture. *Mutat. Res.* 275; 13-19
 35. Hotchkiss R.D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 175; 315-332.
 36. Howlet, D., Dalrymple, S. Mays-Hoopers, L.L. (1989). Age related demethylation of mouse satellite DNA is easily detectable by HPLC but not by restriction endonucleases. *Mutat. Res.* 219;101-106.
 37. Hsieh C. L. (1999) In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 8211–8218
 38. Jeanpierre M (1994) Human Satellites 2 and 3. *Revue Generale Reviews.* 39:163-171.
 39. Jeltsch A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem.* 3; 274-293.
 40. Jody C. Chuang, et-al, (2005), Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Molecular Cancer Therapy*4 (10): 15515-1520.
 41. Jones PA, Takai D. (2001)The role of DNA methylations in mammalian epigenetics. *Hum. Mol. Genet.* Nov 1; 10(23): 2619-26.
 42. Juttermann, R., y Jaenisch, R. (1994). Toxicity of 5-aza-2-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 91; 11797-11801.
 43. Kamel Jabbari, Giorgio Bernardi. (2004), Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene*, 333: 143-149.
 44. Kokalj-Vokac, N., Almeida A., Viegas-Pequignot, E., Jeanpierre, M., Malfoy, B., Dutrillaux, B., (1993). Specific induction of uncoiling and recombination by azacytidine in classical satellite containing constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 63; 11-15.
 45. Li, L. H., Olin, E. J., Fraser T. J., Bhuyan B. K. (1970) Phase Specificity of 5-Azacytidine against Mammalian Cells in Tissue Culture. *CANCER RESEARCH* 30; 2770-2775.
 46. Liang Liu, Rebecca C. Wylie, Nathaniel J. Hansen, Lucy G. Andrews y Trygve O. Tollefsbol. *Methods in Molecular Biology.* 287: 169-179.

47. Lin Kun Tsan, Momparler, Richard L., Rivard, Georges E. (1981) High performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2-deoxycytidine. *70* (11); 1228-1232.
48. Lionel A. Poirier. (2002) The effects of Diet, Genetics and Chemicals on Toxicity and Aberrant DNA Methylation: an Introduction. *Journal of Nutrition*, 132: 2336S-2339S.
49. Lubit, B.W., Pham, T.D., Miller, O.J., Erlanger, B.F. (1976). Localization of 5-methylcytosine in human metaphase chromosomes by immunoelectron microscopy. *Cell* 9, 503-509.
50. Lyko Frank, Brown Robert. (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *Journal of the National Cancer Institute*. 97 (20); 1498-1506.
51. Maison Christèle y Almouzni Geneviève. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature reviews*. 5; 296-304.
52. Masahiro Sasaki, Jason Anast, et al. (2003) Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309: 305-309.
53. Meissner Alexander, et-al. (2005). Reduced representation bisulfate sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33 No. 18: 5868-5877.
54. Mewborn SK., Lese Martin C., Ledbetter DH. (2005), The dynamic nature and evolutionary history of subtelomeric and pericentromeric regions. *Cytogenetics Genome Research*. 108 (1-3):22-5.
55. Muchardt Christian, Guillemé Marie, Jacob-S. Seeler, Didier Trouche, Anne Dejean & Moshe Yaniv (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1. *EMBO reports*. 3(10); 975-981.
56. Murzina, N., Verreault, A., Laue, E. & Stillman, B. (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* 4, 529-540.
57. Nakahori Y., Mitani N., Yamada M., Nakagome Y. (1986). A human Y specific repeat DNA family (DYZ1) consist of a tandemly array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res*. 14; 7569-7580.
58. Notari Robert E. y DeYoung Joyce L. (1975) Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7; 1148-1157.
59. Okano M., Xie S. and Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet*. **19**: 219-220.
60. Okano Masaki Okano, Daphne W. Bell, Daniel A. Haber, and En Li, (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3 Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development, *Cell* 99; 247-257.
61. Peters A. y Schubeler D. (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Current opinion in cell biology*, 17; 230-238.
62. Prosser J, Frommer M, Paul C, Vincent PC. (1986). Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol*. 20;187(2):145-55.

63. Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M.C., Erhlich, M., (1999). Satellite DNA hypomethylation vs overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat. Res.* 423; 91-101
64. Ramsahoye Bernard H., Biniszkiwicz Detlev, Lyko Frank, Clark Victoria, Bird Adrian P., and Jaenisch Rudolf (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *97 (10); 5237–5242.*
65. Reinhard Stoger, Tina M. Kajimura, W. Ted Brown y Charles D. Laird (1997) Epigenetic variation Illustrated by DNA methylation patterns of the fragile X-gene FMR1. *Human Molecular Genetics.* 6:1791-1801.
66. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T. Bhagwat AS, Bickel T, A Bitinaite J. et al. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31; 1805-1812.
67. Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996). Mechanisms of gene regulation. Epigenetic, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
68. Schubeler D, Lorincz MC, Cimbora DM, Telling A., Feng QY., Bouhassira EE, Groudine M. (2000) Genomic targeting of methylates DNA; Influence of methylation on transcription, replication, chromatine structure, and histone acetilation. *Mol Cell Biol.* Dec; 20 (24); 9103-12.
69. Shabazian M. y Zoghbi H. (2002) Rett syndrome and MeCP2: linking Epigenetics and neuronal fuction. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1259-1272
70. Sharon A. Ross and Lionel Poirior. (2002) Proceedings of the Trans HHS workshop: Diet, DNA, Methylation processes and health. *J. Nutr.* 132: 2329S-2332S.
71. Susuki, T., Fujii, M., Ayasawa, D. (2002). Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblast. *Exp. Gerontology.* 37; 1005-1014.
72. Tagarro I, Wiengant J., Raap A.K., González Aguilera J.J., Fernandez Peralta A.M.,(1994). Assignment of human satellite 1 DNA as revealed by flourecent in Situ Hybridization with Oligonucleotides. *Hum. Genet.* 93; 125-128.
73. Van den Wyngaert I., Sprengel J., Kass SU, Luyten WH. (1998) Cloning and analysis of a novel human putative DNA methyltransferase. *FEBS let.* Apr. 17; 426(2); 283-9.
74. Warnecke Peter M., Stirzaker Clare, Song Jenny, Grunau Christoph, Melki John R., y Clark Susan J. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods (27); 101–107.*
75. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WLy Schübeler D. (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics,* 37(8):853-62.
76. Weiss Alona, Kashet Ilana, Razin Aharon, y Cedar Howard (1996) DNA demethylation in vitro: Involvement of RNA. *Cell.* 86:709-718.
77. Weizhen Ji, Raymundo Hernandez, et. al, (1997) DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutation Research.* 379: 33-41.
78. Weizhen Ji, Raymundo Hernandez, Xian-Yang Zhang, Guang-zhi Qu, Allison Frady, Maria Varela, Melanie Ehrlich. (1997). DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome. *Mutation Research,* 379; 33–41.

79. Wigler M, Levy D., Perucho M. (1981) The somatic replication of DNA methyltransferases. *Cell*, Apr: 24(1); 33-40.
80. Wong, N., Lam, W.C., Lai, P.B., Pang, E., Lau, W.Y., Johnson, P.J., (2001). Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with 1 arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 159, 465-471.
81. Woodcock, D. M., Crowther, P. J. & Diver, W. P. (1987). The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145; 888-894.
82. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsie CL, Tommerup N Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 402; 187-191.
83. Young, J.L., Smith, J.R. (2001). DNA methyltransferase inhibition in normal human fibroblast induces a p21 dependent cell cycle withdrawal. *J. Biol. Chem.* 276; 19610-19616.
84. Frommer M, Prosser J y Vincent PC. (1984) Human satellite I sequence include a male specific 2.47 kb tandemly repeated unit containing one Alu family member per repeat. *Nucleic Acids Research.* 12 (6): 2887-2900.

Libros citados:

1. Sambrook y Russell. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3a edición, CSHL PRESS;, New York. 2001. Vol 3; pp. A2.2-A2.3.

Anexo 1-

Abreviaturas

m5C	5 metil citosina
MeCP2	proteína de unión a metil citosina 2
5 ^m CpG	citocina metilada en sitios CpG
MBD2	proteínas de unión a CpG metilados 2
HDAC1	Histona desacetilasa 1
H3	Histona 3
H4	Histona 4
BDNF	factor neurotrófico
MBD1	proteínas de unión a CpG metilados 1
Dnmts	DNA metiltransferasas
NLS	señal de localización nuclear
PCNA	antígeno de proliferación celular nuclear
BAH	Bromo adjacent homology
N-terminal	amino terminal
C-terminal	carboxilo terminal
SUV39H1	Histona metilasa 1
PWWP	prolina-triptofano-triptofano-prolina
PHD	<i>Plant homeodomain</i>
Xi	inactivación del cromosoma X
HP1	proteína asociada a heterocromatina 1
meH3K9	metilación de la H3 en la lisina 9
CAF1	factor de ensamblaje de cromatina 1
5-azaC	5-azacitidina
5-azadC	5-azadeoxycitidina
5-azau	5-azauridina
5-azamp	5-azaC monofosfato
rfc	Fuerza centrifuga relativa
rpm	revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ind	individuo

T tratamiento

Abreviaturas de medidas:

g	gramos
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
M	Moles
mM	Milimoles
μ M	Micromoles
nM	Nanomoles
pmoles	Picomoles
pb	Pares de bases
kb	kilobases
H	Horas
Min	Minutos
seg	segundos

Anexo 2- Metodología desarrollada

I.- Cultivo de linfocitos humanos

1) Se realizó un cultivo de linfocitos de sangre humana de los dos individuos seleccionados, con las siguientes condiciones:

Se utilizó el medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% de L-Glutamina (Sigma)

1. Se colocaron cultivos para evaluar tres periodos de estudio (24, 48 y 72 h de exposición) con sus respectivos controles, donde, en cajas de cultivo de 25 cm² se adicionaron 9 ml de medio de cultivo, previamente suplementado, 0.2 ml de fitohemaglutina (Gibco) y 1 ml de sangre periférica..
2. Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% de CO₂ durante 48 h.
3. A las 48 h se realizó un cambio de medio, para lo cual, los cultivos de sangre fueron resuspendidos con pipetas y transferidos a tubos falcón de 15 ml. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. Posteriormente con ayuda de una pipeta pasteur y una bomba de vacío, se retiró el medio de cultivo con cuidado de no tomar el botón celular. El botón fue resuspendido nuevamente en 9 ml de medio de cultivo suplementado. Con una pipeta pasteur se transfirió a una caja de cultivo de 25 cm². Se adicionó 0.2 ml de fitohemaglutina y se agregó 5-azacitidina a una concentración de 10mM. En caso de ser el control solo se adicionó la fitohemaglutina.
4. Los cultivos de incubaron a 37°C con un 5% de CO₂.

2) Una vez transcurría el tiempo del periodo de estudio se sacaba de la incubadora, el contenido del frasco de cultivo era pasado a un tubo falcon de 15ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. Una vez centrifugado se le removía con una bomba de vacío el sobrenadante y se congelaban por 8h en el refco a -80°C. Una vez congelada se realizó la extracción de DNA y todos los pasos hasta la secuenciación como describiré adelante.

Por cada periodo de tiempo se cultivaron y extrajeron 30 clonas de bacterias transformadas, con el fin de obtener al menos 6 clonas con el fragmento de 400pb.

3) Se llevó a cabo una extracción del DNA a partir de 5ml de sangre humana de los dos individuos, mediante la utilización de proteinasa k y una extracción con Fenol cloroformo y alcohol isoamílico (método usado por el FBI). De la siguiente manera:

II.-Extracción de DNA de linfocitos humanos de sangre periférica.

1. Se tomó una muestra de sangre periférica vía venosa y se congeló a -80°C por una noche.
2. Se Adicionó 4ml de Buffer 1X SSC y mezcló por inversión.
3. Centrifugó a 3500rfc por 5 minutos.
4. Retiró 5 ml del sobrenadante. *Eliminándolo en una vaso con hipoclorito al 33%.*

5. SE adicionó 5ml de Buffer 1X SSC y mezclar.
6. Centrifugó a 3500rfc por 5 minutos.
7. Eliminó todo el sobrenadante.
8. Se adicionó 1ml de Buffer 1X SSC y mezclar.
9. Centrifugar a 3500rfc por 5 minutos.
10. Se removió todo el sobrenadante
11. Se adicionó 500µl de NaOAc 0.2M y mezclar por inversión.
12. Se adicionó 1.2ml de NaOAc 0.2M y mezclar por inversión.
13. Se adicionó 125µl de SDS al 10% y 30µl de proteinasa K (20mg/ml agua).
14. Vortexear.
15. Se Incubó durante 1 h a 55°C.
16. Se Agregó 600µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y vortexeó durante 30 segundos.
17. Centrifugar a 3500 rfc por 5 minutos.
18. Se removió la capa acuosa del tubo lentamente y se pasó a otro tubo falcon 15ml.
Desechando en hipoclorito la fase restante.
19. Se Agregó 600µl de cloroformo.
20. Centrifugó a 3500 rfc por 5 minutos.
21. Se adicionó 2 ½ volúmenes de etanol al 100% frio y mezclar por inversión hasta que el DNA sea visible (color blanco) y se vea compacto.
22. Se Tomó con una micropipeta el DNA y se pasó a un tubo eppendorf 1.5ml.
23. Se adicionó etanol al 70% hasta llenar el tubo y se mezcló bien.
24. Se Centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos.
25. Se removió el etanol completamente.
26. Se resuspendió en 1000µl de Tris 10/0.1.

Una vez extraído el DNA, se realizó la reacción de bisulfito con el fin de obtener el patrón normal de metilación in vivo, a este le llamamos tiempo 0h. La reacción con bisulfito comienza con una digestión del DNA genómico total con la enzima BamH1, se digirieron de 2 a 4µg de DNA con una U de la enzima. Una vez digerido se precipitó el DNA con NaOAc 2M y etanol al 100% y70%; Ya teniendo esto se realizó la reacción de bisulfito de sodio, de la siguiente manera:

III.- Reacción de bisulfito.

Con el fin de poder medir los efectos del tratamiento con respecto a la metilación, la reacción de bisulfito de Sodio (Frommer, 1992), convierte las citosinas no metiladas en uracilos, mientras las 5-metilcitosinas quedan intactas. El resultado será amplificado mediante PCR usando dehidroxinucleotidos, donde los uracilos resultantes de la modificación serán traducidos en Timinas con el fin de que cuando secuenciamos usando el método de Sanger, pudimos observar directamente un mapa de metilación donde veremos el efecto del tratamiento en la metilación. La reacción se hizo con la modificaciones propuestas por el grupo de Marianne Frommer para las regiones repetitivas y con un alto contenido de CpG (Warneke, P, et al. 2004).

La reacción de bisulfito preferentemente se realizó con un tubo eppendorf oscuro.

1. Se prepararon los reactivos el mismo día de la reacción:
 - a. Bisulfito de sodio 2.8M (NaHSO₃).
 - b. Hidroquinona 10mM
 - c. NaOH 3M
2. Se Usaron de 500ng a 1µg de DNA en un volumen máximo de 18µl
3. Se agregar 2µl de NaOH 3M + los 18µl del DNA y se incubó a 42°C por 20 minutos.
4. Después de la incubación se agregó 208µl de bisulfito de sodio 2.8M, 12µl de hidroquinona 10mM; generando una mezcla con un volumen total de 240µl, la cual se Incubó por 16h a 55°C. (Frommer, et al 1992, Warneke, P, et a. 2004).

Una vez termina la reacción de bisulfito se realizó la depleción de sales usando el Kit Micro-con de Millipore (# cat 42410), según las instrucciones de la empresa fabricante. Seguido de esto se realizó la desulfonación de las muestras por medio de NaOH 3M, NH₃OAc 5M, etanol a -20°C al 100% y etanol a -20°C al 70%. Resuspendiendo al final el material en 15µl de Tris 10/0.1. De la siguiente manera:

Desulfonación.

1. Se usaban solo 40µl del producto de la depleción de sales.
2. Se agregó 4.5µl de NaOH 3M.
3. Se Incubó a 37°C por 15 minutos.
4. Se agregó 28µl de acetato de amonio 5M a pH 7.
5. Se agregó 200µl de etanol al 100% frio.
6. Se incubó a -20°C por 2 h.

7. Se Centrifugó a 14 000rpm por 20 minutos.
8. Se eliminó el etanol por Decantación.
9. Realizamos otros tres lavados con etanol al 70% frio.
10. Se precipitó en "speed vac" (a temperatura ambiente) aproximadamente 20 minutos.
11. Se resuspendió en 15µl de tris 10/0.1.
12. Finalmente se cuantificó la muestra

IV.- Amplificación de la muestras

Una vez realizada la reacción de bisulfito, se corrió la primera ronda de primers modificados, llamados biup1f y biup2r, publicados en el trabajo de Hassan A., et al. (2001).

En total son 3 juegos de primers los que se usaron todos propuestos por Hassan et al. (2001), que son los siguientes:

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACION DEL DNA SATELITE 2

Primer juego

Sat2-384U 5'- ATGGAAATGAAAGGGGTCATCATCT-3'

Sat2-781L 5'- ATTCGAGTCCATTCGATGATTCCAT-3' ,

Los cuales amplifican el DNA satélite 2 no modificado.

Segundo juego

Sat2-biup-1f, 5'- TTGAATGGAAATGAAAGGGGTTATTA-3' (NT 380-405, GIL 220362)

Sat2biup-2r, 5'- C[R]AATCCATTC[R]ATAATCCATTCC-3' (nt754-778, gi1220362),

Los cuales amplifican DNA satélite modificado con bisulfito en una región muy similar de 400 pb y que confirma una conversión exitosa.

Tercer juego

sat2biup-3f, 5' TGGAAATGAAAGGGGTTATTATTA- 3' (nt 385-409, gi1220362), **sat2biup-4r**, 5'- AATCCATTCATTCATTC[R]ATA-3' (nt 741-764, gi1220362) los cuales amplifican el producto de la amplificación previa de una manera más específica 382pb.

Los primers modificados para bisulfito son degenerados, lo cual implica que poseen variaciones en la secuencias representadas por la letra R, que implica que en es posición puede haber G o A. En el caso de primer sat2biup 2r hay dos "Rs" lo caul implica que existen 4 diferentes primers en esos oligos correspondiendo a las permutaciones posibles que existen en si en la secuencia se encuentra una G o una A.

El ciclaje de los primers fue el siguiente:

Primer 386u-781L	Primer 1f- 2r	Primer 3f-4r
95°C— 5'	95°C— 2'	95°C— 5'
95°C— 1'	95°C— 1'	95°C— 1'
60°C— 1'	63°C— 1'	65°C— 1'
71°C— 2'	71°C— 2'	71°C— 2'
72°C— 7'	72°C— 7'	72°C— 30'
4°C	4°C	4°C
1 ciclo	1 ciclo	1 ciclo
35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
1 ciclo	1 ciclo	1 ciclo
∞	∞	∞

Las muestras amplificadas eran corridas en geles de agarosa al 2.5%, junto con un marcador de 100pb, como control negativo se usaban PCR sin DNA. Los geles se teñían con bromuro de etidio $\mu\text{g/ml}$, y eran fotografiados con luz UV en el *fotoluminador UVP-Biolmaging controller, Hammamatsu camera*, y visualizados con el programa *Labworks 4.5*.

Después de la amplificación con la primera ronda de primers degenerad biup 1f y 2r, era necesario purificar el producto de la reacción para eliminar la presencia de de estos oligos en la amplificación con los primer anidados biup 3f y 4r. La purificación fue realizada con el kit de purificación de PCR QIAquick de QIAGEN (# cat. 28706), siguiendo las instrucciones de la compañía fabricante.

V.- Ligación y transformación

La ligación se realizó tomando el resultado de la amplificación con lo primers anidados biup3f y 3r. Usamos el *kit InsTAclone PCR Cloning* de la compañía Fermentas (#K1214), según las especificaciones de la compañía fabricante. La transformación se realizó en las bacterias DH5 α tomando una cepa congelada que se tenía en el laboratorio. Estas se hicieron químicamente competentes con el método de CaCl₂. El cual se realizó de la siguiente manera:

1. De la cepa congelada de DH5 α se tomo una pequeña muestra con una asa bacteriológica y se incubó en 5ml de medio LB a 37°C, 200rpm por una noche.
2. Se tomaron 500 μl del pre-inoculo del paso 1 y se diluyó 1:10, incubándolos a 37°C hasta que las bacterias alcanzaran una absorbancia de OD600 de 0.4 (aproximadamente entre 3 a 4h).
3. Ya en 0.4 OD600 se incubaron en hielo por 15 minutos.
4. Se transfiere el cultivo frio a un tuvo cónico estéril de 50ml y se centrifugó a 4000rpm (2700 rfc) por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, dejando el tuvo cónico boca abajo sobre una hoja de papel por 1 min. La pastilla de bacterias se resuspendió suavemente en 25ml de una solución a -4°C de CaCl₂ 100mM/Tris 10mM, a pH 7.5.

5. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante como en el paso anterior y nuevamente se resuspendió la pastilla en 3.3ml de una solución a -4°C de CaCl₂ 100mM/Tris 10mM, a pH 7.5.
6. Se incubó 30 minutos en hielo antes de transformar, o bien se guardaban a -4°C (según Darget y Erhlich, 1979, la eficiencia de transformación aumenta de 4 a 6 veces durante las primeras 12 a 24 h de almacenamiento a 4°C y después decrece luego al nivel original, Maniatis, pg. 1.83). Nosotros vimos que permanecían competentes más de 16 días.

La transformación se realizó siguiendo las instrucciones del *kit InsTAclone PCR Cloning* de la compañía Fermentas (#K1214), según las especificaciones de la compañía, con la única modificación del uso de 2ml de medio SOC en vez de 1ml como plantea el fabricante. Una vez transformadas se cultivaban en cajas de petri con 20ml de medio LB solido que contenían 50µg/ml de ampicilina, por una noche (12 a 14h) a 37°C. Solo aquellas bacterias que habían sido eficientemente transformadas sobrevivían en el cultivo y desarrollaban colonias. Una vez crecidas las colonias se seleccionaban con una asa bacteriológica 36 colonias y eran re plaqueadas en placas con 20ml de medio LB solido que contenían 50µg/ml de ampicilina (se sembraban 12 colonias por placa), 12 a 14h a 37°C. Después se tomaban las colonias seleccionadas y se cultivaban en tubos de ensayo de 15 ml que contenían 4ml de medio LB con 50µg/ml de ampicilina y se incubaron en un shaker líquido a 37°C (Shaker Bath de Orbit) 12 a 14h.

Una vez obtenidas las bacterias transformadas en medio líquido, se realizó la extracción de plásmidos usando el kit QIAprep spin miniprep de QIAGEN (#cat. 27106) para extracción de plásmidos, según las instrucciones de la compañía.

De los plásmidos extraídos se tomaron 300ng de DNA y se digirieron con las enzimas HIndIII y EcoR1 en el buffer React 2 por mas de 4h con el fin de buscar las clonas que poseían los fragmentos de 400pb de satélite 2 que necesitábamos.

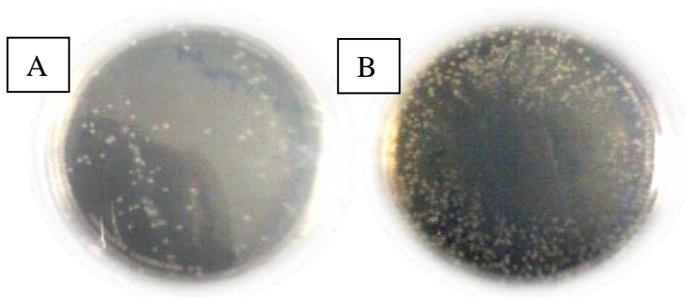




Figura 6. Bacterias DH5 α cultivadas después de transformarlas, están cultivadas en medio LB con 50 μ g/ml de ampicilina. A) Cultivo de DH5 α diluidas 10⁻³. B) Cultivo de DH5 α diluidas 1:1 con medio SOC. C) cultivos con colonias seleccionadas, donde hay 11 clonas por placa de cultivo.

Medios de cultivo:

Medio Luria-Bertani Medium (LB)

A 950ml de agua bidestilada se agrega:

- 10 g de Triptona
- 5g de Extracto de temperatura
- 10g NaCl

Se agita hasta disolver, y se ajusta a pH=7.0 con NaOH 5N (~0.2ml). Después se ajusta a 1 litro y se autoclavea por 20 minutos a 15psi (1.05kg/cm²) en ciclo líquido.

Medio SOB

A 950ml de agua bidestilada se agrega:

- 20g de triptona
- 5g de extracto levadura
- 0.5g NaCl

Se agita hasta disolver, se le agrega 10ml de una solución 250mM de KCL (esta solución se hace disolviendo 1.86g de KCL en 100ml de agua bidestilada). Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5N. Se ajusta el volumen de la solución a un litro y se autoclavea por 20 minutos a 15psi (1.05kg/cm²) en ciclaje líquido. Antes de usarse se agregó 5ml de una solución 2M de MgCl₂ estéril.

Medio SOC

Es idéntico al medio SOB excepto que contiene 20mM glucosa estéril. La glucosa se agrega en el medio cuando este se encontraba a 60°C o menos.

Las recetas de elaboración de los medios fueron tomadas del libro Molecular Cloning (a laboratory manual) de Sanbrook y Russell, pp A2.2 y A2.3

VI. Secuenciación

Una vez seleccionadas las clonas con el fragmento de 400pb se realizó la secuenciación de las muestras. Esta fue realizada utilizando el secuenciador ABI PRISM 3100 (PE BIOSYSTEMS) y se usó Big Dye™ TERMINATOR V3.1 CYCLE SEQUENCING KIT". La secuenciación se realizaba usando el primer -20 M13, usando 5.1 pmoles por reacción. SE utilizaron de 250 a 350 ng de DNA y 4µl de Big Dye por muestra. El PCR se calculaba para un volumen de 10 a 20µl. El PCR de secuenciación se realizo con el siguiente ciclaje el cual esta diseñado para secuenciar secuencias con alto índice de CG's:

Ciclaje de PCR secuenciación:

97°C---7min } 1 ciclo
97°C---30 segundos }
50°C---15 segundos } 50 ciclos
60°C---4 minutos
4°C

Utilizamos dos métodos para purificar las muestras de los plásmidos para secuenciar. Esto por razones del límite de columnas con las que se contaba.

VI.1- *Precipitación con columnas de sephadex G-50 fine.*

1. Se preparaba la sefarosa el mismo día de la purificación, agregando la relación, 4g de sephadex por cada 50ml de agua bidestilada estéril. Esta tenia que hidratarse por 2 h mínimo antes de la purificación.

2. Se preparo las columnas agregando 625µl del sephadex hidratado, con lo que por tubo se obtenía la concentración de 50mg de sephadex. Las columnas eran colocadas en unos tubos eppendorf de 1.5ml.
3. Se centrifugaban a 750 rfc por 1 minuto y se eliminaba el tubo eppendorf de 1.5ml y se colocaba la columna en un tubo estéril de 1.5ml nuevo.
4. Se aplicó justo en el centro de la sefarosa los 10 a 25µl del PCR de secuenciación. Y se centrifugó a 2000 rfc por 3 minutos.
5. La muestra se precipitó con el speed vac a temperatura ambiente por 20 minutos. Resuspendiendo la muestra en 25µl de formamida (*HiDi formamide*).
6. Antes de la secuenciación se desnaturalizó las muestras a 96°C por 5 minutos y se incubaron por 5 minutos en hielo.
7. Se colocaron las muestras en la placa de secuenciación (MicroAmp de Applied Biosystems).

VI.2- Precipitación por acetato de sodio y etanol.

1. El volumen del PCR se llevó a 100µl con agua bisdestilada estéril.
2. Se adicionó 10µl de Na-Act 3M y 300µl de etanol al 100% frio y se mezcló por inversión.
3. Centrifugamos por 20 minutos a 13 000rpm a 4°C
4. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante.
5. Se lavó el pellet con etanol al 70% frio y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos a 4°C.
6. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió en 25µl de HiDi formamide, se incubó a -4°C por 1 hora mínimo antes de secuenciar.
7. Antes de la secuenciación se desnaturalizaron las muestras a 96°C por 5 minutos y se incubaron por 5 minutos en hielo.

VII. análisis de secuencias.

El análisis de los cromatogramas obtenidos por la secuenciación se realizó utilizando los programas Chromas pro 2.0 y el programa Bioedit. Las secuencias fueron alienadas comparadas con la secuencia del satélite 2 publicada en el proyecto genoma humano (obteniéndola por medio del *genome browser*) y analizadas utilizando Office Word 2007, donde aquellas secuencias que no poseyeran las características distintivas del fragmento de interés que eran en el inicio de la secuencia una repetición de GGGG, seguida por repeticiones de los pentámeros del satélite 2 y en la base 203 se encuentra una secuencia muy particular de 7 adeninas seguidas rodeada por sitios CpG,

así como la presencia de 20 sitios CpG y 38 sitios no CpG en sus posiciones exactas. Si estas condiciones no eran encontradas la secuencia era desechada.

El patrón de las secuencias se realizó haciendo una matriz de 1 y 0 en Office Excel 2007, donde 0 representaba una citosina metilada y 1 representaba una citosina desmetilada cambiado por la reacción de bisulfito a Uracilo y convertida a timina en el PCR de secuenciación. Se analizaron 104 clonas en total.

VIII. Prueba de Mann-Whitney

Es una prueba de la mediana potenciada, de carácter no paramétrica, eso quiere decir que utiliza más información que la prueba de la mediana común. Es una prueba basada en las jerarquías de las observaciones, donde la distribución de los datos no se comporta de una manera normal.