

Universidad del Papaloapan
Campus Tuxtepec

Instituto de Biotecnología

**Aplicaciones de espectrometría de masas en epigenética: estudio
analítico del impacto del bórax en mamíferos**

TESIS

Para obtener el título de
Ingeniera en Biotecnología

Presenta:

Nuria Ahylet Martínez Manuel

Director de Tesis:

Dr. Adolfo López Torres

Co-director de Tesis:

Dra. Alejandra Contreras Ramos

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2018

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Dr. Adolfo López Torres y Dra. Alejandra Contreras Ramos, por depositar su confianza en mí.

A mi casa de estudios: Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

A CONACYT, por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013.

Al proyecto PRODEP, Apoyo a la incorporación de nuevos PTC 2016.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes siempre me impulsan a realizarme personal y profesionalmente, brindándome su apoyo incondicional, de quienes estoy y siempre estaré orgullosa y a los cuales, agradezco infinitamente haberme dado la oportunidad de alcanzar una meta más en mi vida.

A mis profesores, quienes me enseñaron que todo esfuerzo tiene su recompensa y que todo es temporal.

A mi hermano, por todas sus enseñanzas.

A mis amigos, por todo su apoyo, comprensión, consejos y confianza, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Celia, Gaby, Fany, Maky, Raquel, por permitirme compartir muchos momentos con ustedes y siempre brindarme ánimos, por su apoyo en los tiempos difíciles, gracias por estos años de amistad y los que faltan.

A mis compañeros de la Generación 2012-2017 de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, por el tiempo compartido y las experiencias a lo largo de estos importantes años.

A los compañeros del laboratorio del HIMFG, por sus enseñanzas, pero principalmente por su amabilidad en mis estadías. Principalmente a mi amiga Key y a su familia, a Lucy, a la Dra. Guadalupe por su tiempo y enseñanzas, a la Dra. Alejandra y a la Dra. Rocío por las facilidades brindadas, y a Mati por sus buenos deseos y motivación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	14
I.1. Epigenética.....	15
I.1.1. Modificaciones covalentes en histonas	17
I.1.2. Metilación del ADN	20
I.1.3. Hidroximetilación del ADN	21
II. MARCO TEÓRICO	23
II.1. Procedimientos de análisis de metilación e hidroximetilación del ADN	23
II.1.1 Determinación del grado de metilación del ADN mediante procedimientos de biología molecular	24
II.1.1.1. Metilación global en ADN.....	24
II.1.1.2. Metilación del ADN en secuencias específicas	26
II.1.2. Determinación del grado de metilación mediante procedimientos analíticos	29
II.1.2.1. Metilación global en ADN.....	29

II.1.2.2. Metilación de ADN en secuencias específicas	31
II.1.3. Determinación del grado de hidroximetilación en ADN	31
II.2. Efecto de compuestos de boro en mamíferos	33
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. OBJETIVOS.....	36
IV.1. Objetivo general	36
IV.2. Objetivos específicos.....	36
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
V.1. Equipo de Laboratorio	37
V.1.1. Instrumentación analítica.....	37
V.1.2. Equipo para para el procesamiento de muestras y/o preparación de reactivos.....	37
V.2. Reactivos y estándares	38
V.2.1. Reactivos para el tratamiento del modelo animal con boro.....	38
V.2.2. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos.....	38
V.2.3. Reactivos para hidrólisis de ADN hasta nucleósidos	38
V.2.4. Reactivos y estándares para la determinación de la metilación e hidroximetilación global en ADN por UPLC-MS/MS	38
V.3. Métodos	39
V.3.1. Modelo Animal	39
V.3.2. Tratamientos	39

V.3.3. Extracción de ADN.....	40
V.3.4. Hidrólisis enzimática de ADN.....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
VI.1. Estudio de las condiciones de separación de dC, 5mdC y 5hmdC	42
VI.2. Selección de las condiciones de detección de dC, 5mdC y 5hmdC mediante UPLC-TOFMRM.....	48
VI.3. Determinación del grado de metilación e hidroximetilación global en ADN muestras biológicas por UPLC-TOFMRM	58
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. PERSPECTIVAS.....	63
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modificaciones covalentes en ADN e histonas.....	16
Figura 2. Arquitectura de la cromatina.....	17
Figura 3. Metilación del la citosina	20
Figura 4. Mecanismo de desmetilación activa del ADN.....	22
Figura 5. Cromatogramas UPLC-MS correspondientes a 100 pmol de nucleósidos estándares dC, 5mdC y 5hmdC, dG, dA y T	43
Figura 6. Espectro de masas de dC.....	44
Figura 7. Espectro de masas de 5hmdC.....	45
Figura 8. Espectro de masas de 5mdC.....	46
Figura 9. Cromatogramas UPLC-MS correspondientes a 1 pmol/μL de los nucleósidos de interés inyectó el sistema y separados con las condiciones cromatográficas finales	47
Figura 10. Efecto de la energía de colisión sobre la señal analítica para 5hmdC con energías de: 12 eV (21300), 13 eV (25300), 14 eV (24000) y 15 eV (22200).....	49
Figura 11. Efecto del voltaje de cono sobre la señal analítica de 5hmdC con voltajes de: 30 V (20800), 40 V (23200) y 50 V (20600).....	49
Figura 12. Cromatograma UPLC-TOFMRM correspondientes a 1pmol (inyectado en el sistema) de los nucleósidos de interés con las condiciones de detección optimizadas	50
Figura 13. Esquema de preparación de las soluciones de calibración empleadas y la concentración final	54
Figura 14. Curva de calibración (en base al área de pico) para dC.	56
Figura 15. Curva de calibración (en base al área de pico) para 5hmdC.....	56
Figura 16. Curva de calibración (en base al área de pico) para 5mdC.....	57

Figura 17. Relación del porcentaje de metilación en el ADN del grupo control y de exposición a bórax en tejidos de sistema nervioso central (SNC), corazón (C), hígado (H) y páncreas (P). 60

Figura 18. Cromatogramas UPLC-TOFMRM representativos correspondientes tejido pancreático..... 61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedimientos analíticos utilizados en el análisis de metilación global en ADN 29

Tabla 2. Procedimientos para la determinación de hidroximetilación global y específica en ADN 32

Tabla 3. Antecedentes de investigaciones del papel de compuestos de boro..... 34

Tabla 4. Tabla del efecto del bórax sobre el porcentaje de metilación global en ADN.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmdC	5-hidroximetil-2'-desoxicitidina
5hmU	5-hidroximetiluracilo
5mC	5-metilcitidina
5mdC	5-metil-2'-desoxicitidina
A	Adenina
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN de cadena complementaria
AIM	Amplificación de sitios intermetilados
APOBEC	Enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico
APS	Adenosina-5'-fosfosulfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BDAPE	2-bromo-1-(4-dimetilamino-fenil)-etanona
BER	Reparación por escisión de bases
BiMP	Perfiles de Metilación con Bisulfito
BODIPY FL EDA	4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil etilendiamine
C	Citosina
CE	Electroforesis capilar
CID	Celda de fragmentación molecular por colisiones
COBRA	PCR por bisulfito seguido por análisis de restricción

CpG	Islas de citosinas y guaninas
DE	Desviación estándar
dA	2'-desoxiadenosina
dC	2'-desoxicitidina
dG	2'-desoxiguanosina
DNMTs	ADN-metiltransferasas
dNTPs	2'-desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico
ESI	Ionización por electronebulización
FAD	Flavín adenín dinucleótido
G	Guanina
GC	Cromatografía de gases
hMeDIP	Inmunoprecipitación de ADN hidroximetilado
HAc	Ácido acético
HATs	Histonas acetiltransferasas
HDACs	Histonas desacetilasas
HKMT	Lisina histona metiltransferasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a detectores de espectrometría de masas en tándem
LM-PCR	PCR mediado por ligación
LOD	Límite de detección
MALDI-TOF-MS	Desorción/ionización en matriz asistida por láser con detector de espectrometría de masas de tiempo de vuelo
MeDIP	Inmunoprecipitación de ADN metilado
MIRA	Análisis de recuperación de islas CpG metiladas
MRM	Monitoreo de Reacciones Múltiples
MS-AP-PCR	Metilación específica por PCR empleando primers de manera arbitraria
MSP	Metilación específica por PCR

LISTA DE ABREVIATURAS

MTBSTFA	N-Metill-N-(Ter-Butildimeilsilil)Trifluoroacetamida
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RPLC	Cromatografía de líquidos en fase inversa
PPi	Fosfato inorgánico
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Timina
TBDMCS	Ter-Butildimetilclorosilano
TDG	Timina ADN glicosilasa
TET	Enzimas de translocación 10-11
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UPLC	Cromatografía de líquidos en ultra resolución
UPLC-TOFMRM	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con monitoreo de reacciones múltiples

RESUMEN

La epigenética es el área de estudio enfocada a los fenómenos transcripcionales que dependen de la estructura de la cromatina, en donde la conformación compacta impide la transcripción, mientras que la conformación relajada permite la actividad génica. La estructura de la cromatina depende de varios factores, entre los que se encuentran, las modificaciones covalentes en histonas y en el ADN. La metilación del ADN es el evento epigenético mejor caracterizado que contribuye a la compactación de la cromatina, y puede ser determinado de manera global o específica. El grado de metilación global del ADN, calculado como el porcentaje molar de citosinas metiladas con respecto a las citosinas totales, es reconocido como un bioindicador de eventos epigenéticos a gran escala, para evaluar la respuesta de los organismos a diferentes condiciones fisiológicas. La metilación del ADN es un proceso reversible, a pesar de que los mecanismos de desmetilación no han sido claramente elucidados se ha planteado que la 5-hidroximetil-2'-desoxicitosina (5hmdC) puede estar involucrada en los procesos de desmetilación del ADN. Esta modificación también puede ser evaluada de manera global y específica, por lo que es necesaria la implementación de procedimientos analíticos adecuados para la determinación global de 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC) y 5hmdC de manera simultánea. En este trabajo se implementó un método de determinación simultánea del grado de metilación e hidroximetilación global en ADN mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con monitoreo de reacciones múltiples (UPLC-TOFMRM). Se utilizó la ionización por electronebulización (ESI) en modo positivo y para evaluar la señal analítica se monitorearon los iones y las transiciones de m/z 483 \rightarrow 126 y 515 \rightarrow 142, lo que permitió obtener límites de detección de 20/ μ L y 50 fmol/ μ L, para 5mdC y 5hmdC, respectivamente.

La implementación del procedimiento UPLC-TOFMRM permitió evaluar la influencia del bórax (un compuesto a base de boro, con probados efectos antioxidantes, anticarcinogénicos y protectores contra metales y metaloides tóxicos en mamíferos) sobre el grado de metilación global de ADN en ratones de la cepa Balb/c. La determinación del porcentaje de metilación global en ADN en Sistema Nervioso Central (SNC), corazón, hígado y páncreas indicó una tendencia de disminución de este bioindicador en todos los tejidos del grupo de ratones expuestos a 1 mg de boro al día y un efecto significativo en tejido pancreático.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la transmisión de la información contenida en el ADN y la modulación de la expresión génica ha implicado asumir la complejidad del genoma. La genética se ocupa de forma general al estudio de los genes y de los diversos mecanismos que regulan la transmisión de los caracteres hereditarios, buscando los genes que dan origen a los diversos fenotipos. La genómica, es el área que aborda la comprensión de la secuencia de bases en el ADN de los organismos a nivel molecular.

Las alteraciones genéticas pueden explicar algunas de las causas en diversas enfermedades, donde la susceptibilidad se atribuye a mutaciones en uno o más genes. Sin embargo, la secuencia del gen de un estirpe celular puede ser la misma, pero no determinar el destino de ésta en el desarrollo celular, es por ello, que el origen de algunas enfermedades es aún desconocido, haciendo necesario el estudio de las interacciones entre los genes y sus productos, que dan lugar al fenotipo. Es en este nivel donde el papel de los mecanismos epigenéticos han tomado relevancia. La epigenética estudia los cambios en la cromatina, provocados diversas modificaciones de naturaleza covalente y reversible, en el ADN que dan lugar a la diversidad celular, o en las histonas por medio de la regulación dinámica de la expresión génica.

I.1. Epigenética

Los marcadores epigenéticos son en la actualidad importantes para la regulación de la expresión génica en varios tejidos del organismo. La epigenética estudia los cambios de la actividad y expresión de los genes ocasionados por modificaciones en la estructura de la cromatina, sin alteraciones en la secuencia nucleotídica [1].

La información epigenética regula la disposición nucleosómica alrededor del ADN, por lo tanto, la conformación relajada de la cromatina permite la actividad transcripcional, mientras que la configuración condensada conduce al fenómeno de represión génica [2]. La epigenética es considerada una huella génica, con frecuencia, las características individuales son consideradas “marcas” ya que están relacionadas a lugares genómicos específicos, que a través de muchos ciclos de división celular se propagan, pero, tienen la capacidad de poder ser borradas con la diferenciación celular o bajo diversas exposiciones medioambientales [3].

Existen diversos eventos epigenéticos que actúan en conjunto y que ocasionan cambios en la estructura de la cromatina, tales como modificaciones covalentes en el ADN e histonas, remodelación del nucleosoma y la acción de pequeños ARNs no codificantes (**Figura 1**) [1, 4].

Actualmente, el estudio de los cambios estructurales en la cromatina permite comprender la actividad génica de los organismos ante diversas condiciones medioambientales y situaciones fisiológicas, como la predisposición de los individuos a defectos congénitos, o patologías como cáncer, desórdenes neurodegenerativos e inmunes [5].

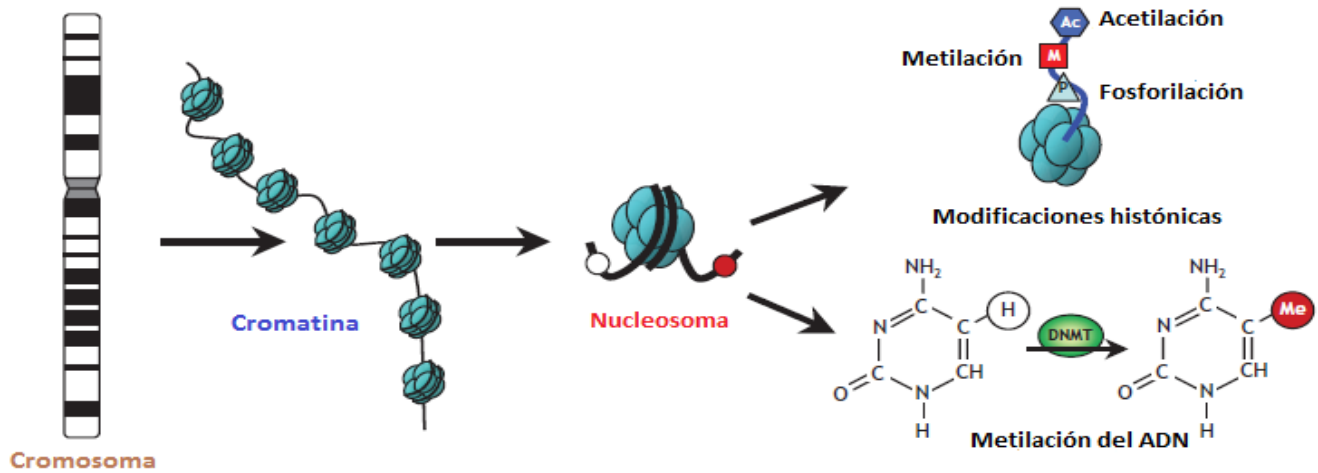


Figura 1. Modificaciones covalentes en ADN e histonas. Tomada y modificada de [6]

I.1.1. Modificaciones covalentes en histonas

El nucleosoma es la unidad básica dinámica de la cromatina, el cual contiene dos copias de histonas principales: H2A, H2B, H3 y H4 que forman un octámero, rodeado por 147 pares de bases de ADN (**Figura 2**) [7].

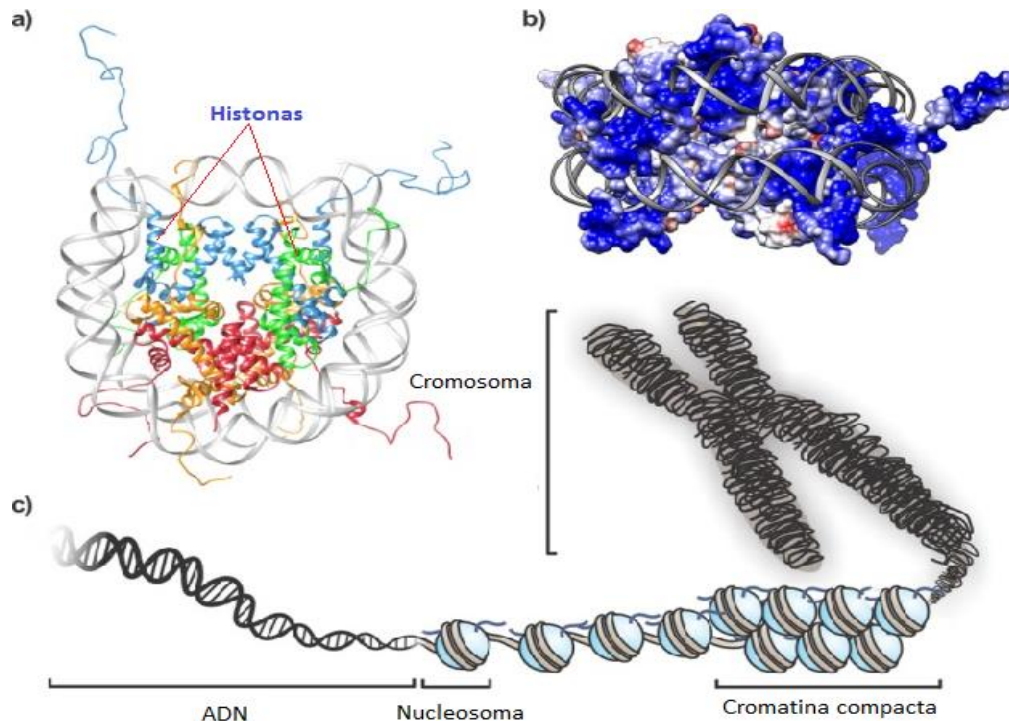


Figura 2. Arquitectura de la cromatina. a) Estructura de un mononucleosoma. El ADN (gris) se envuelve alrededor de dos copias de H2A (naranja), H2B (rojo), H3 (azul) y H4 (verde). b) Representación de superficie electrostática de un octámero de histonas. Las regiones altamente catiónicas (azules) guían la trayectoria del envoltorio de ADN. c) Representación esquemática de la arquitectura del genoma. Tomada y modificada de [8]

La acetilación y la metilación en histonas, son las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas del proceso transcripcional y en los procesos de oncogénesis, son eventos cuyos efectos se relacionan y repercuten uno sobre otro, ya que, generalmente, la hipermetilación en islas de citosinas y guaninas (CpG) da lugar a la desacetilación de histonas cercanas [9].

La acetilación puede evaluarse de manera global y en secuencias específicas. La evaluación global nos permite comprender la actividad transcripcional de manera general o a gran escala, mientras que, el análisis en promotores específicos, nos proporciona conocimientos sobre los mecanismos de control de la actividad de expresión de genes de interés.

La acetilación tiene el efecto contrario a la metilación del ADN, ya que contribuye a la actividad transcripcional, al provocar la relajación de la cromatina. Además, es una modificación reversible en residuos específicos en las histonas controlada por dos familias de enzimas: las histonas acetiltransferasas (HATs) como activadores y las histonas desacetilasas (HDACs) como represores [10]. Las HATs utilizan acetil-CoA como cofactor y por ello catalizan la transferencia de un grupo acetilo al grupo ϵ -amino de las cadenas laterales de lisina, con ello la carga positiva de la lisina se neutraliza y esto tiene el potencial de debilitar las interacciones entre las histonas y el ADN, lo cual, da lugar a la relajación de la cromatina, permitiendo el reclutamiento de la maquinaria de transcripción [11].

Las histonas desacetilasas utilizan como cofactor la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y en contraste con las HATs restauran la carga positiva de lisina, lo cual, da lugar a la compactación de la cromatina y con ello a la represión transcripcional [12].

El arreglo de histonas y el ADN se basa por lo general en las contribuciones electrostáticas y el enlace de hidrógeno, en lugar de superficies hidrófobas complementarias de las interacciones proteína-proteína [1].

La fosforilación al igual que la acetilación es un proceso sumamente dinámico, ambas modificaciones reducen la carga positiva neta de las histonas y, por lo tanto, debilitan las interacciones electrostáticas con el ADN negativamente cargado [8]. Esta modificación origina una carga negativa al transferir un grupo fosfato de ATP al grupo hidroxilo del residuo de la cadena lateral de aminoácidos, generalmente en residuos de serinas, treoninas y tirosinas, habitualmente, pero no exclusivamente, en las colas de las histonas N-terminales [12]. Por lo tanto, la acetilación está regulada por cinasas que agregan grupos fosfatos y por fosfatasas que los eliminan [13].

La metilación de histonas es otro evento que modula la estabilidad del nucleosoma, es una modificación que ocurre principalmente en las cadenas laterales de residuos de lisinas y argininas, que en comparación con la acetilación y la fosforilación, no afecta la carga positiva de las histonas. Los residuos de lisinas pueden ser mono, di o tri-metilados, mientras que los residuos de argininas sólo pueden ser mono y di-metilados [14, 15]. Esta modificación es llevada a cabo por enzimas metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), molécula usada como cofactor donador del grupo metilo. La lisina histona metiltransferasa (HKMT) cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) a un grupo ϵ -amino de lisina.

La arginina histona metiltransferasa cataliza la transferencia de un grupo metilo de SAM al grupo ω -guanidino de arginina [12]. Por otra parte las desmetilasas se encargan de la eliminación de grupos metilo, utilizando Fe (II) o flavín adenín dinucleótido (FAD) y α -cetoglutarato como cofactores [16].

La ubiquitinación en comparación con la acetilación, la metilación y la fosforilación implica una modificación covalente grande, es decir, no se da en ciertos residuos, se lleva a cabo en un conjunto de ellos. Esta modificación consiste en la adición a las lisinas de las histonas de un polipéptido llamado ubiquitina, formado por 76 aminoácidos, cuya reacción es catalizada por tres enzimas, las cuales actúan de manera secuencial: E1-activado, E2-conjugante y E3-ligante [12, 15].

I.1.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN es un marcador epigenético importante que se manifiesta en diversos procesos celulares, y es ampliamente estudiado en procariotes y eucariotes. Es el evento epigenético mejor caracterizado y contribuye potencialmente a la condensación de la cromatina, y por lo tanto a la represión transcripcional [17].

Esta modificación covalente ocurre por la adición de un grupo metilo (CH_3) en la posición 5 de la pirimidina en la 2'-desoxicitosina (dC) para formar 5-metil-2'-desoxicitosina (5mdC) (**Figura 3**) [18]. Esta reacción es catalizada por enzimas del grupo ADN-metiltransferasas (DNMTs) donde la SAM participa como donador del grupo metilo [19].

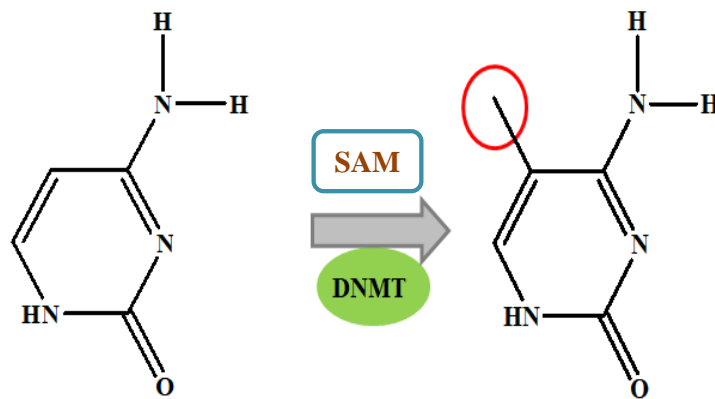


Figura 3. Metilación de la citosina

En mamíferos esta modificación se restringe a regiones ricas en dinucleótidos CpG, a excepción de las células madre embrionarias, en las que la metilación se da de una forma única en regiones con bajo contenido de CpG, con un patrón característico asociado a promotores de genes de diferenciación, que favorece el estado pluripotente [20].

Este evento epigenético puede evaluarse de manera global y de forma específica en los promotores de genes [21]. Así, el análisis de metilación del ADN en secuencias específicas permite identificar a los genes que están involucrados en los procesos fisiológicos.

Por otro lado, el grado de metilación global del ADN, calculado como el porcentaje molar de citosinas metiladas con respecto a las citosinas totales, es reconocido como un bioindicador de efectos epigenéticos a gran escala [21]. El análisis específico proporciona información valiosa, por ejemplo, en ciertas patologías oncogénicas se han encontrado patrones erróneos de metilación en el ADN, en donde los tejidos neoplásicos presentan hipometilación global de ADN e hipermetilación en promotores de genes involucrados en la supresión tumoral [22, 23].

I.1.3. Hidroximetilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso reversible, pero, los mecanismos de desmetilación no han sido claramente elucidados y se ha planteado que la 5-hidroximetil-2'-desoxicitosina (5hmdC) puede estar involucrada en los procesos activos de desmetilación del ADN [24].

Para llevar a cabo la oxidación de la 5mdC a 5hmdC se han identificado a las enzimas de la familia TET (Ten Eleven Translocation, por sus siglas en inglés) que presentan las características de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe (II) [25]. Durante el mecanismo de desmetilación activa del ADN (**Figura 4**) la 5mC y la 5hmC son desaminadas por la enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico (APOBEC), y convertidas en timina (T) y 5-hidroximetiluracilo (5hmU), respectivamente.

Por otra parte, la 5hmC puede ser oxidada sucesivamente por las enzimas TET hasta formar 5-formilcitosina (5fC) y/o 5-carboxicitosina (5caC). Los apareamientos erróneos entre guanina (G):Y (Y=T, 5hmU, 5fc, 5caC) son reconocidos por la timina ADN glicosilasa (TDG). Finalmente, las bases que se aparearon de manera incorrecta (Y) son eliminadas y sustituidas por C mediante el sistema de reparación por escisión de bases denominado BER.

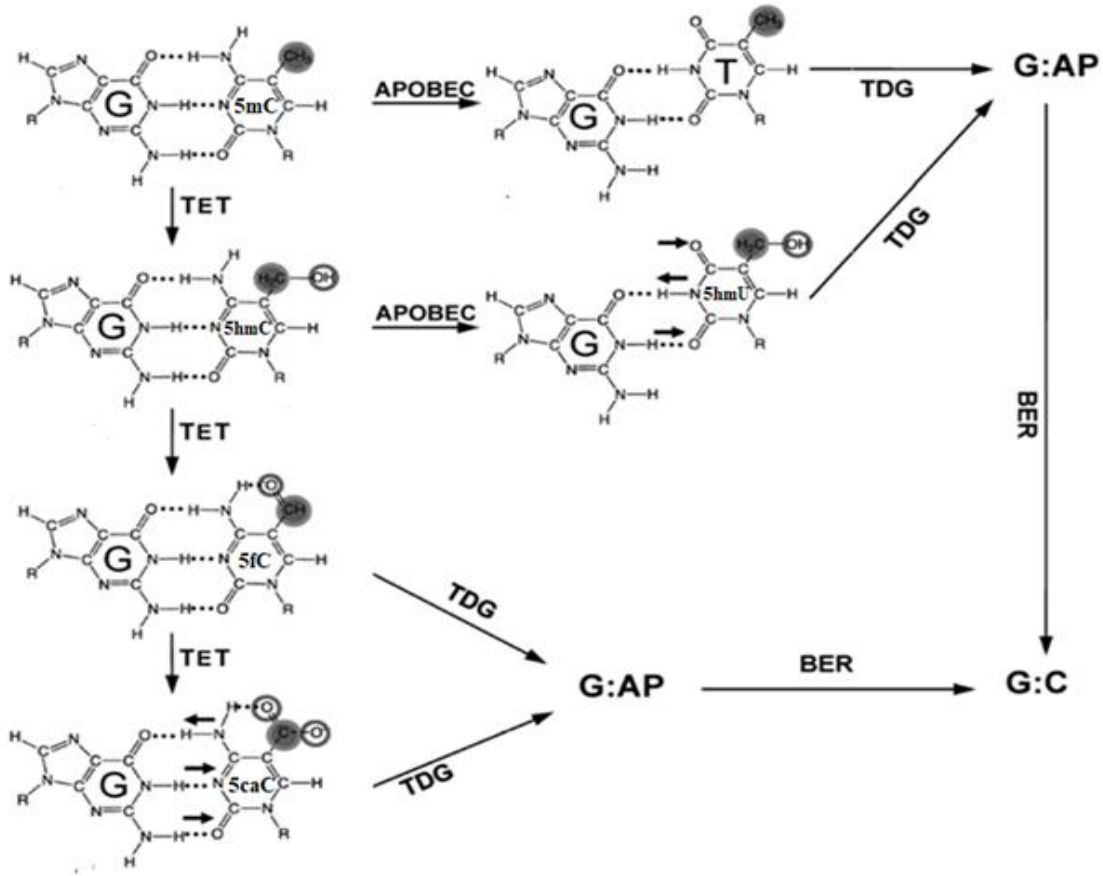


Figura 4. Mecanismo de desmetilación activa del ADN. Tomada y modificada de [26]

Se han encontrado niveles significativos de 5hmdC principalmente en ADN de células embrionarias, neuronas y cerebro, por lo que de la misma manera que la metilación del ADN, esta modificación es reconocida como un biomarcador de eventos epigenéticos [23].

De la misma manera que la metilación de ADN, la hidroximetilación de su citosina puede ser evaluada de manera global y en secuencias específicas. El tejido del SNC es el que presenta mayor grado de hidroximetilación global del ADN (0.6 %) y se ha reportado que sus patrones se alteran durante el desarrollo neuronal y cerebral de mamíferos, así como en procesos neurodegenerativos [25, 27].

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Procedimientos de análisis de metilación e hidroximetilación del ADN

Existen diversos métodos para la determinación del grado de metilación e hidroximetilación global del ADN, los cuales dependen del enfoque de estudio, como bioindicadores a gran escala o en genes específicos. Generalmente se emplean técnicas de biología molecular para la determinación de metilación e hidroximetilación específica y procedimientos analíticos para la determinación global de estos bioindicadores en el ADN [28, 29].

Para la determinación de estos bioindicadores a gran escala, habitualmente, se opta por los procedimientos analíticos basados en técnicas de cromatografía de líquidos debido a su sensibilidad, reproducibilidad, confiabilidad y carácter cuantitativo [25]. Por otro lado, para la detección simultánea de estos biomarcadores, que se encuentran en concentraciones relativamente bajas (del orden de ng/mL), se utilizan procedimientos instrumentales que involucran detectores de espectrometría de masas debido a su alta sensibilidad [30, 31].

A continuación se describen las diversas técnicas que se emplean para el estudio de la metilación e hidroximetilación en ADN de manera global y en secuencias específicas por procedimientos de biología molecular y analíticos.

II.1.1 Determinación del grado de metilación del ADN mediante procedimientos de biología molecular

II.1.1.1. Metilación global en ADN

Existen diversas técnicas para determinar los patrones de metilación del ADN global, los cuales involucran generalmente el pretratamiento de la muestra para su posterior análisis [32]. La combinación de diferentes tipos de pretratamiento ha resultado en una gran cantidad de técnicas para determinar patrones y perfiles de metilación del ADN [33, 34].

Los primeros procedimientos para la determinación de la metilación global a gran escala involucraron la exploración genómica por sitios de restricción [35, 36], la cual consiste en el empleo de electroforesis bidimensional de ADN en gel utilizando enzimas de restricción sensibles a sitios de metilación, tales como *NotI* o *AscI* para obtener perfiles de metilación de miles de regiones al mismo tiempo. A pesar de la cobertura genómica que se logra (alrededor del 10 % de las islas CpG) y la poca sensibilidad (requiere aproximadamente el 30 % de metilación para ser detectable), el perfil de diversas muestras puede ser comparado para hallar las diferencias en la metilación global del ADN.

Se han descrito diversos procedimientos basados en microarreglos de ADN que se encuentran en un soporte de vidrio, el cual debido a su pequeño tamaño no admite el uso de sondas radiactivas, por lo que se utilizan sondas fluorescentes [37-41]. Una matriz de ADN consiste en la distribución ordenada de moléculas de ADN de secuencia conocida (denominadas sondas) sobre un soporte sólido. Estas sondas se hibridan con una solución de ADN desconocidos (dianas) que han sido marcados previamente. Después de la hibridación y diversos lavados, los productos híbridos retenidos en la matriz emiten una señal que puede ser interpretada por algún instrumento adaptado a la señal. Las dianas son generalmente moléculas de ADNc obtenidas por transcripción inversa a partir de ARNm [42]. Pueden emplearse muestras de menos de 200 mm de diámetro por cm² de soporte matricial.

Asimismo, se han empleado técnicas de microarreglos con pretratamiento del ADN con bisulfito [43] seguido de su amplificación por PCR, utilizando iniciadores que no contenían las islas dCpdG, para que las regiones metiladas y no metiladas se amplificaran por igual.

Otras técnicas, incluyen la inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) [44-46] ya que el porcentaje de metilación global en ADN también puede ser cuantificado por anticuerpos metilcitosina específicos. Una gran ventaja de este enfoque es que puede llevarse a cabo en una base de celda por celda en lugar de en una población heterogénea. Esta técnica *in situ* basada en la hibridación para su estudio deber ser previamente validada con un control para la accesibilidad del anticuerpo al ADN [47].

Los enfoques de detección de inmunoensayos clásicos implican cuantificar la retención de ADN radiomarcado por anticuerpos policlonales en filtros de nitrocelulosa, inmunoprecipitación, filtración en gel, y visualización bajo microscopio electrónico [48, 49].

La metilación de citosinas puede detectarse en cromosomas en metafase y en la cromatina utilizando anticuerpos monoclonales combinados con tinción de fluorescencia. La incorporación de 5-bromodeoxiuridina en DNA con desnaturalización térmica [50] puede aumentar la eficacia del enlace de los anticuerpos anti-metilcitosina en los cromosomas en metafase. La hibridación *in situ* con detección mediante fluorescencia hace posible la distinción de diferentes sitios metilcitosina. Los métodos que incluyen inmunoprecipitación requieren grandes cantidades de ADN genómico [45] (generalmente mayor a 10 µg total) y del anticuerpo; por lo que para solucionar esta desventaja se ha empleado la técnica derivada de MeDIP denominada PCR mediado por ligación (LM-PCR), utilizando extremos romos en la ligación del adaptador [51].

Recientemente, en estudios de diversos tipos de cáncer se ha utilizado el análisis de recuperación de islas CpG metiladas (MIRA) [52, 53], que se basa en la purificación de ADN metilado con columnas comerciales, de proteínas de unión a zonas CpG metiladas.

II.1.1.2. Metilación del ADN en secuencias específicas

Para realizar el estudio de la metilación del ADN en secuencias específicas, es decir sobre algún gen o genes candidatos, las técnicas por lo general requieren de un tratamiento del ADN antes de la amplificación o hibridación; donde el análisis puede ser cuantitativo o cualitativo. El análisis cuantitativo alelo-específico implica normalmente clonación y secuenciación por bisulfito de sodio mientras que la determinación no alelo-específico involucra el uso de secuenciación directa por bisulfito de sodio, el uso de PCR y pirosecuenciación.

Dentro de las técnicas empleadas, la digestión con endonucleasas es una herramienta sumamente utilizada en biología molecular para el análisis de patrones de metilación del ADN en secuencias específicas [32, 54]. Esta técnica se basa en el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación, las cuales reconocen secuencias del ADN, en regiones de citosinas que pueden estar o no metiladas, cortándolas de forma específica, con lo que de acuerdo al análisis de los patrones de corte se puede inferir una lectura de metilación de ADN. Diferencias en la metilación se detectan como cambios en el patrón de fragmentos de restricción generados por la digestión sensible a la metilación. Dentro de las enzimas más empleadas destacan la *HpaII* y *SmaI*, ya que cuentan con isosquizómeros, es decir, enzimas que reconocen el mismo sitio y cortan de la misma forma [55]. Los fragmentos de ADN se separan empleando gel de electroforesis, los cuales posteriormente se analizan mediante hibridación denominada Southern Blot, con el uso de una sonda específica para la secuencia del gen de interés. Este método en la actualidad aún es aplicable para algunos estudios locus específicos que necesitan información de la relación de la metilación del ADN en múltiples kilobases, ya sea entre islas CpGs o entre una región CpG y un polimorfismo genético.

El uso de enzimas de restricción hizo posible identificar diferencias en la metilación basadas en los patrones de los fragmentos obtenidos por digestión al ser separados por electroforesis en geles de dos dimensiones. La exploración del genoma de referencia por restricción ha sido ampliamente usada para identificar locis impresos y sitios que están metilados de manera específica, para el cáncer o para diversos tejidos. En la actualidad el uso de la PCR ha permitido evaluar la metilación de regiones específicas y ha facilitado su análisis.

Otro procedimiento para determinar la metilación en secuencias de ADN consiste en la amplificación de los dinucleótidos dCpdG metilados o MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) [56, 57] por sus siglas en inglés, el cual se basa en la digestión de ADN con la enzima *SmaI* (dCpdCpdCpdGpdGpdG), que corta los sitios no metilados dejando extremos romos; seguido de la restricción con la enzima *XmaI*, que corta los sitios metilados dejando extremos cohesivos los cuales son ligados a un adaptador específico. Así, el fragmento puede ser secuenciado con oligonucleótidos que se alinean con la secuencia *XmaI* del adaptador.

Otra metodología, consiste en la amplificación de sitios intermetilados, denominado AIM (Amplification of Inter-methylated Sites) [57] por sus siglas en inglés, derivado de MS-AP-PCR, que se lleva a cabo en las secuencias ligadas utilizando oligonucleótidos que se extienden en la dirección 3', donde los patrones diferenciales de productos de PCR cebados arbitrariamente son generados con enzimas de restricción sensibles o restringidas a la metilación del ADN genómico.

Por otra parte el descubrimiento de la reacción de conversión del bisulfito de sodio permitió revolucionar el estudio de la metilación del ADN [57]. Mediante esta técnica se lleva a cabo la desaminación de las citosinas no metiladas transformándolas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas y el resto permanecen intactas. Esta reacción sólo se lleva a cabo en ADN de cadena sencilla por lo que el ADN necesita ser previamente desnaturalizado. Las técnicas que emplean la conversión con bisulfito de sodio [58, 59] requieren el diseño de cebadores específicos y la amplificación del ADN mediante PCR (que introduce timina en lugar de uracilo). Muchas variantes han sido desarrolladas, incluyendo la secuenciación directa de Sanger de productos de PCR y el uso de microarreglos.

Otras técnicas implementadas implican el uso de la metilación específica por reacción en cadena de la polimerasa, conocida como MSP (methylation-specific PCR) [60] por sus siglas en inglés, el cuál es uno de los métodos que se utilizan generalmente para identificar cambios en la metilación del ADN de regiones promotoras de genes de interés [61]. Esta técnica implica la modificación inicial del ADN por bisulfito de sodio, convirtiendo todas las citosinas no metiladas en uracilo, y realizando posteriormente la amplificación con cebadores específicos para ADN metilado frente a ADN no metilado. Las **citosinas no metiladas** se amplifican como **timinas** y las **citosinas metiladas** se amplifican como **citosinas**. La MSP requiere solo pequeñas cantidades de ADN, es sensible a los alelos metilados al 0.1% de un locus de isla CpG dado, y puede realizarse en el ADN extraído de muestras incluidas en parafina [62]. Puede evaluar rápidamente el estado de metilación generalmente de cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG, independientemente del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación.

Otras estrategias, emplean la conversión con bisulfitos, tales como el uso del análisis COBRA [58], el cual constituye un gran enfoque específico en la detección de un objetivo de restricción de endonucleasa después del tratamiento con bisulfito de sodio. La gran ventaja de este método es que proporciona datos semicuantitativos con respecto al estado de la metilación en regiones específicas en cualquier muestra de ADN.

También, se han descrito muchas metodologías basadas en el uso de microarreglos. El primer arreglo de hibridación en matriz para el análisis de muestras de ADN tratadas con bisulfito de sodio requirió la amplificación de regiones individuales del genoma antes de la hibridación desarrollándose el método denominado Perfiles de Metilación con Bisulfito (BiMP) en el cual se detectan regiones densas de citosinas metiladas [32].

Actualmente, se emplea con mayor frecuencia la pirosecuenciación [63], que se basa en la conversión inducida por bisulfito de sodio y la amplificación por PCR. Se secuencian plantillas de ADN de cadena sencilla al realizar la síntesis de hebras complementarias. Después de complementar cada una de las bases de la plantilla, se activa una cascada enzimática quimioluminiscente, produciendo una señal luminosa detectable que posteriormente se cuantifica. Primero se extrae el ADN de interés, se utiliza el bisulfito para su tratamiento y se procesa por PCR. Al término de la amplificación por PCR la muestra se desnaturaliza y se hibrida con un cebador de secuencia de la ADN de cadena sencilla, la hebra complementaria se sintetiza en presencia de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), luciferina y las enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. El proceso de pirosecuenciación inicia al añadir uno de los cuatro deoxinucleótidos fosfato (dNTPs). Si el dNTP es complementario a la primera base no apareada en la hebra de la plantilla, la ADN polimerasa cataliza su incorporación a la cadena de ADN y libera fosfato inorgánico (PPi) en una cantidad proporcional a la de nucleótidos agregados. Con APS como sustrato, la ATP sulfurilasa convierte de manera cuantitativa el PPi recién liberado en ATP. Esto permite la conversión de luciferina a oxiluciferina catalizada por la luciferasa, generándose una señal de luz visible proporcional a la cantidad de ATP producido. Este método permite la cuantificación precisa de varios sitios de metilación CpG, en la misma reacción, generalmente de 25 a 30 pares de bases en cada reacción [64].

Otras técnicas, incluyen el uso de la tecnología de Illumina [41, 65], la cual ha sido adaptada para la evaluación de la metilación del ADN en hasta 1530 sitios CpG diferentes, en los cuales se utilizan cebadores específicos para secuencias metiladas y no metiladas. Los cebadores para los dos estados diferentes de metilación están etiquetados con diferentes colorantes fluorescentes y los productos se hibridan para formar matrices que contienen generalmente 30 cuentas por sitio CpG.

II.1.2. Determinación del grado de metilación mediante procedimientos analíticos

II.1.2.1. Metilación global en ADN

Los procedimientos analíticos reportados, generalmente implican dos etapas: (1) el pretratamiento de la muestra, que incluye la extracción de ADN y su hidrólisis o la derivatización de estos productos, y (2) la separación de los compuestos de interés mediante electroforesis capilar (CE), cromatografía de líquidos (HPLC) o cromatografía de gases (GC) (**Tabla 1**) [27, 66-69].

Tabla 1. Procedimientos analíticos utilizados en el análisis de metilación global en ADN

Masa de ADN	Pretratamiento de las muestras	Procedimiento de separación	Detección	Referencia
1 µg	Hidrólisis ácida (nucleobases)	CE	UV	Huang, Yang <i>et al.</i> , 2014
2 ng	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	cHILIC	ESI-qTOF	Chen, Shen <i>et al.</i> , 2013
50 ng	Hidrólisis enzimática(nucleósidos)	HILIC	ESI-TQ	Zhang, Zhang <i>et al.</i> , 2012
10 µg	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	RPLC	Arreglo de diodos (UV)	Santoyo, Flores <i>et al.</i> , 2011
50 ng	Eliminación de ARN Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	RPLC	ESI-TQ (MRM)	Le, Kim <i>et al.</i> , 2011
10 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	RPLC	Espectrofotometría UV	Sandhu, Kaur <i>et al.</i> , 2009
2.5 µg	Eliminación de ARN Hidrólisis ácida (nucleobases) Derivatización con MTBSTFA y TBDMCS	GC	EI-Q (SIM)	Rossella, Polledri <i>et al.</i> , 2009

La CE [69, 71] permite la separación de diversos compuestos y ofrece alta resolución, con separaciones en tiempos cortos (15-20 minutos), sin embargo los tiempos de retención de los compuestos presentes en la matriz pueden sufrir alteraciones. En esta técnica el ADN es hidrolizado a nucleótidos, nucleósidos o nucleobases, empleando como modo de detección espectrofotometría UV o espectrometría de masas [72]. Además el uso de BODIPY FL EDA como marcador en nucleótidos permitió la detección de la fluorescencia por espectrofluorometría [73]. Los reportes indican que la cantidad de ADN necesario debe ser entre 0.5 a 10 µg.

Por otra parte, las técnicas de separación que utilizan HPLC y GC son generalmente las de elección, que aunque con respecto a CE, involucran mayor tiempo de separación, tienen la ventaja de ser excelentemente reproducibles.

Los procedimientos de GC [68] para determinar la metilación global del ADN conllevan la eliminación de ARN como interferencia y la hidrólisis mediante el uso de ácido fórmico hasta la obtención de nucleobases, que consecuentemente son derivatizadas para la obtención de productos volátiles de tipo alquil-silano. De acuerdo a los reportes descritos de estos procedimientos, se utilizan alrededor de 2 µg de ADN y la separación de las nucleobases derivatizadas requiere de 20 a 30 minutos aproximadamente. La detección en estos procedimientos se realiza normalmente por espectrometría de masas [74].

Las técnicas que emplean cromatografía de líquidos consisten en llevar a cabo la hidrólisis enzimática del ADN hasta obtener nucleósidos y su posterior separación mediante cromatografía en fase inversa (RPLC) o de interacción hidrofílica (HILIC) [70]. La hidrólisis hasta nucleósidos permite una adecuada separación en fase inversa al eliminar la alta polaridad conferida por el grupo fosfato [25, 28].

Otros procedimientos utilizan métodos químicos, que se basan generalmente en hidrolizar el ADN (libre de ARN) con ácido fórmico al 88 % (m/m) a temperaturas de 140 °C hasta obtener nucleobases y su separación por HILIC [31]. La detección por espectrometría de masas o espectrofotometría UV se emplea para analizar los diferentes componentes del ADN [78]. Para determinar el grado de metilación global del ADN se requieren cantidades entre 1 a 10 µg [75-77]. La detección por espectrometría de masas ha sido extensamente utilizada en el análisis de metilación de ADN debido a que ofrece una alta selectividad y sensibilidad [28, 70, 76, 77]. Se han descrito diversos procedimientos basados en el uso de cromatografía de líquidos de fase inversa acoplada a espectrometría de masas en modo monitoreo de reacciones múltiples, los cuales han permitido obtener patrones de metilación de ADN a partir de cantidades bajas de ADN que oscilan entre 0.1 µg [78-79].

Para continuar con el desarrollo de procedimientos analíticos adecuados para la determinación simultánea de metilación e hidroximetilación global en ADN, el presente trabajo se enfocó en la separación adecuada de los productos de hidrólisis y la detección de los analitos por UPLC-TOFMRM.

II.1.2.2. Metilación de ADN en secuencias específicas

Los procedimientos analíticos desarrollados para la evaluación de la metilación en promotores incluyen el tratamiento con bisulfito de sodio y la amplificación de los fragmentos de interés por PCR [80, 81].

Se obtienen diversos patrones de ruptura entre los sitios CpG metilados y los no metilados, ya que los productos de PCR se transforman *in vitro* en un transcrito de cadena sencilla, utilizando la polimerasa T7 y luego una endoribonucleasa, donde finalmente se realiza el análisis por MALDI-TOF-MS, en donde se puede determinar la diferencia en masa molecular de los productos de digestión. Es un método que ofrece la posibilidad de detectar alrededor de hasta 600 y 800 pb de sitios de CpG en un amplicón simple. Generalmente se utilizan desde 2 µg de ADN para su tratamiento con bisulfito de sodio. El tiempo de análisis se encuentra alrededor de 10 minutos.

II.1.3. Determinación del grado de hidroximetilación en ADN

La evaluación de la hidroximetilación del ADN, de manera similar que la metilación del ADN, generalmente se evalúa a gran escala y en secuencias específicas (**Tabla 2**).

Las técnicas para el análisis global de este bioindicador implican dos etapas: (1) pretratamiento de la muestra que incluye la extracción de ADN y su hidrólisis, o la derivatización de estos productos, y (2) la separación de los compuestos de interés generalmente mediante cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas [44, 66, 67, 77, 82]. En la actualidad, los mecanismos de esta modificación no han sido descritos en su totalidad, por lo que el desarrollo de una metodología adecuada constituye un reto. Las técnicas para la determinación de hidroximetilación en secuencias específicas generalmente emplean el análisis mediante hMeDIP, ensayos de inmunoabsorción y el uso de PCR [83, 84].

Por otra parte se destaca la evaluación de 5hmdC en relación a la modulación del metabolismo de líneas celulares de cáncer [85], y su efecto en la actividad de enzimas TET, como un posible control para regular el crecimiento de células neoplásicas [44].

Tabla 2. Procedimientos para la determinación de hidroximetilación global y específica en ADN

Masa de ADN	Pretratamiento de las muestras	Procedimiento de separación	Detección	Evaluación de hidroximetilación en ADN	Referencia
2 µg	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas/masas (SMR)	Global	Thienpont, Steinbacher <i>et al.</i> , 2016
2 ng	Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	cHILIC	ESI-qTOF	Global	Chen, Shen <i>et al.</i> , 2013
5 ng	Eliminación de ARN Hidrólisis enzimática (nucleósidos)	Cromatografía de líquidos en fase inversa	Espectrometría de masas/masas (MRM)	Global	Le, Kim <i>et al.</i> , 2011
1 µg	Bisulfito de sodio	hMeDIP	Inmunofluorescencia	Específica	Ficz, Branco <i>et al.</i> , 2011
10 µg	Eliminación de ARN	Inmunoabsorción enzimática	Anticuerpos	Global	Rozman, Pohar Perme <i>et al.</i> , 2017

II.2. Efecto de compuestos de boro en mamíferos

El boro es un micronutriente con efectos biológicos interesantes (**Tabla 3**). Investigaciones recientes demuestran que tiene una diversidad de funciones y es de vital importancia para el metabolismo celular, siendo necesario para la salud de diversos organismos [86, 87].

Es un elemento esencial para el crecimiento y mantenimiento óseo, participa en la regulación hormonal, principalmente de hormonas tales como estrógeno y testosterona [88], y se han observado sus efectos benéficos sobre el sistema nervioso central, en la mejora de procesos cognitivos y habilidad motora [89, 90, 91].

Algunos estudios demuestran que regula la síntesis de distintas biomoléculas indispensables en los procesos celulares [92], tales como enzimas antioxidantes, entre las que se encuentran peróxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa [93], que influyen en la formación y actividad de SAM [94] y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) [89, 95, 96, 97].

Otros estudios han demostrado que compuestos del boro reducen los niveles de biomarcadores inflamatorios tales como la proteína C reactiva de alta sensibilidad y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [98]. Se destaca ampliamente su acción preventiva y terapéutica en distintos tipos de neoplasias, tales como cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, y linfoma no Hodgkin [99], así como, su capacidad en la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer hepático y cáncer de mama [100, 101].

Por otra parte se ha estudiado su papel protector contra el estrés oxidativo por pesticidas y frente a metales y metaloides tóxicos (arsénico, mercurio, cadmio) que generalmente están involucrados en la carcinogénesis y que representan riesgos contra eventos epigenéticos [102].

Poco se ha estudiado del boro en eventos epigenéticos, principalmente las dosis adecuadas de sus compuestos, tales como el ácido bórico y el tetraborato de sodio (bórax), donde las ingestas que muestran efectos benéficos son mayores a 3 mg [103]. Se desconoce de su intervención en dichos eventos, es por ello que en este trabajo, para comprender los beneficios de los compuestos de boro, se exploró el impacto de este elemento en el grado de metilación global en ADN en mamíferos.

En este trabajo estudiamos el efecto de la administración del bórax, evaluando el porcentaje de 5mdC producido en ratones de la cepa Balb/c.

Tabla 3. Antecedentes de investigaciones del papel de compuestos de boro

Año	Antecedente	Investigación	Referencia
2009	Incidencia del papel del boro sobre la actividad metabólica en ratas	La privación del boro (ácido bórico) en relación con la formación y actividad de SAM, espermidina e incremento de homocisteína y cisteína	Nielsen 2009
2011	Efectos comparativos de la suplementación de boro sobre hormonas esteroideas y citoquinas proinflamatorias	Acción del boro sobre la regulación hormonal, principalmente de hormonas estrógeno y testosterona	Naghii, Mofid <i>et al.</i> , 2011
2013	Mejoramiento de la composición ósea en conejos por efecto del boro	Contribución del boro en el mantenimiento óseo	Hakki, Dundar <i>et al.</i> , 2013
2014	Efectos del boro sobre la salud humana	Contribución del boro en el mantenimiento óseo, sistema nervioso central, artritis, cáncer, regulación hormonal.	Nielsen 2014
2014	Efecto protector del ácido bórico ante genotoxicidad de células V79 por exposición a metales	Protección del ácido bórico ante metales pesados como Cd y Pb, relacionados con carcinogénesis	Üstündağ, Behm <i>et al.</i> , 2014
2016	Inducción de apoptosis en células HepG2 por bórax	Inhibición de células de cáncer de hígado por exposición a bórax	Wei, Yuan <i>et al.</i> , 2016

III. JUSTIFICACIÓN

Existe una gran demanda de procedimientos analíticos adecuados para llevar a cabo el análisis simultáneo de metilación e hidroximetilación global del ADN para su uso en laboratorios de investigación, pero también en laboratorios de rutina, con fines de diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades en órganos como: SNC, corazón, hígado y páncreas, así como para conocer la respuesta de los organismos a diversos factores medioambientales. Para determinar estos bioindicadores se recurre a procedimientos de cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) debido a su sensibilidad, reproducibilidad y confiabilidad de los resultados; por lo que, en este trabajo se implementó un procedimiento que permita determinar de manera simultánea el grado de metilación e hidroximetilación global en ADN mediante UPLC-TOFMRM.

Por otro lado, se sabe que el boro tiene un efecto benéfico en mamíferos y se ha demostrado su capacidad protectora contra elementos tóxicos que generalmente representan un riesgo epigenético y que están involucrados en la carcinogénesis. Poco se ha estudiado de este micronutriente y se desconoce su intervención en los eventos epigenéticos, es por ello que en este trabajo, se exploró el impacto del bórax sobre los patrones de metilación e hidroximetilación global del ADN en mamíferos, utilizando como modelo a ratones de la cepa Balb/C debido a que, sus características permiten reproducir y analizar procesos como el cáncer, enfermedades infecciosas o genéticas, destacando que los genes relacionados en las enfermedades humanas están presentes en el genoma de éstos.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Implementar un procedimiento analítico que permita la determinación simultánea de metilación e hidroximetilación global en ADN mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para evaluar el efecto de compuestos de boro en los eventos epigenéticos de mamíferos.

IV.2. Objetivos específicos

IV.2.1 Establecer las condiciones de separación y detección de nucleósidos provenientes de la hidrólisis enzimática del ADN (principalmente, dC, 5mdC y 5hmdC) por LC-MS/MS.

IV.2.2. Determinar el grado de metilación e hidroximetilación global en ADN de tejidos de mamíferos expuestos a boro y evaluar la posible participación de este elemento en eventos epigenéticos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Equipo de Laboratorio

V.1.1. Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de líquidos (Acquity I-Class, Waters) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución equipado con filtro de masas de cuadrupolo, celda de fragmentación molecular por colisiones CID, sistema de movilidad iónica y analizador de masas de tiempo de vuelo (Synapt G2-Si, Waters).
- Columna cromatográfica UPLC Luna® Omega C18 1.6 μm (150 x 2.1 mm, Phenomenex)

V.1.2. Equipo para para el procesamiento de muestras y/o preparación de reactivos

- Vórtex Thermo Fisher Scientific™
- Centrífuga Metrix®
- Balanza analítica Mettler Toledo
- Incubadora Metrix®
- Micropipetas de 20, 100 y 200 μL Mettler Toledo
- Liofilizador Thermo Fisher Scientific™
- Potenciómetro Hanna® Instruments
- Espectrofotómetro UV Epoch BioTek®

V.2. Reactivos y estándares

V.2.1. Reactivos para el tratamiento del modelo animal con boro

El tetraborato de sodio para el tratamiento del modelo animal fue obtenido de Sigma-Aldrich, Merck KGa, Darmstadt, Alemania.

V.2.2. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos

El tris (hidroximetil) aminometano (Tris), el ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), el dodecil sulfato de sodio (SDS), la proteinasa K, el glicógeno, el acetato de sodio fueron obtenidos de Ambion® Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos. El fenol/cloroformo/alcohol/isoamílico fue obtenido de Promega Corporation Madison, Wisconsin, Estados Unidos. El etanol fue obtenido de Sigma-Aldrich, Merck KGa, Darmstadt, Alemania.

V.2.3. Reactivos para hidrólisis de ADN hasta nucleósidos

El ácido acético (HAc), la glicina, el cloruro de magnesio hexahidratado, el acetato de zinc dihidratado, el cloruro de calcio, el hidróxido de sodio, la DNAsa I, el glicerol, la nucleasa P1 y la fosfatasa alcalina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGa, San Luis, Misuri, Estados Unidos.

V.2.4. Reactivos y estándares para la determinación de la metilación e hidroximetilación global en ADN por UPLC-MS/MS

Los estándares de desoxirribonucleósidos 2'-desoxicitidina (dC), 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC), 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), 2'-desoxiguanosina (dG), 2'-desoxiadenosina (dA) y timidina (T); y los solventes grado UPLC metanol y formiato de amonio fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGa, San Luis, Misuri, Estados Unidos.

V.3. Métodos

V.3.1. Modelo Animal

Se utilizaron 6 ratones adultos de 6 semanas de edad (de aproximadamente 25 a 30 g de masa corporal) de la cepa Balb/c que fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: uno control y uno de exposición a boro de acuerdo al protocolo descrito por Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., y Eryavuz, A. (2010) [96].

Los ratones fueron criados en el bioterio del laboratorio de Investigación de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Celular Experimental, del Hospital Infantil de México Federico Gómez de acuerdo a la **Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.**

A los animales se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* durante un periodo de 4 semanas.

V.3.2. Tratamientos

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: uno control y uno de exposición a boro donde:

- El grupo control recibió alimento y agua *ad libitum* durante 4 semanas.
- El segundo grupo recibió diariamente 1 mg de boro por día vía oral, durante 4 semanas.

Después de 4 semanas de exposición, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical 24 h posterior a la última exposición a boro y se tomaron muestras de SNC, corazón, hígado y páncreas. Las muestras obtenidas fueron conservadas a -70 °C hasta la extracción de ADN.

V.3.3. Extracción de ADN

Para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo de extracción de ADN con fenol/cloroformo/alcohol/isoamílico descrito por Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E., y Macedo, A. M. (1999) [104]. Se homogenizaron 100 mg de tejido con 600 μL de amortiguador de homogenización. Al homogenado se le agregaron 30 μL de proteinasa K 20 mg/mL, y se incubó a 55 °C por 24 horas. Después, se adicionaron 700 μL de fenol/cloroformo/alcohol/isoamílico y se agitó en vórtex por 20 segundos. Se centrifugó a 16000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó transfiriéndolo a un microtubo de 1.5 mL. El ADN se precipitó con 1 μL de glicógeno 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 20 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 800 μL de etanol al 100%. Se incubó el microtubo a -20 °C por 12 horas. Para la obtención del botón de ADN, cada muestra se centrifugó a 16000 g por 15 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón de ADN se lavó con 500 μL de etanol al 75 %, la muestra se centrifugó a 16000 g por 10 minutos a 4 °C. El procedimiento de lavado se repitió una vez más. Después de centrifugar, se decantó completamente el etanol y se dejó secar el botón de ADN al aire por 10 minutos.

Finalmente el ADN se resuspendió con 100 μL de agua libre de dnasas. La concentración del ADN fue determinada por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm. Para evaluar la pureza se utiliza el cociente entre las absorbancias $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$. Se consideraron como valores adecuados un cociente entre 1.8 y 2.5. El ADN se conservó a -20 °C hasta la hidrólisis enzimática.

V.3.4. Hidrólisis enzimática de ADN

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del ADN hasta obtener nucleósidos, se utilizó el protocolo descrito por Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Mittelsten Scheid, O., y Jonak, C. (2008) [105] con ligeras modificaciones. Cada muestra (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se resuspendió en 35 μL de agua y a cada una de ellas se le agregó 5 μL de amortiguador de hidrólisis (ácido acético 200 mM, glicina 200 mM, cloruro de magnesio 50 mM, cloruro de zinc 5 mM, cloruro de calcio 2 mM pH 5.3). A la mezcla anterior se le adicionó 10 μL de nucleasa Mix (1 U de nucleasa P1 y 20 U de DNAsa), se mezcló, se centrifugó a 20000 g por 10 segundos y se incubó a 37 °C durante 14 horas. Posteriormente, se congelaron las muestras a -20 °C. Más tarde cada muestra fue alcalinizada adicionando 5 μL de hidróxido de sodio 100 mM y 10 μL de fosfatasa alcalina 0.2 U/ μL .

Finalmente, las muestras se incubaron a 37 °C y se conservaron a -20 °C hasta su análisis por UPLC-TOFMRM-MS.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI.1. Estudio de las condiciones de separación de dC, 5mdC y 5hmdC

Inicialmente se utilizaron los estándares de desoxirribonucleósidos 2'-desoxicitidina (dC), 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC), 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), 2'-desoxiguanosina (dG), 2'-desoxiadenosina (dA) y timidina (T) con la finalidad de simular la composición de muestras hidrolizadas reales para seleccionar las condiciones de separación adecuadas para estos nucleósidos y analizar por cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada a espectrometría de masas, monitoreando los iones propuestos por Alcazar Magana, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., y Wrobel, K. (2016) [106].

Para este estudio, la temperatura del horno de columna se programó a 40 °C y los disolventes que se consideraron como fases móviles fueron acetonitrilo, agua, metanol; y se utilizó formiato de amonio como amortiguador de pH. El uso de acetonitrilo en la fase móvil eluyó los analitos de forma más rápida y no permitió separar dC y 5hmdC (datos no mostrados), por lo que el metanol se seleccionó como modificador orgánico. Se evaluó efecto del pH en un intervalo 3.5 a 4.5 utilizando formiato de amonio 10 mM (disminuyendo el pH con ácido fórmico), sobre la separación de los analitos. En la **Figura 5** se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos a diferentes pH, en los cuales se observó que a pH 4 se obtiene una mejor separación de los analitos de interés.

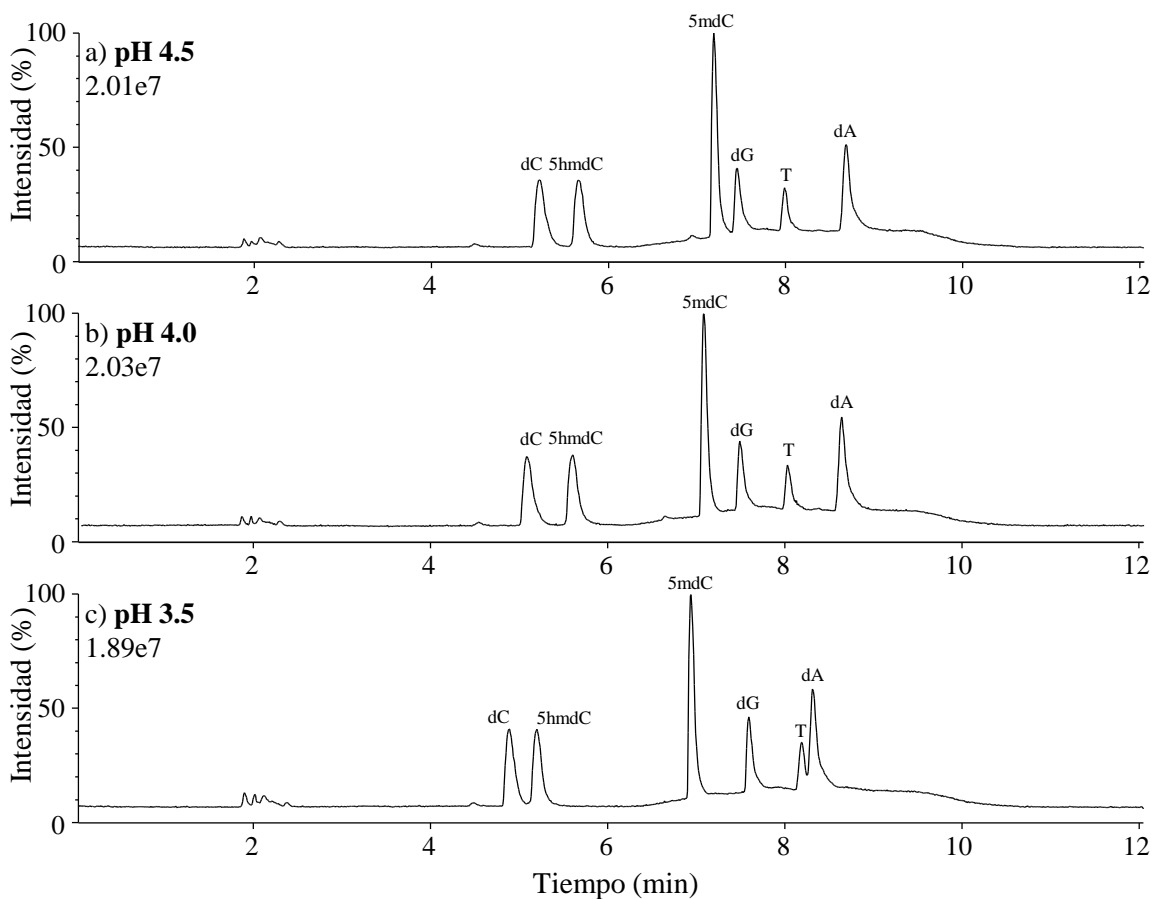


Figura 5. Cromatogramas UPLC-MS correspondientes a 100 pmol de nucleósidos estándares dC, 5mdC y 5hmdC, dG, dA y T separados, utilizando formiato de amonio 100 mM a pH de: a) 4.5, b) 4.0 y c) 3.5

Los espectros de masas correspondientes a los nucleósidos de interés se muestran en las **Figuras 6, 7 y 8** para dC, 5hmdC y 5mdC; respectivamente. En cada figura se muestra el patrón de masas que corresponde al ion molecular protonado $[M+H]^+$, el ion molecular fragmentado $[M-\text{desoxirribosa}]^+$ y el dímero iónico $[2M+H]^+$ para cada analito. Estos espectros concuerdan con el reporte de Alcazar Magana, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., y Wrobel, K. (2016) [106].

Como se puede apreciar en todas las figuras, el ion de mayor intensidad corresponde al dímero iónico por lo que este fue utilizado para desarrollar los experimentos de MRM.

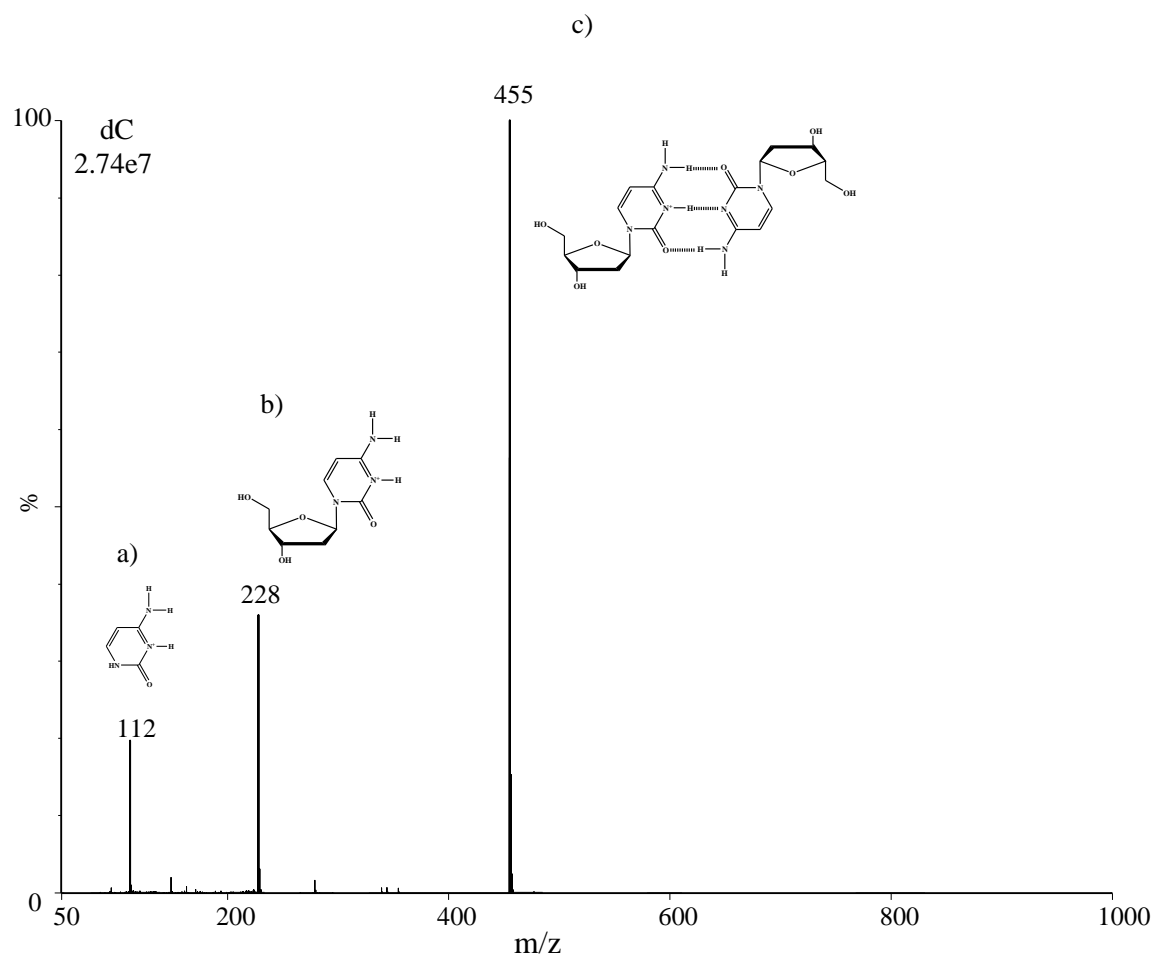


Figura 6. Espectro de masas de dC, a) ion molecular protonado $[M+H]^+$, b) ion molecular fragmentado $[M\text{-desxorribosa}]^+$ y c) dimero iónico $[2M+H]^+$

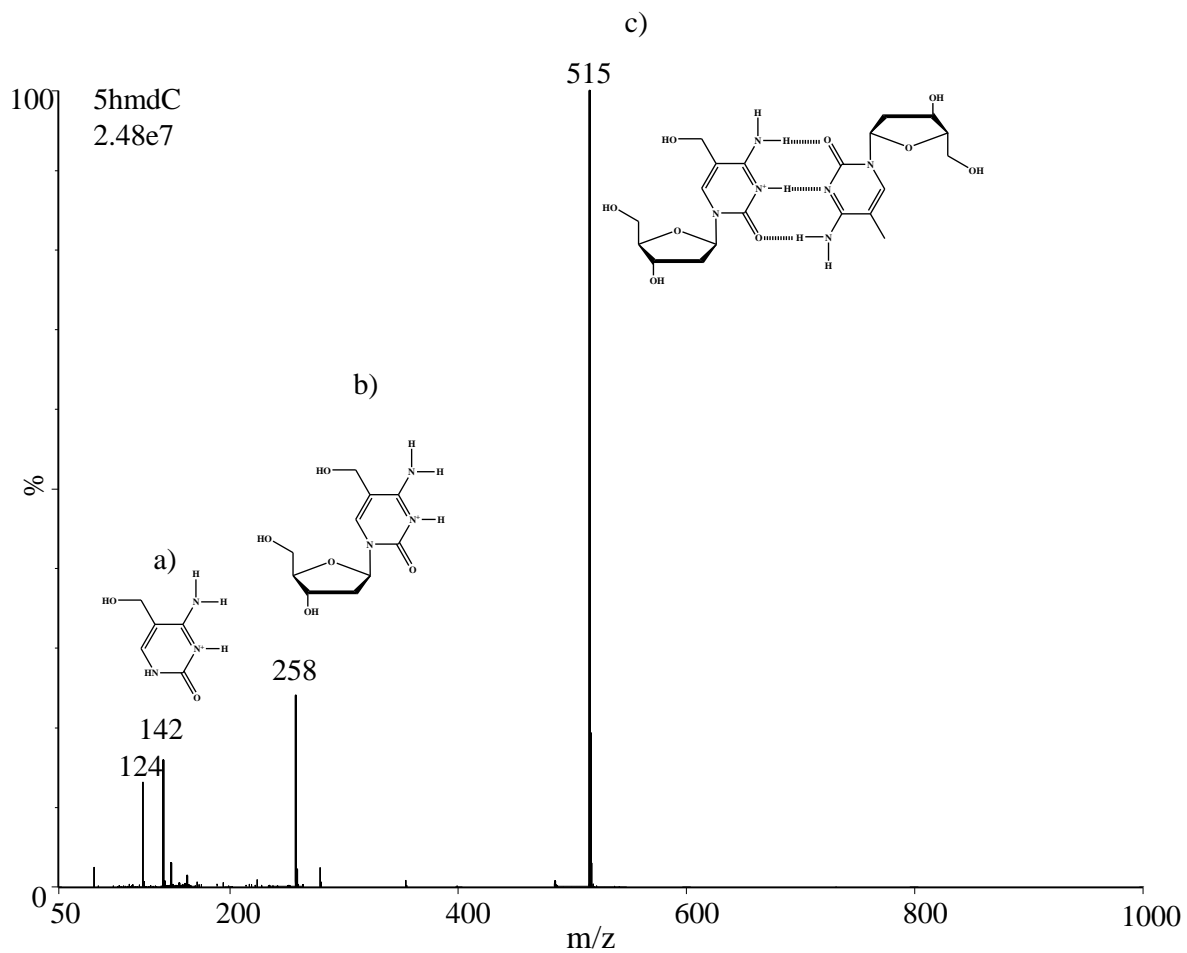


Figura 7. Espectro de masas de 5hmdC, a) ion molecular protonado $[M+H]^+$, b) ion molecular fragmentado $[M\text{-desorribosa}]^+$ y c) dimero iónico $[2M+H]^+$

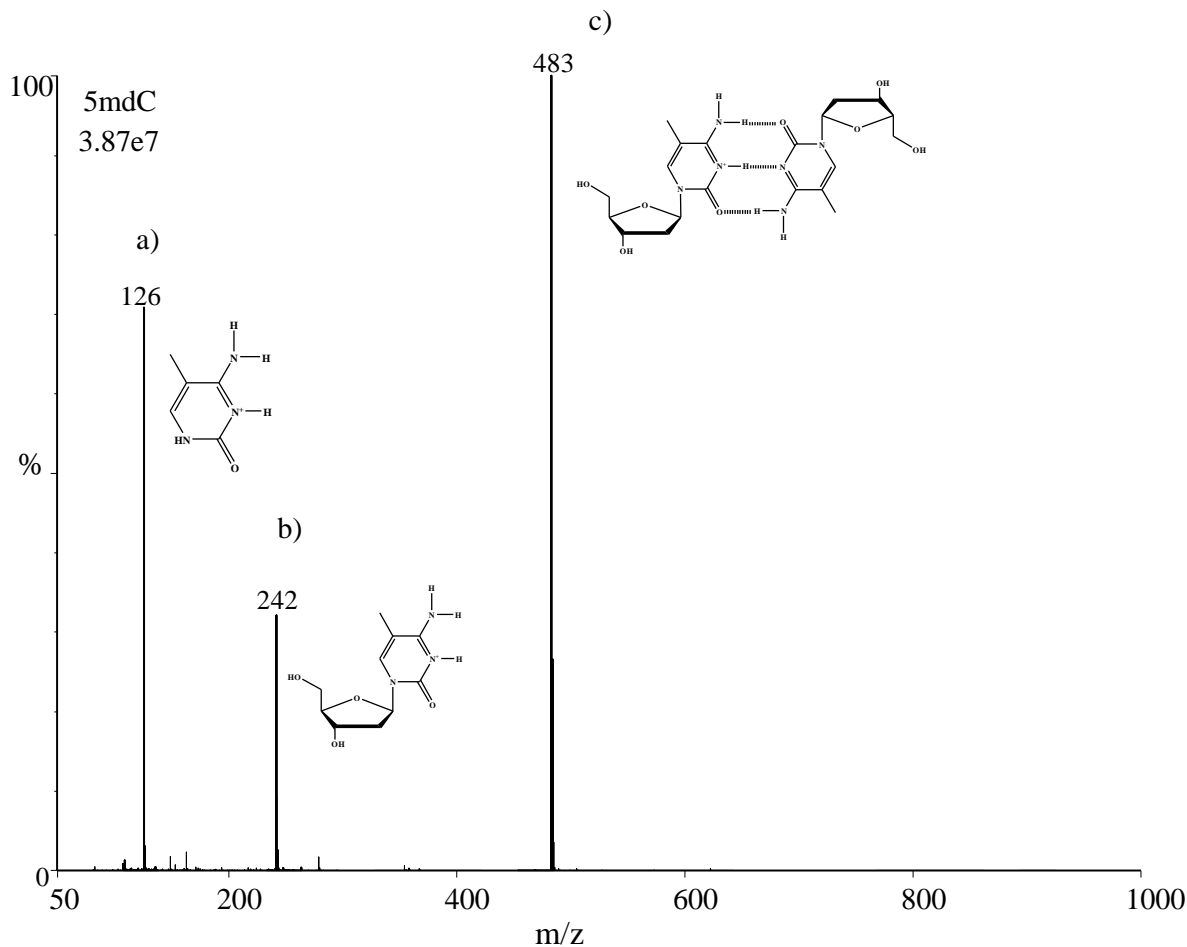


Figura 8. Espectro de masas de 5mdC, a) ion molecular protonado $[M+H]^+$, b) ion molecular fragmentado $[M\text{-desxorribosa}]^+$ y c) dimero iónico $[2M+H]^+$

Las condiciones cromatográficas establecidas para evaluar los parámetros de detección fueron las siguientes: la separación se llevó a cabo a 40 °C, con un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizando la columna cromatográfica UPLC Luna® Omega C18 100 Å, 1.6 μm (150 x 2.1 mm, Phenomenex), empleando formiato de amonio 10 mM pH 4 (A) y metanol (B) como fase móvil, con el siguiente gradiente de elución: 0 a 3 min 5% B, 3 a 7.5 min 20 % B y 7.5 a 10 min 5% B, en un tiempo de separación de 15 minutos. Con estas condiciones de separación se obtuvieron los tiempos de retención de 6.0 min, 6.3 min y 8.4 min para los nucleósidos de interés dC, 5hmdC y 5mdC, respectivamente (**Figura 9**).

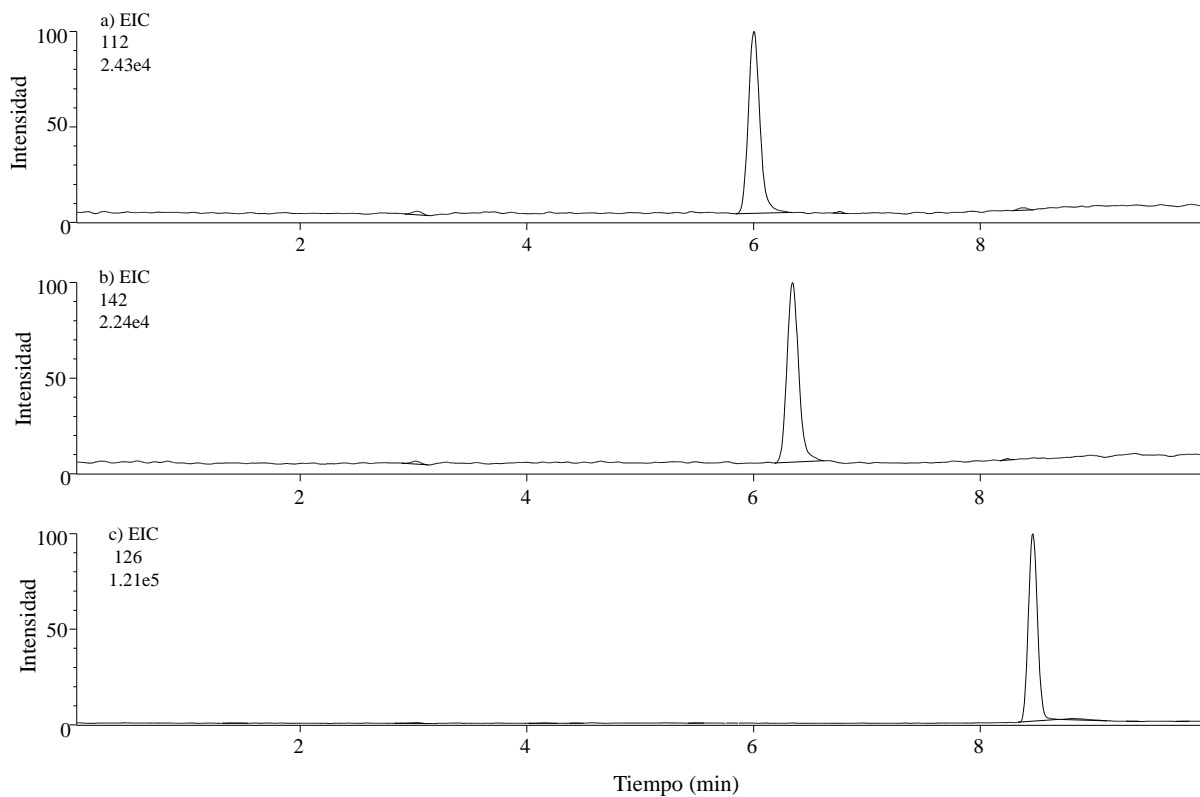


Figura 9. Cromatogramas UPLC-MS correspondientes a 1 pmol/ μ L de los nucleósidos de interés inyectado al sistema y separados con las condiciones cromatográficas finales: a) dC, b) 5hmdC y c) 5mdC con los tiempos 6.0 min, 6.3 min y 8.4 min, respectivamente

VI.2. Selección de las condiciones de detección de dC, 5hmdC y 5mdC mediante UPLC-TOFMRM

Para incrementar la relación señal analítica/ruido (sensibilidad) de cada uno de los nucleósidos de interés, se decidió utilizar el Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM). Para esto se evaluó el efecto de las energías de colisión de 12, 13, 14 y 15 eV sobre el ion precursor (correspondiente al dímero iónico $[2M+H]^+$ de dC, 5hmdC y 5mdC) y se monitorearon los iones producto. La mayor intensidad del ion producto se obtuvo a 13 eV para los tres analitos de interés y en la **Figura 10** se muestran los resultados obtenidos para 5hmdC.

Para la producción de iones, la energía mínima que deben llevar corresponderá con el potencial de ionización de la molécula de interés, generalmente se emplean entre 7 y 10 eV. De acuerdo a otros trabajos, esta energía es ligeramente mayor, en comparación la energía de colisión reportada por Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., y Olinski, R. (2014) [25], de 12 eV.

Otro parámetro de operación del espectrómetro de masas que influye sobre la intensidad de la señal analítica es el voltaje de cono, debido a que contribuye al impacto de electrones y con ello proporcionar una adecuada fragmentación de las moléculas de interés [24, 70, 76]. Se exploraron los voltajes de 30, 40 y 50, siendo 40 el voltaje óptimo programado (**Figura 11**). De acuerdo a Yang, I., Fortin, M. C., Richardson, J. R., y Buckley, B. (2011) [108] este parámetro es similar, comparado con el uso de un voltaje de cono de 39. Por otra parte otros procedimientos involucran el uso de voltajes superiores como el descrito por Wang, X., Suo, Y., Yin, R., Shen, H., y Wang, H. (2011) [79] utilizando 90.

Después de fragmentar los iones precursores se observó que los iones producto de mayor intensidad correspondieron a los analitos con la pérdida del azúcar $[M\text{-desoxirribosa}]^+$ por lo que para evaluar la señal ruido en modo MRM se monitorearon las transiciones $455 \rightarrow 112$, $515 \rightarrow 142$ y $483 \rightarrow 126$ para dC, 5hmdC y 5mdC, respectivamente.

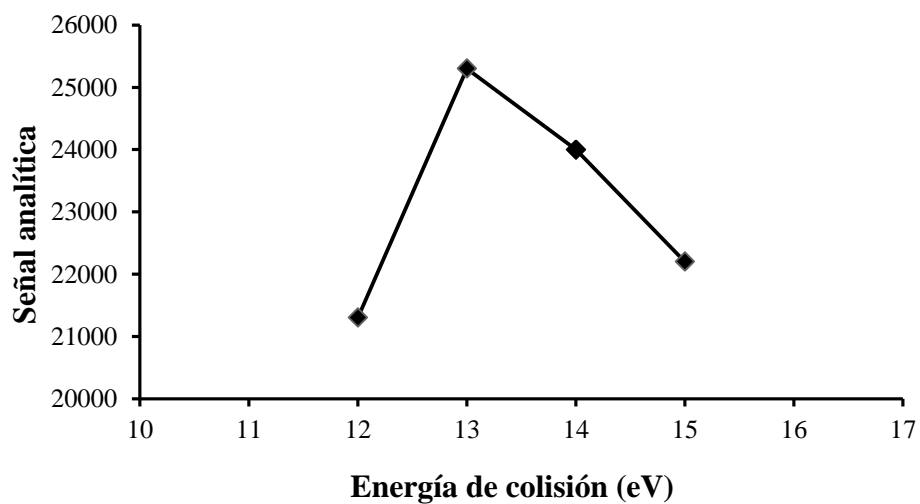


Figura 10. Efecto de la energía de colisión sobre la señal analítica para 5hmdC con energías de: 12 eV (21300), 13 eV (25300), 14 eV (24000) y 15 eV (22200)

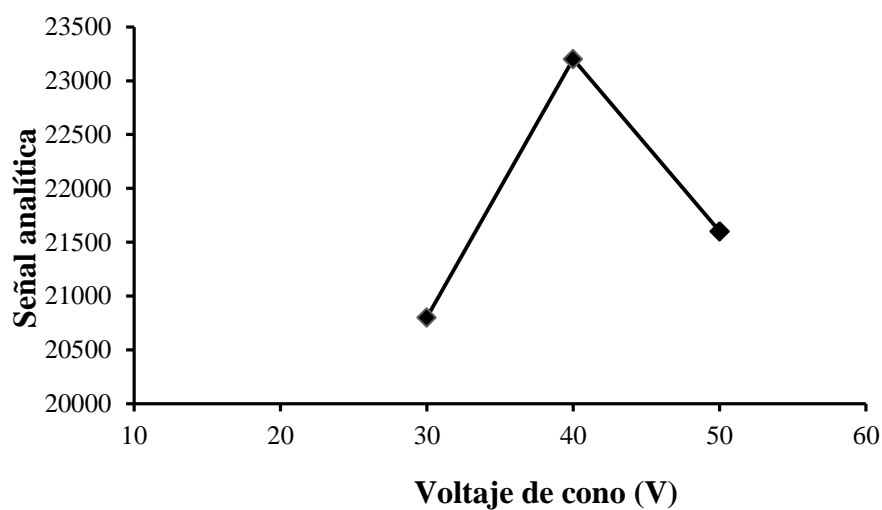


Figura 11. Efecto del voltaje de cono sobre la señal analítica de 5hmdC con voltajes de: 30 V (20800), 40 V (23200) y 50 V (20600)

En la **Figura 12** se muestran los cromatogramas UPLC-TOFMRM obtenidos después de establecer las condiciones de detección en las citidinas (1 pmol/ μ L inyectado en la columna), en los cuales, no se observa el ruido de la línea base, ya que es muy bajo.

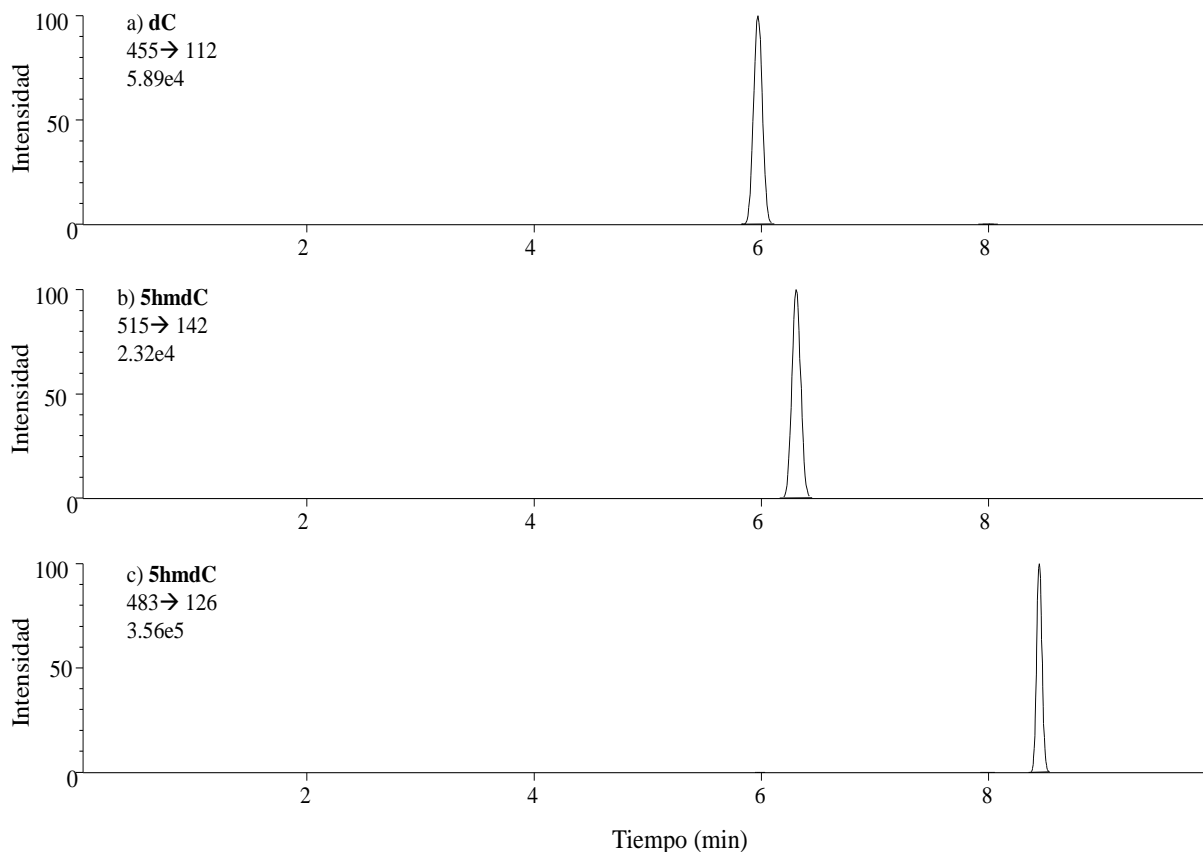


Figura 12. Cromatograma UPLC-TOFMRM correspondientes a 1pmol (inyectado en el sistema) de los nucleósidos de interés con las condiciones de detección optimizadas: a) dC, b) 5hmdC y c) 5mdC

Los parámetros de operación del espectrómetro de masas para determinar dC, 5hmdC y 5mdC fueron los siguientes: ESI en modo positivo con voltaje de capilar 4 kV, voltaje de cono 40 V, temperatura de la fuente 120 °C; y monitoreo de los iones (MRM) empleado para las transiciones 455 \rightarrow 112, 515 \rightarrow 142 y 483 \rightarrow 126 para dC, 5hmdC y 5mdC, respectivamente, utilizando una energía de colisión de 13 eV.

I.3. Procedimiento de calibración de dC, 5hmdC y 5mdC y evaluación de sus parámetros

Para encontrar el **límite de detección (LOD) experimental** (concentración mínima del analito detectable por el método) del procedimiento UPLC-TOFMRM, desarrollado en este trabajo, se prepararon soluciones estándar conteniendo dC, 5hmdC y 5mdC en el intervalo de concentración de 0.1 pmol/ μ L (100 fmol/ μ L) a 1 pmol/ μ L (1000 fmol/ μ L) (**Figura 13**).

El parámetro LOD es de mayor interés para la 5hmdC y 5mdC debido a que se encuentra en una relación molar menor a 0.6 % y 10 % con respecto a la dC, respectivamente. Se determinó que los LOD para 5hmdC y 5mdC fueron de 50 fmol/ μ L y 20 fmol/ μ L, respectivamente, mediante el método basado en el examen visual de la mínima concentración detectable por el equipo.

Además, se calcularon los **LOD teóricos** [107] con los datos de las curvas de calibración. Para ello se utilizó la siguiente ecuación matemática:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 * s}{m} \quad (1)$$

Donde:

s= Desviación estándar de la muestra

m= pendiente de la recta

Asimismo, la desviación estándar (parámetro que da cuenta de la dispersión de los datos obtenidos) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Donde:

x_i = Concentración evaluada

\bar{x} = Promedio de las concentraciones evaluadas

n= Número de concentraciones evaluadas

Al realizar la sustitución de los datos para a) 5hmdC y b) 5mdC se obtuvieron los LOD teóricos, pese a que generalmente la fórmula aplica para $y= mx + b$. La sustitución de los datos fue la siguiente:

a) 5hmdC

Datos:

$\bar{x}= 225$

n=4

Sustituyendo en (2):

$$s = \sqrt{\frac{(150-225)^2 + (290-225)^2 + (250-225)^2 + (300-225)^2}{4-1}}$$

s=64.54

Y así, sustituyendo en (1):

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \cdot 64.54}{4.9696e^{0.0078}}$$

LOD=42.52 fmol/μL

b) 5mdC

Datos:

$$\bar{x}=1.5$$

$$n=5$$

Sustituyendo en (2):

$$s=\sqrt{\frac{(0.5-1.5)^2+(1-1.5)^2+(2.0-1.5)^2+(2.5-1.5)^2+(3.0-1.5)^2}{5-1}}$$

$$s=0.79$$

Y así, sustituyendo en (1):

$$LOD=\frac{3.3*0.79}{10.391^{2.1674}}$$

LOD=0. 01631 pmol/μL= 16.31 fmol/μL
--

Estos valores de LOD eran aproximadamente las expectativas de acuerdo con los reportes de 0.5 fmol/ μL para sistemas de espectrometría de masas con triplecuadrupolo, descritos en trabajos previos por Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., y Olinski, R. (2014) [25], Tang, Y., Xiong, J., Jiang, H., Zheng, S., Feng, Y., y Yuan, B. (2014) [77], y Yang, I., Fortin, M. C., Richardson, J. R., y Buckley, B. (2011) [108]; los cuales tienen la mayor sensibilidad y con la implementación del método propuesto por Alcazar Magana, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., y Wrobel, K. (2016) [106], de **20 fmol/μL a 120 fmol/μL.**

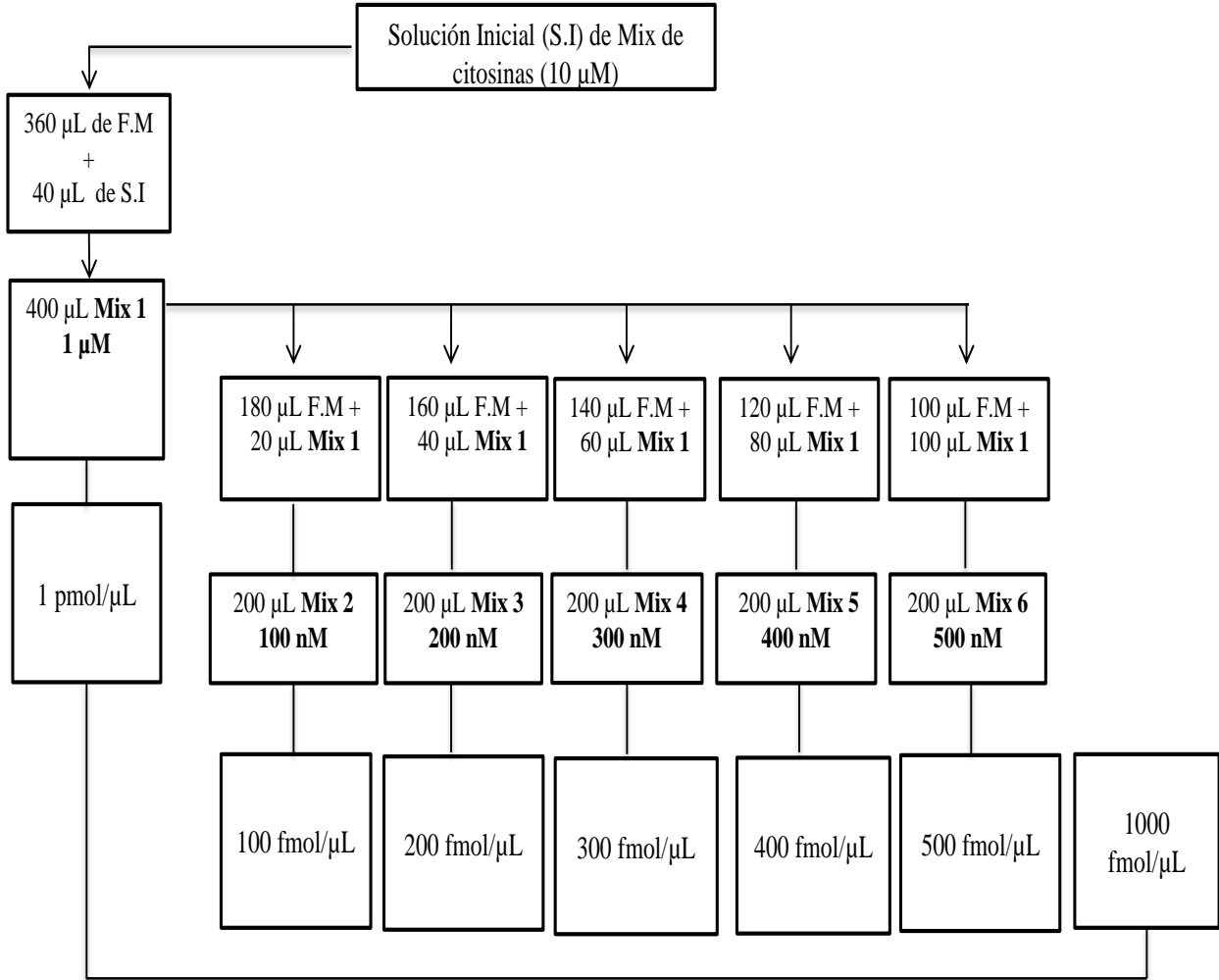


Figura 13. Esquema de preparación de las soluciones de calibración empleadas y la concentración final

Para determinar simultáneamente el grado de metilación e hidroximetilación global del ADN en muestras de tejidos, se elaboraron curvas de calibración en el intervalo de 10000 a 30000 fmol/ μ L (10 a 30 pmol/ μ L), 150 a 300 fmol/ μ L (0.15 a 0.3 pmol/ μ L), 500 a 2500 fmol/ μ L (0.5 a 2.5 pmol/ μ L) para dC, 5hmdC y 5mdC, respectivamente, con el fin de establecer el límite de cuantificación para 5hmdC y 5mdC, a partir de los LOD experimentales hallados.

Al analizar las funciones de regresión obtenidas para cada curva de calibración de los nucleósidos dC, 5hmdC y 5mdC se obtuvieron tendencias no lineales: logarítmica, exponencial y potencial, respectivamente (**Figuras 14-16**), infiriendo que la eficiencia de ionización y sensibilidad es muy diferente en los tres analitos a pesar de la pequeña diferencia estructural.

Para el proceso de calibración de dC se obtuvo la función de regresión logarítmica $S = 182678 \ln(x) - 256188$ (**Figura 14**) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9995$. Para 5hmdC se obtuvo la función de regresión exponencial $S = 4.969e^{0.0078x}$ (**Figura 15**) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9998$ y para 5mdC la función de regresión potencial fue de $10.391x^{2.1674}$ (**Figura 16**) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9999$.

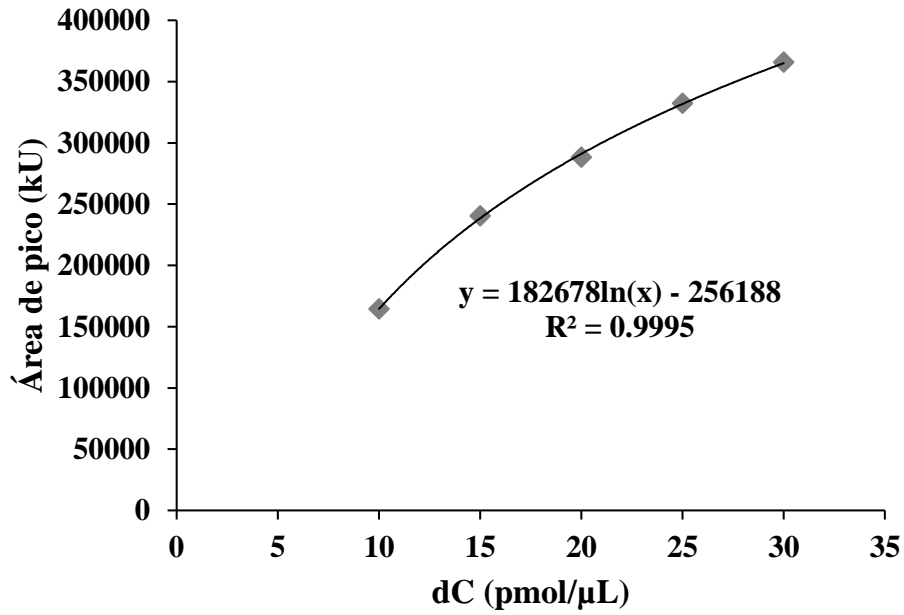


Figura 14. Curva de calibración (en base al área de pico) para dC. Se muestra la función de regresión con tendencia logarítmica y el coeficiente de determinación.

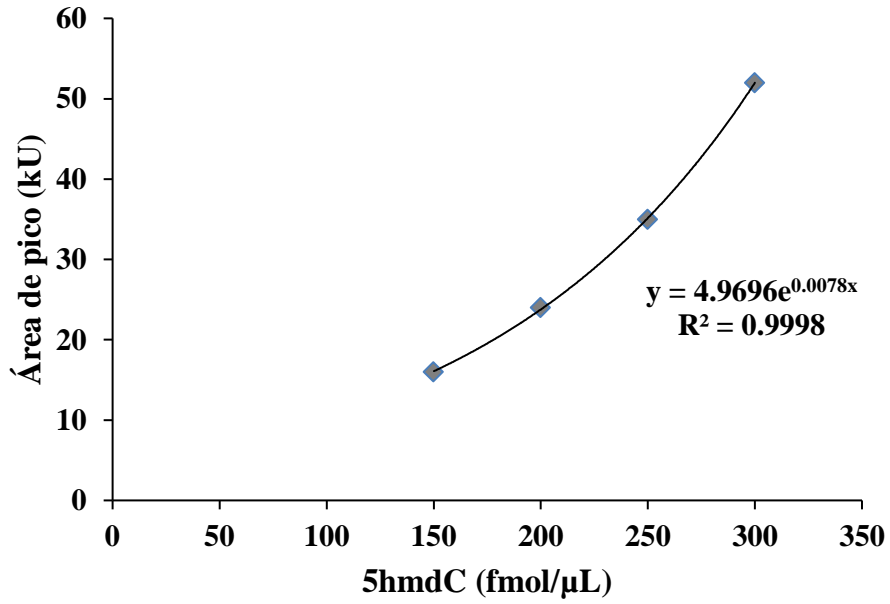


Figura 15. Curva de calibración (en base al área de pico) para 5hmdC. Se muestra la función de regresión con tendencia exponencial y el coeficiente de determinación.

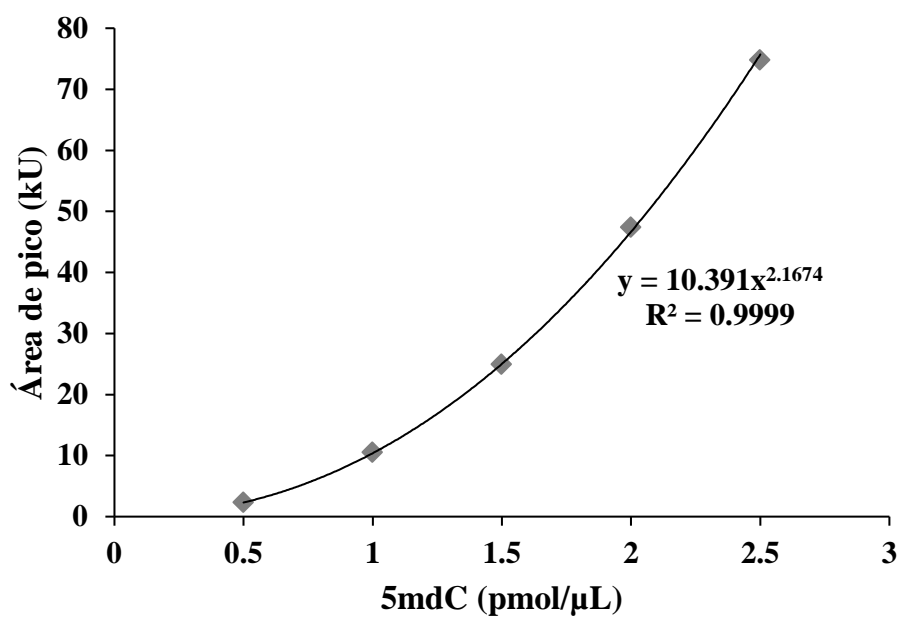


Figura 16. Curva de calibración (en base al área de pico) para 5mdC. Se muestra la función de regresión potencial y el coeficiente de determinación.

VI.3. Determinación del grado de metilación e hidroximetilación global en ADN muestras biológicas por UPLC-TOFMRM

Las muestras de ADN hidrolizadas (aproximadamente 1 µg de ADN total en un volumen final de 65 µL) fueron diluidas con 100 µL de una solución 95:5 fase móvil A:fase móvil B. 1 µL de cada una de las muestras fue inyectado al sistema cromatográfico utilizando las condiciones UPLC-TOFMRM desarrolladas en este trabajo. Al introducir las muestras en el sistema cromatográfico no se pudo observar la 5hmdC por lo que se inyectó mayor volumen de muestra (el sistema UPLC permite hasta 10 µL).

Los volúmenes de inyección de 5 µL permitieron observar a 5hmdC en tejido de SNC (el tejido con mayor proporción de 5hmdC), pero no permitió cuantificarla por estar cerca del LOD, además, este volumen saturó la columna con dC, provocando la deformación del pico e impidiendo su cuantificación. Por lo anterior, se procedió a determinar solamente el grado de metilación global en el ADN de las muestras.

Los datos de las cuantificaciones de 5mdC en tejidos, fueron expresados en función del promedio de sus magnitudes con sus respectivas desviaciones estándar, y se reportan en la **Tabla 4**. Como se puede apreciar en dicha tabla, los resultados muestran una tendencia en la disminución de la metilación global del ADN en tejidos expuestos a bórax. Para establecer la existencia de una diferencia significativa entre los datos de cuantificación de 5mdC de los tejidos de referencia y los expuestos a bórax, se realizó un análisis estadístico utilizando un ANOVA de dos vías usando el programa Minitab 17. El análisis estadístico de los resultados de los experimento se llevó a cabo con una confiabilidad del 95%, considerando como factores la exposición a bórax y el tipo de órgano del que se extrajo la muestra (SNC, corazón, hígado y páncreas).

El análisis reveló que la disminución del grado de metilación global del ADN sólo es significativa ($p < 0.05$) en el tejido pancreático expuesto a bórax y se indica en la **Figura 17** con un asterisco (*). Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas, las barras de error representan la desviación estándar del experimento. El coeficiente de correlación R^2 tuvo un porcentaje cercano al 100% (97.97 %), lo que indicó que el diseño del experimento explicó el mayor porcentaje de variabilidad. Posteriormente se realizó un análisis post hoc Tukey con una confiabilidad del 95%, evaluando la medias para cada muestra. Este análisis de comparaciones de medias determinó que el efecto en la variable de respuesta (porcentaje de metilación global) es mayor en el páncreas a diferencia del SNC, corazón e hígado, de acuerdo a las familias que no son compartidas en los tejidos con y sin exposición a bórax (datos no mostrados).

En la **Figura 18** se muestran los cromatogramas UPLC-TOFMRM representativos obtenidos de tejido pancreático de ratones expuestos o no al bórax, y se puede observar la señal analítica nítida de dC y 5mdC sin interferencias y línea base bien definida.

Estos resultados indican que el bórax tiene un efecto sobre el grado de metilación global en ADN y puede estar implicado en eventos epigenéticos. Se necesitan establecer las concentraciones óptimas de este compuesto, para potenciar su efecto sobre la metilación global del ADN e investigar su relación con otras modificaciones a nivel epigenético y asimismo, la regulación de otras biomoléculas de interés como enzimas involucradas en el metabolismo celular.

Se ha observado que otros compuestos como el ácido fólico, cofactor del desarrollo embrionario [109], ácidos grasos *cis* poli-insaturados (omegas), que son benéficos para la salud [110, 111, 112] y fármacos utilizados en la terapia antineoplásica, tienden a disminuir ligeramente el grado de metilación global del ADN, por lo que el bórax podría tener un efecto benéfico similar, sobre la inhibición de líneas celulares de cáncer, como se ha investigado en trabajos recientes con cáncer hepático [100, 101, 113]. Se destaca la importancia de investigar el efecto de este compuesto sobre la inhibición de otras líneas celulares de cáncer, por su posible acción preventiva y terapéutica sobre la proliferación de otros tipos de neoplasias.

Tabla 4. Tabla del efecto del bórax sobre el porcentaje de metilación global en ADN

Muestra	Control (% 5mdC ±DE)	Bórax (% 5mdC ±DE)
Tejido de SNC	6.70±0.09	6.45±0.12
Corazón	4.78±0.10	4.57±0.41
Hígado	7.46±0.16	6.60±0.35
Páncreas	9.88±0.51	8.53±0.39

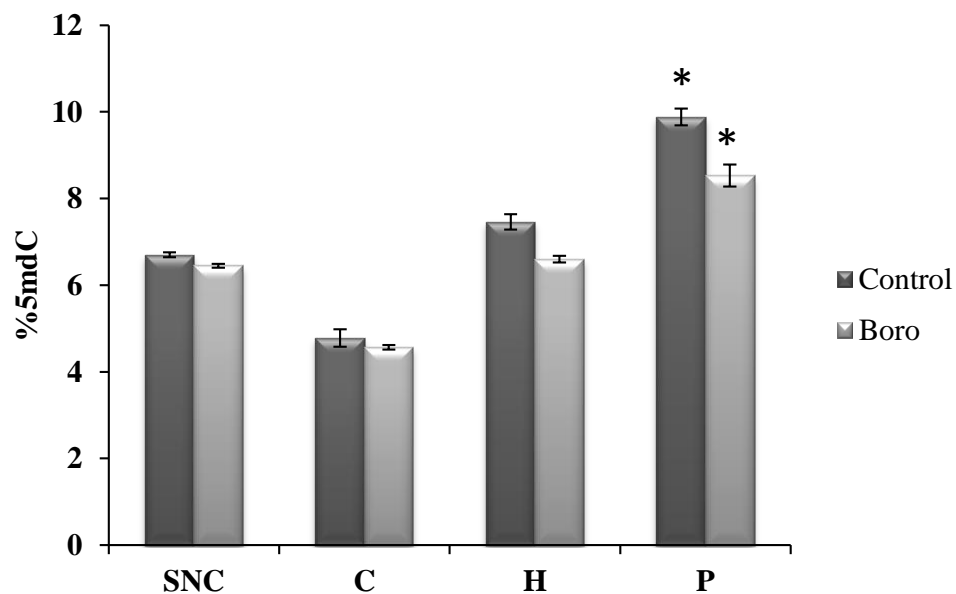


Figura 17. Relación del porcentaje de metilación en el ADN del grupo control y de exposición a bórax en tejidos de sistema nervioso central (SNC), corazón (C), hígado (H) y páncreas (P). Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas, las barras de error representan la desviación estándar del experimento.

* Representa un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

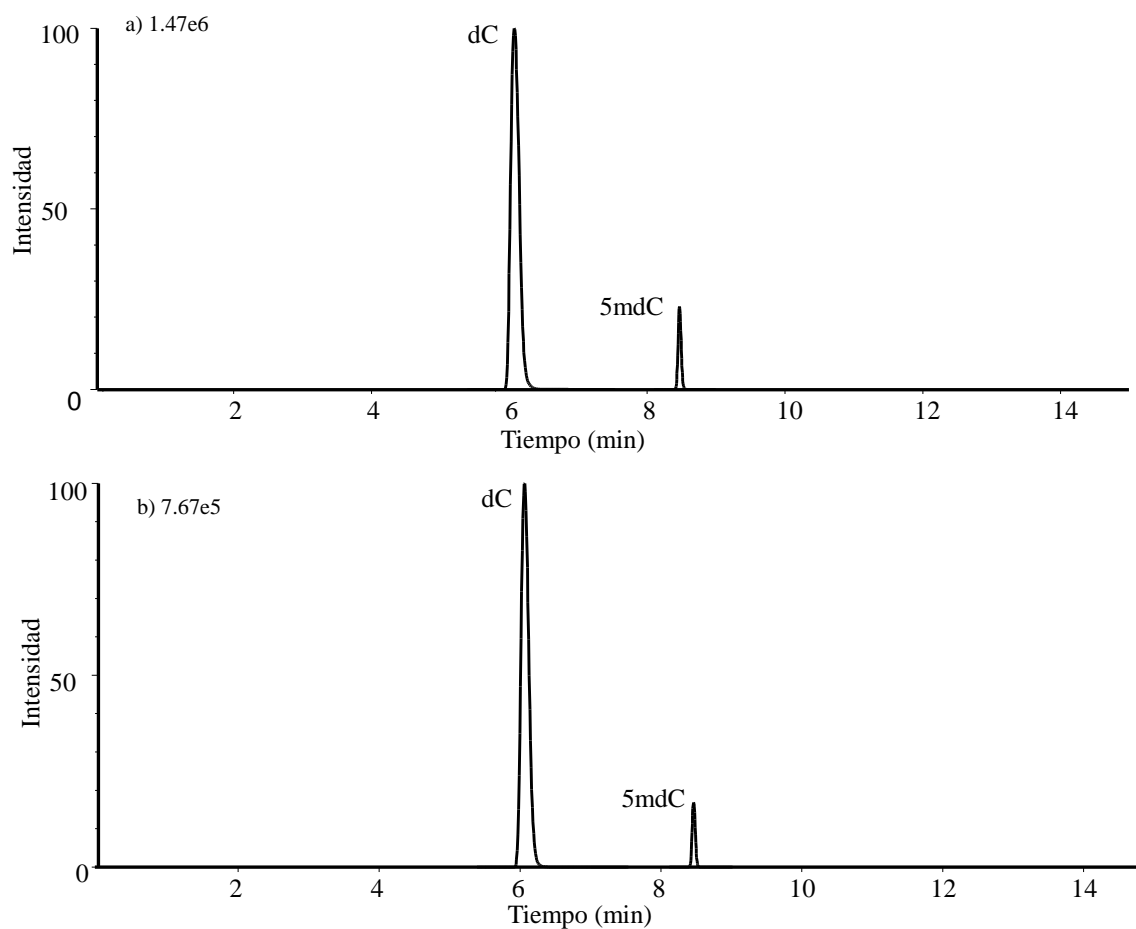


Figura 18. Cromatogramas UPLC-TOFMRM representativos correspondientes tejido pancreático: a) expuesto a bórax y b) de referencia (control)

VII. CONCLUSIONES

Se desarrolló un procedimiento UPLC-TOFMRM para la determinación de dC, 5hmdC y 5mdC. Las condiciones de separación y detección permitieron lograr los LOD de 50fmol/ μ L y 20 fmol/ μ L para 5hmdC y 5mdC, respectivamente. El procedimiento permitió determinar el grado de metilación global en ADN en tejidos de ratón de la cepa Balb/c sin y con exposición a bórax vía oral, pero no permitió determinar de manera simultánea 5mdC y 5hmdC debido a que no se alcanzó suficiente sensibilidad sin saturar la columna cromatográfica.

La aplicación del procedimiento UPLC-TOFMRM permitió encontrar una tendencia en la disminución del grado de metilación global del ADN en todos los tejidos expuestos a bórax y una diferencia significativa en tejido pancreático. Por tanto, se consiguió comprobar el impacto del bórax sobre los patrones de metilación global del ADN.

Se reporta por primera vez que el bórax tiene efectos epigenéticos, los cuales son similares al de algunos fármacos con actividad antineoplásica, que contribuyen a la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer, y a algunas biomoléculas benéficas que regulan el ciclo celular y el desarrollo embrionario, tales como el ácido fólico, el complejo B y ácidos grasos cis poli-insaturados (omegas), que participan en el metabolismo celular.

VIII. PERSPECTIVAS

Evaluar otras condiciones de tratamiento de muestra, separación por UPLC y detección por espectrometría de masas (Q-TOF) para establecer un procedimiento que permita determinar los analitos 5mdC y 5hmdC de manera simultánea en ADN de muestras biológicas y establecer el efecto del bórax sobre estos dos bioindicadores.

En base a los resultados obtenidos, específicamente en tejido pancreático, se plantea la necesidad de investigaciones a nivel epigenético sobre este importante órgano, que relacionen el uso de compuestos de boro sobre la metilación global del ADN, con el fin de potenciar o regular la actividad transcripcional de biomoléculas de interés, ya que el páncreas es uno de los órganos que regula la secreción de diversas enzimas, debido a su acción exócrina, tales como enzimas digestivas y contribuye a la regulación endócrina de hormonas como insulina y glucagón.

Realizar estudios moleculares, metabolómicos y proteómicos, para establecer los mecanismos del efecto benéfico del bórax en sistemas biológicos.

Explorar el efecto del bórax sobre el grado de metilación global en ADN de líneas celulares de cáncer.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., y Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 23(7), 781-783.
2. Mazzi, E. A., y Soliman, K. F. (2012). Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*, 7(2), 119-130.
3. Bernstein, B.E., Meissner, A., y Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), 669-681.
4. Weinhold, B. (2006). Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*, 114(3), 160-167.
5. Ellis, L., Atadja, P. W., y Johnstone, R.W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*, 8(6), 1409-1420.
6. Rodenhiser, D., y Mann, M. (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 174(3), 341-348.
7. Lai, W. K., y Pugh, B. F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-15
8. Muller, M. M., y Muir, T. W. (2015). Histones: At the Crossroads of Peptide and Protein Chemistry. *Chemical Reviews*, 115(6), 2296-2349.
9. Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*, 46, 931-954.
10. Vaissière, T., Sawan, C., y Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1), 40-48.
11. Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
12. Bannister, A. J., y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
13. Oki, M., Aihara, H., y Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases, in *Chromatin and Disease*. Springer, (14), 323-340.
14. Zentner, G. E., y Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), 259-266.
15. Xhemalce, B., Dawson, M. A., y Bannister, A. J. (2011). Histone modifications. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, 1-45.
16. Whetstine, J. R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., y Colaiacovo, M. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, 125(3), 467-481.

17. He, X. J., Chen, T. y Zhu, J. K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell research*, 21(3), 442-465.
18. Sutherland, J.E., y Costa, M. (2003). Epigenetics and the environment. *Ann N Y Acad Sci*, 983, 151-160.
19. Marrero, M. T. (2010). Metilación y expresión de genes en el cáncer diferenciado de tiroides. *Revista Cubana de Endocrinología*, 21, 340-350.
20. Kile, M. L., Baccarelli, A., Tarantini, L., Hoffman, E., Wright, R. O., Christiani, D. C. (2010). Correlation of global and gene-specific DNA methylation in maternal-infant pairs. *PloS one*, 5(10), 1-9.
21. Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484-92.
22. Baylin, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2(1), 4-11.
23. Godderis, L., Schouteden, C., Tabish, A., Poels, K., Hoet, P., Baccarelli, A. A., y Van Landuyt, K. (2015). Global methylation and hydroxymethylation in DNA from blood and saliva in healthy volunteers. *BioMed research international*, 1-8.
24. Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Bruckl, T., Biel, M., y Carell, T. (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*, 5(12), 1-9.
25. Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., y Olinski, R. (2014). Comparison of the absolute level of epigenetic marks 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine, and 5-hydroxymethyluracil between human leukocytes and sperm. *Biol Reprod*, 91(3):55, 1-5.
26. Torres, L. A. (2014). *Estudio Analítico de las Modificaciones de Ácidos Nucleicos* (Tesis doctoral). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
27. Dahl, C., Gronbaek, K., y Guldberg, P. (2011). Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta*, 412(11-12), 831-836.
28. Le, T., Kim, K. P., Fan, G., y Faull, K. F. (2011). A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Anal Biochem*, 412(2), 203-239.
29. Mesa, V. M., Barros, P., y Medina, C. (2006). Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gaceta médica de México*, 142, 81-82.
30. Quiala, E., Valledor, L., Hazbun, R., Barbón, R., de Feria, M., y Chávez, M. (2008). Estandarización de un protocolo de obtención de ADN genómico para la cuantificación de 5mC en brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L, *ibp*, 8(1), 51-56.
31. Santoyo, M. M., Flores, C. R., Torres, L. A., Wrobel, K., y Wrobel, K. (2011). Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. *Environ Pollut*, 159(10), 2387-2392.

32. Laird, P.W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191-203.
33. Pomraning, K.R., Smith, K. M., y Freitag, M. (2009). Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods*, 47(3), 142-150.
34. Laird, P.W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 253-266.
35. Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35), 5483-5495.
36. Kawai, J., Hirotsune, S., Hirose, K., Fushiki, S., Watanabe, S., y Hayashizaki, Y. (1993). Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic acids research*, 21(24), 5604-5608.
37. Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., Shu, J., Chen, X., Waterland, R. A., y Issa, J. J. (2007). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS genetics*, 3(10), 2023-2036.
38. Yan, P. S., Perry, M. R., Laux, D. E., Asare, A. L., Caldwell, C. W., y Huang, T. M. (2000). CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1432-1438.
39. Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W. Farnham, P. J., Huang, T. H., y Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Current Biology*, 13(10), 882-886.
40. Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., y Webster, M. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, 41(2), 178-186.
41. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D. Zhang, L., Schroth, G. P., y Gunderson, K. L. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-295.
42. Rauch, T., Wang, Z., Zhang, X., Zhong, X., Wu, X., Lau, S. K., Kernstine, K. H., Riggs, A. D., y Pfeifer, G. P. (2007). Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5527-5532.
43. Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, y J. F., Bueno, R. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*, 5(8), 1-13.

44. Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., Ploumakis, A., Ghesquière, B., Van Dyck, L., Boeckx, B., y Schoonjans, L. (2016). Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*, 537(7618), 63-68.
45. Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D., y Roloff, T. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation (medip). *DNA methylation: methods and protocols*, 55-64.
46. Down, T. A., Rakyan, V. K., Turner, D. J., Flicek, P., Li, H., Kulesha, E., Graef, S. Johnson, N., Herrero, J., y Tomazou, E. M. (2008). A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nature biotechnology*, 26(7), 779-785.
47. Jacinto, F. V., Ballestar, E., Ropero, S., y Esteller, M. (2007). Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer research*, 67(24), 11481-11486.
48. Ruike, Y., Imanaka, Y., Sato, F., Shimizu, K., y Tsujimoto, G. (2010). Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC genomics*, 11(1), 1-11.
49. Zilberman, D. y Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 134(22), 3959-3965.
50. Gonzalez, L., Freije, J., Cal, S., Lopez-Otin, C., Serrano, M., y Palmero, I. (2006). A functional link between the tumour suppressors ARF and p33ING1. *Oncogene*, 25(37), 5173-5179.
51. Figueroa, M.E., Melnick, A., y Grealley, J. M. (2009). Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Leukemia: Methods and Protocols*, 395-407.
52. Rauch, T.A., y Pfeifer, G. P. (2010). DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods*, 52(3), 213-217.
53. Wu, J., Liang, X., Wu, Y., Li, F., y Dai, Y. (2013). Identification of DNA methylation of SOX9 in cervical cancer using methylated-CpG island recovery assay. *Oncology reports*, 29(1), 125-132.
54. Frommer, M., McDonald, L., Millar, D., Collis, C., Watt, F., Grigg, G., Molloy, P., y Paul, C. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827-1831.
55. Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H., y Razin, A. (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes & development*, 6(5), 705-714.
56. Liang, G., Gonzalgo, M., Salem, C., y Jones, P. (2002). Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*, 27(2), 150-155.

57. Chango, A., Abdennebi-Najar, L., Tessier, F., Ferré, S., Do, S., Guéant, J. Nicolas, J., y Willequet, F. (2006). Quantitative methylation-sensitive arbitrarily primed PCR method to determine differential genomic DNA methylation in Down Syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(2), 492-496.
58. Yang, A., Estécio, M., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E., y Issa, J. (2004). A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research*, 32(3), 2-6.
59. Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Cantor, M., Kirkner, G. J., Spiegelman, D., Makrigiorgos, G. M., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., y Loda, M. (2006). Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *The Journal of molecular diagnostics*, 8(2), 209-217.
60. Licchesi, J. D. y Herman, J. G. (2009). Methylation-specific PCR. *DNA Methylation: Methods and Protocols*, 305-323.
61. Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., y Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9821-9826.
62. Ku, J. L., Jeon, Y. K., y Park, J. G. Methylation-specific PCR. *Epigenetics Protocols*, 23-32.
63. Tost, J., y Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols*, 2(9), 2265-2275.
64. Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, L., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., Byun, H., Jiang, J., Marinelli, B., Pesatori, y A. C. (2007). Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer research*, 67(3), 876-880.
65. Wang, D., Yan, L., Hu, Q., Sucheston, L., Higgins, M. J., Ambrosone, C. B., Johnson, C. S., Smiraglia, D. J., y Liu, S. (2012). IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. *Bioinformatics*, 28(5), 729-730.
66. Zhang, L., Zhang, L., Zhou, K., Ye, X., Zhang, J., Xie, A., Chen, L., Kang, J. X., y Cai, C. (2012). Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of biomolecular screening*, 17(7), 877-884.
67. Tang, Y., Zheng, S., Qi, C., Feng, Y., y Yuan, B. (2015). Sensitive and simultaneous determination of 5-methylcytosine and its oxidation products in genomic DNA by chemical derivatization coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Chem*, 87(6), 3445-3452.
68. Rossella, F., Polledri, E., Bollati, V., Baccarelli, A., y Fustinoni, S. (2009). Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(17), 2637-2646.

69. Kraus, A. M., Park, Y. J., Plass, C., y Schmeiser, H. H. (2011). Determination of genomic 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human DNA by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence. *Epigenetics*, 6(5), 560-565.
70. Chen, M. L., Shen, F., Huang, W., Qi, J. H., Wang, Y., Feng, Y. Q., Liu, S. M., y Yuan, B. F. (2013). Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. *Clin Chem*, 59(5), 824-32.
71. Huang, D., Yang, Q., Jin, S., Deng, Q., y Zhou, P. (2014). Determination of global DNA methylation level by capillary electrophoresis using octyl-modified quaternized cellulose as an electrolyte additive. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(12), 2771-2777.
72. Wang, X., Song, Y., Song, M., Wang, Z., Li, T., y Wang, H. (2009). Fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay for the sensitive detection of genomic DNA methylation. *Analytical chemistry*, 81(19), 7885-7891.
73. Stach, D., Schmitz, O. J., Stilgenbauer, S., Benner, A., Döhner, H., Wiessler, M., y Lyko, F. (2003). Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 1-6.
74. San Romerio, A., Fiorillo, G., Terruzzi, I. Senesi, P., Testolin, G., y Battezzati, A. (2005). Measurement of DNA methylation using stable isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 336(2), 158-163.
75. Torres, A. L., Barrientos, E. Y., Wrobel, K., y Wrobel, K. (2011). Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Anal Chem*, 83(20), 7999-8005.
76. Tsuji, M., Matsunaga, H., Jinno, D., Tsukamoto, H., Suzuki, N., y Tomioka, Y. (2014). A validated quantitative liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry method for monitoring isotopologues to evaluate global modified cytosine ratios in genomic DNA. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 953-954, 38-47.
77. Tang, Y., Xiong, J., Jiang, H., Zheng, S., Feng, Y., y Yuan, B. (2014). Determination of oxidation products of 5-methylcytosine in plants by chemical derivatization coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis. *Analytical chemistry*, 86(15), 7764-7772.
78. Sandhu, J., Kaur, B., Armstrong, C., Talbot, C., Steward, W., Farmer, P. B., Singh, R. (2009). Determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA using high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 877(20), 1957-1961.
79. Wang, X., Suo, Y., Yin, R., Shen, H., y Wang, H. (2011). Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms. *Journal of Chromatography B*, 879(19), 1647-1652.

80. Radpour, R., Kohler, C., Haghghi, M.M., Fan, A., Holzgreve, W., y Zhong, X.Y. (2009). Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array. *Oncogene*, 28(33), 2969-2978.
81. Bellido, M. L., Radpour, R. Lapaire, O., Bie, I. D., Hösl, I., Bitzer, J., Hmadcha, A., Zhong, X. Y., y Holzgreve, W. (2010). MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biology of reproduction*, 82(4), 745-750.
82. Chen, M. L., Shen, F., Huang, W., Qi, J. H., Wang, Y., Feng, Y. Q., Liu, S. M., y Yuan, B. F. Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 59(5), 824-832.
83. Fic, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S., y Reik, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 473(7347), 398-402.
84. Rozman, J. Z., Pohar Perme, M., Jez, M., Malicev, E., Krasna, M., Vrtovec, B., y Rozman, P. DNA Methylation and Hydroxymethylation Profile of CD34+-Enriched Cell Products Intended for Autologous CD34+ Cell Transplantation. *DNA and Cell Biology*, 1-10.
85. Marçais, A., Waast, L., Bruneau, J., Hanssens, K., Asnafi, V., Gaulard, P., Suarez, F., Dubreuil, P., Gessain, A., y Hermine, O. (2017). Adult T cell leukemia aggressiveness correlates with loss of both 5-hydroxymethylcytosine and TET2 expression. *Oncotarget*, 8(32), 52256-52258.
86. Nielsen, F.H. (2014). Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 383-387.
87. Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., Baspinar, N., Basoglu, A., y Nielsen, F. H. (2013). Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(2), 148-153.
88. Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M., y Daneshpour, M. S. (2011). Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 25(1), 54-58.
89. Pizzorno, L. (2015). Nothing boring about boron. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 14(4), 35-48.
90. Nielsen, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition reviews*, 66(4), 183-191.
91. Lavery, K., Swain, P., Falb, D., y Alaoui-Ismaili, M. H. (2008). BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20948-20958.

92. Wimmer, M. A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühling, K. H., y Goldbach, H. E. (2009). Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1292-1304.
93. Nielsen, F. H., y Stoecker, B. J. (2009). Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 23(3), 195-203.
94. Nielsen, F.H. (2009). Boron deprivation decreases liver S-adenosylmethionine and spermidine and increases plasma homocysteine and cysteine in rats. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 23(3), 204-213.
95. Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., y Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 24(3), 161-164.
96. Uram, Ł., Nizioł, J., Maj, P., Sobich, J., Rode, W., y Ruman, T. (2017). N (4)-[B-(4, 4, 5, 5-tetramethyl-1, 3, 2-dioxaborolan) methyl]-2'-deoxycytidine as a potential boron delivery agent with respect to glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 749-755.
97. Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F., y Dousset, B. (2000). Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 14(3), 168-173.
98. Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H., y Guglielmotti, M. B. (2008). A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Archives of oral biology*, 53(7), 677-682.
99. Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., Kou, D., Shen, Y., Cheng, X., y Rompis, F. A. (2011). Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological trace element research*, 144(1-3), 306-315.
100. Wei, Y., Yuan, F. J., Zhou, W. B., Wu, L., Chen, L., Wang, J. J., y Zhang, Y.S. (2016). Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax. *Genet Mol Res*. 10, 1-10.
101. Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A., y Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological trace element research*, 122(3), 197-205.
102. Üstündağ, A., Behm, C., Föllmann, W., Duydu, Y., y Degen, G. H. (2014). Protective effect of boric acid on lead-and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of toxicology*, 88(6), 1281-1289.
103. Nielsen, F.H. (2009). Boron deprivation decreases liver S-adenosylmethionine and spermidine and increases plasma homocysteine and cysteine in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 23(3), 204-213.

104. Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E., y Macedo, A. M. (1999). Species specific detection of Trypanosomacruzi and Trypanosomarangeli in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica*, 72(2), 203-212.
105. Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Mittelsten Scheid, O., y Jonak, C. (2008). Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 375(2), 354-360.
106. Alcazar Magana, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R., y Wrobel, K. (2016). Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(1), 209-220.
107. Long, G. L., y Winefordner, J. D. (1983). Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55(7), A: 712-724.
108. Yang, I., Fortin, M. C., Richardson, J. R., y Buckley, B. (2011). Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. *Analytical biochemistry*, 409(1), 138-143.
109. Duthie, S.J. (2011). Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(1), 101-109.
110. Andreeva, V. A., Touvier, M., Kesse-Guyot, E., Julia, C., Galan, P., y Hercberg, S. (2012). B vitamin and/or ω -3 fatty acid supplementation and cancer: ancillary findings from the supplementation with folate, vitamins B6 and B12, and/or omega-3 fatty acids (SU. FOL. OM3) randomized trial. *Archives of internal medicine*, 172(7), 540-547.
111. Howard, T. D., Mathias, R. A., Seeds, M. C., Herrington, D. M., Hixson, J. E., Shimmin, L. C., Hawkins, G. A., Sellers, M., Ainsworth, H. C., y Sergeant, S. (2014). DNA methylation in an enhancer region of the FADS cluster is associated with FADS activity in human liver. *PLoS One*, 9(5).
112. Hoile, S. P., Clarke-Harris, R., Huang, R. C., Calder, P. C., Mori, T. A., Beilin, L. J., Lillycrop, K. A., y Burdge, G. C. (2014). Supplementation with N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids or olive oil in men and women with renal disease induces differential changes in the DNA methylation of FADS2 and ELOVL5 in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 9(10).
113. Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakirdere, S., Aydın, F., y Ataman, O. Y. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental toxicology*, 22(1), 17-25.