

Implementación de Biosensor Gravimétrico para Determinar Metilación del Gen FTO en Muestras de ADN de Sujetos con Obesidad.

P. Arenas-Márquez¹, H. González-Martínez², M. Pérez-Vielma^{1,3}, A. Miliar-García^{1,3*}

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Escuela Superior de Medicina, IPN.

² Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, IPN.

³ Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud. Unidad Santo Tomás, IPN

*angel.miliar@yahoo.mx

Resumen— La metilación del ADN juega un papel importante en la regulación de la transcripción de genes, compactación de la cromatina, la impronta del genoma, y la inactivación del cromosoma X en mamíferos. Actualmente existen objetivos en la investigación epigenética en relación a la obesidad y metilación, ya que se ha asociado a procesos clave del metabolismo, tales como adipogénesis, metabolismo energético, almacenamiento y utilización de lípidos y regulación del apetito, es por ello que el objetivo de este trabajo es desarrollar un método de detección de la metilación del ADN usando un biosensor que emplee como transductor la microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D). Se aplicó este método para detectar la región rs9939609 del gen FTO metilada, empleando también la enzima MspJI, específica para la restricción de sitios metilados. Los resultados indican que es posible detectar ADN metilado y no metilado mediante este biosensor, además muestran que este método es sensible a la metilación del ADN y es apto para la evaluación de enzimas de restricción.

Palabras clave—FTO, Metilación, QCM-D, Obesidad

I. INTRODUCCIÓN

Los principales procesos epigenéticos que podrían influir en el desarrollo de obesidad, debido a su papel en la regulación de la expresión de genes relacionados con ella son la metilación del ADN en sitios CpG y modificaciones de la cadena de aminoácidos terminales de las histonas, como la metilación, acetilación y otras reacciones [1,2].

La metilación del ADN juega un papel importante en la regulación de la transcripción de genes, compactación de la cromatina, la impronta del genoma, y la inactivación del cromosoma X en mamíferos [3].

Actualmente existen objetivos en la investigación epigenética en relación a la obesidad y metilación como la búsqueda de biomarcadores epigenéticos para pronosticar problemas de salud, para entender la relación entre factores ambientales relacionados con obesidad y para estudiar estrategias terapéuticas novedosas [2]. Por el momento se han descrito 130 genes relacionados con la obesidad, se destaca las mutaciones en el gen ALKBH9 o más conocido como FTO (Fat mass and obesity-associated protein) considerado como uno de los determinantes genéticos más fuertes de riesgo de obesidad en seres humanos [3]. Algunos de polimorfismos del gen FTO se han asociado con la masa grasa y la obesidad [4]. Una de estas variantes genéticas

(rs9939609), situada en la región promotora de FTO, se ha relacionado con un mayor riesgo de obesidad, en algunos estudios ha sido claramente demostrada ya que podría participar en el control central de la homeostasis energética, con el aumento del IMC, peso corporal y el aumento de ingesta [5].

La metilación de las islas CpGs se ha asociado a procesos metabólicos clave relacionados con la obesidad, tales como la adipogénesis, el metabolismo energético, el almacenamiento y utilización de lípidos, la inflamación la señalización insulínica y la regulación del apetito [1]. La metilación del ADN es una modificación química de la estructura inducida por grupos de enzimas conocidas como ADN metil transferasas que unen covalentemente un grupo metilo (-CH₃) al carbono 5 de la citosina. Se ha considerado un tema potencial para investigar ya que se ha orientado al diseño de tratamientos tomando en cuenta las características individuales del paciente, al desarrollo de medicamentos contra cáncer, conocimiento de la localización de secuencias en el genoma que están vinculados a enfermedades específicas y al descubrimiento de inhibidores de metilación para tratamientos médicos [3].

Por lo que la detección de la metilación es un punto esencial, existen diferentes métodos de detección como técnicas de biología molecular, estrategias basadas en la electroquímica, en transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET), en la detección óptica, en la fluorescencia, en electroquimioluminiscencia (ECL), en la espectrometría de masas (MS), en nanoporos, Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), basados en inmuno-reconocimiento específico y resonadores de anillo óptico (OFRRs) [6].

En cuanto a empleo de biosensores gravimétricos para este fin existen algunos trabajos al respecto, que aunque son pocas debido a su aplicabilidad abren un amplio camino a la investigación [7]. Los Biosensores de ADN, también conocidos como genosensores, se basan en la inmovilización de una hebra sencilla de ADN (ssADN), conocido como ligando, sobre el elemento de transducción para la detección de su secuencia de ADN complementaria por hibridación (analito). Esta hibridación ocurre directamente en la superficie del transductor, por lo que, el ligando de ssADN se considera parte del biosensor [8].

La Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM en inglés) es un biosensor gravimétrico que mide la masa mediante los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico al ser perturbado por la adición de una pequeña masa tal como

un virus o cualquier otro objeto minúsculo que se pretenda medir. La medida de frecuencias se hace con gran precisión de forma sencilla, por tanto, es fácil medir masas pequeñas. La correlación entre la masa y la frecuencia se obtiene por medio de la ecuación de Sauerbrey [9]. De esta manera, el cambio de masa obtenido por la interacción entre el biorreceptor inmovilizado sobre el sustrato de cuarzo con la muestra bajo estudio, proporciona una señal cuantificable, que permite tener una medida de la cantidad de analito presente en la muestra [10].

Además de medir la frecuencia, también se suele medir la disipación (QCM-D) la cual arroja información sobre la naturaleza del material. La fabricación de un biosensor basado en QCM-D consiste en la incorporación de una monocapa orgánica con grupo terminal activo (i.e. grupo amino) depositada sobre los electrodos de oro, tal que sea posible el anclaje covalente de las biomoléculas de interés. [10]

En enero de 2015 nuestro grupo de investigación registró un trabajo donde el propósito fue diseñar, implementar y caracterizar una química de superficies, específica para el anclaje covalente de ADN humano, sin modificación química alguna, sobre sustratos de oro. Este nuevo procedimiento con QCM, permitió el anclaje covalente directamente de ADN obtenido a partir de sangre humana sin modificaciones químicas [11].

Es por ello que en éste trabajo se tiene como objetivo emplear dicha funcionalización para desarrollar un biosensor gravimétrico que permita la determinación de la metilación del gen FTO amplificado a partir de muestras sanguíneas.

II. METODOLOGÍA

En una primera etapa se obtuvo el ligando; para este fin se realizó la extracción de ADN, posteriormente se trató con la técnica de bisulfito la cual convierte todas las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que conserva las citosinas metiladas. Una vez teniendo la muestra de ADN tratada con bisulfito se prosiguió a amplificar la región (rs9939609) del gen FTO, mediante PCR punto final. Al finalizar las muestras fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, el peso esperado para los productos es de 101pb después se purificaron y se cuantificó su concentración. Por último se obtuvo una muestra de ADN metilado con una concentración de 3.5 ng/ml.

Para el ensayo de determinación de la metilación mediante la QCM-D, se utilizaron 3 cuarzos de QCM con recubrimiento de oro. Los cuales se funcionalizaron con 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) por 48hrs enjuagados con agua MiliQ y secados con N² se colocaron en 3 de los 4 módulos de la QCM-D, seguido se inyectó Agua Mili Q a los 3 módulos por 2 hrs con la finalidad de estabilizar la frecuencia (Δf) y disipación (ΔD) posterior a las 2hrs se dejó fluir Agua MiliQ al módulo 1 (Control), muestra no metilada a una concentración de 3.5ng/ μ L al módulo 2 (No metilado) y la región (rs9939609) del gen FTO a una concentración de

3.5ng/ μ l al módulo 3 (Metilado), las muestras se dejaron por 24hrs (ligando), seguidamente se inyectó Agua MiliQ al módulo 1 (Control) y enzima de restricción MspJI al módulo 2 y 3, por 16hrs. Por último se dejó fluir agua MiliQ por 30 min con el propósito de eliminar la muestra sobrante y estabilizar la frecuencia y disipación. La medición de la señal fue continua por las 43hrs con el software Qtools de Biolin Scientific.

III. RESULTADOS

Se presentan los resultados del estudio donde se utilizó la funcionalización específica de cuarzos oro-vidrio para el anclaje covalente de ADN como se ha descrito en [11], para la detección de metilación de ADN mediante el uso de QCM-D. Para demostrar el anclaje de ADN metilado (rs 9939609 del gen FTO) en el cuarzo oro-vidrio se realizaron 3 pruebas siguiendo el proceso explicado en la metodología.

La sensibilidad de la QCM permitió una disminución de frecuencia al depositar sobre ella la muestra con una concentración de 3.5ng/ μ l, como se muestra en la Fig. 1, la curva de frecuencia de B) y C) se redujo drásticamente después de la introducción de la solución de ADN y se estabilizó durante las 24hrs siguientes, mientras que en A) la frecuencia se mantuvo lineal. En las gráficas se indica en líneas azules un cambio en la Δf mientras que en las líneas rojas indican el cambio de ΔD y existe una relación lineal entre estas, que indican que la QCM-D fue capaz de obtener datos cuantitativos y por tal detectar la muestra. Se utilizó la enzima de restricción MspJI en B) y C), se observó una disminución de frecuencia y un aumento de disipación para ambos cuarzos oro-vidrio.

Para conocer si existe reconocimiento y corte de la enzima a sitios metilados se dejó fluir agua MiliQ y los resultados fueron los siguientes:

Como se muestra en la Fig 1 A) representa el control, solo dejando fluir agua MiliQ. B) la curva de frecuencia para la muestra no metilada disminuyó en la digestión con la enzima de restricción, después del flujo de agua aumentó la frecuencia hasta alinearse con la frecuencia marcada antes de la enzima. En C) la curva de frecuencia para la muestra metilada (región 9939609 del gen FTO) disminuyó en la digestión con la enzima de restricción, después del flujo de agua aumentó la frecuencia más que la marcada antes de la enzima, lo que muestra que existió corte de sitios metilados del ADN.

IV. DISCUSIÓN

Se conoce que la amplificación de la región a utilizar a veces puede tener falsos positivos y hacer la interpretación cualitativa de los datos basados en gel puede resultar complicado, especialmente cuando la región abarcan varios sitios CpG o su tamaño es pequeño, en éste caso 101pb y 30pb con el corte de las enzimas de restricción MspJI. Mientras que para la QCM-D, la exactitud se mejora por la interacción

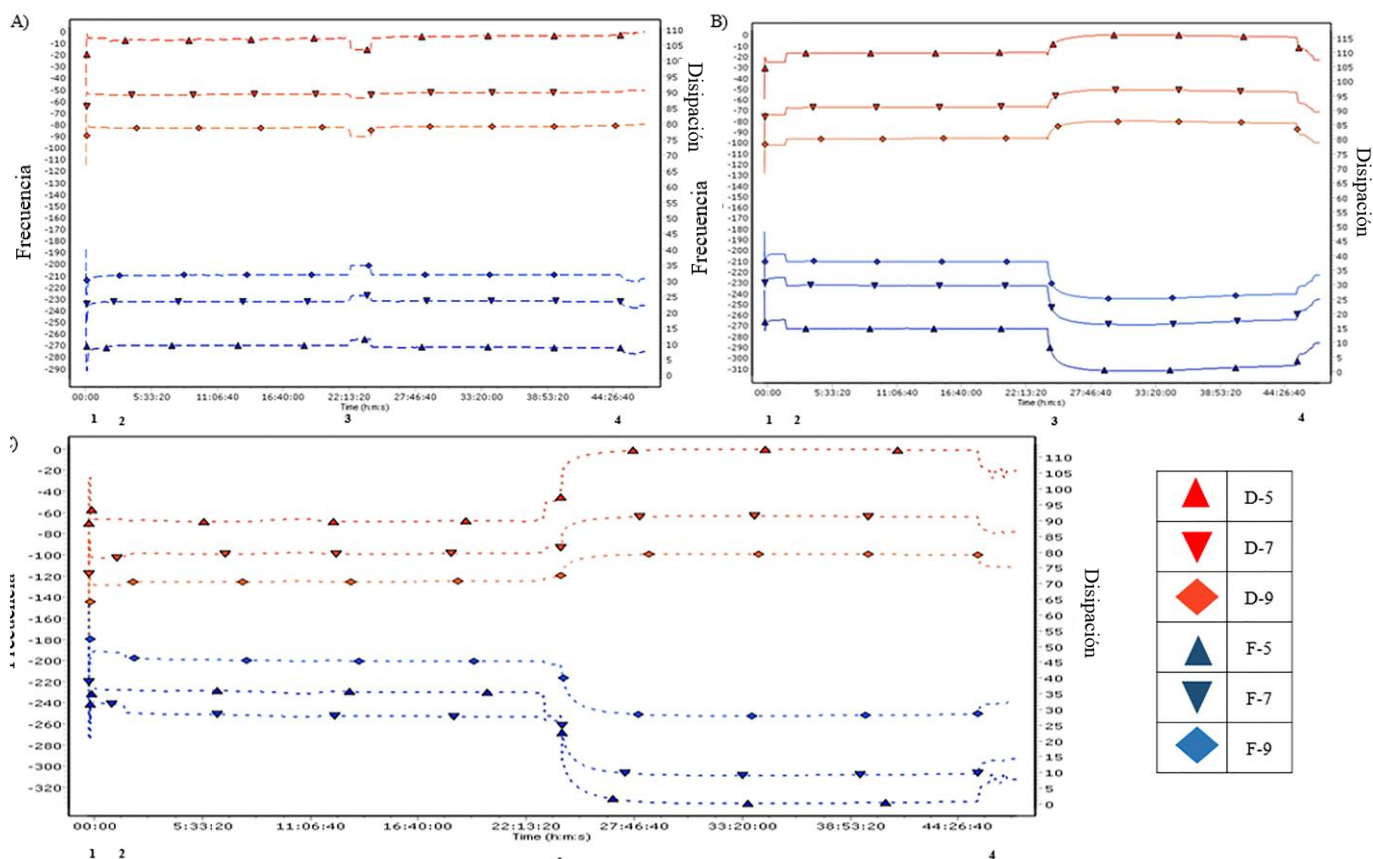


Fig. 1 Medidas de frecuencia y disipación. La gráfica A) muestra las medidas del sensor oro-vidrio 1 (control), B) medidas del sensor oro-vidrio 2 muestra no metilada y C) medidas del sensor oro-vidrio 3 muestra metilada (9939609 del gen FTO).

entre el ADN y la enzima de restricción, además de que al ser en módulos cerrados se elimina la posibilidad de señales no específicas y mejora la especificidad del ensayo.

La viabilidad del protocolo se basa en que a comparación con otros métodos en tiempo real (PCR-punto final), que se utilizan para la detección de metilación, el método basado en QCM es libre de marcaje. Mientras que existen diferentes métodos de detección como técnicas de biología molecular, estrategias basadas en la electroquímica, ISFET, OFRRs, los cuales demandan altos costos de instrumentación, consumo elevado de muestra y presentan complejidad en su realización [6]. Cabe señalar que durante las últimas dos décadas, el desarrollo de la Biotecnología ha realizado diferentes estudios para comenzar a atender las necesidades de desarrollar dispositivos para el diagnóstico molecular, se ambiciona que dichos dispositivos sean de alto rendimiento, rápidos, miniaturizados y capaces de ser producidos de forma masiva para cumplir con tal fin. Además de permitir la determinación de la interacción de biomoléculas en tiempo real y libre de marcaje [10].

La QCM-D presenta las características para ser un genosensor, solo requiere la inmovilización de ADN y los datos pueden ser adquiridos de forma automática. Los resultados de QCM tienen mayor selectividad y no solo se limita a la detección de ADN metilado y no metilado.

En el 2013 Jie Wang y colaboradores publicaron en la revista American Chemical Society el desarrollo de un método de detección de la metilación de células cancerígenas usando QCM, mostrando que este método es sensible para la detección de la metilación [3], lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

La sensibilidad de la QCM-D está dada por las frecuencias armónicas que son múltiplos enteros de la frecuencia fundamental de 5Hz, ya que son resonadores planares los cuarzos oro-vidrio funcionan a un número definido de armónicos, típicamente indexado por el número de planos nodales paralelamente a la superficie del cuarzo. Sólo armónicos impares pueden ser excitados eléctricamente, porque sólo éstos inducen cargas de signo opuesto en las 2 superficies del cuarzo, [12] es decir los armónicos que nos arrojaran datos son 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 en la QCM-D. En estudios sobre la detección de materiales con la QCM-D se utilizan los resultados dados por los armónicos 5, 7 y 9, basados en que son los datos centrales y que muestran mayor estabilidad en los gráficos.

La funcionalización específica para el anclaje covalente de ADN metilado del gen FTO sobre sustratos de cuarzo, es aplicable en el desarrollo de un biosensor gravimétrico para la determinación de la metilación en estudios epigenéticos.

V. CONCLUSIÓN

Los resultados de los ensayos de interacción con la QCM-D indican que es posible detectar DNA metilado y no metilado, además de que existe una diferencia en la curva de frecuencia y disipación entre las muestras cuando se somete a una digestión con enzimas de restricción que reconoce sitios metilados. Se detectó una disminución de frecuencia anclando ADN metilado y un aumento de la misma con el flujo de agua MiliQ después de la interacción con la enzima de restricción corroborando que existe corte de los sitios metilados de la muestra anclada en el cuarzo oro-vidrio.

A diferencia de otras estrategias, la QCM utiliza una pequeña cantidad de ADN, la medida es continua hasta por 45hrs y la detección de la muestra es en segundos, la medición en un medio cerrado elimina perturbación, lo que aumenta la reproducibilidad. El estado de metilación de las islas CpG se puede identificar con el uso de enzimas de restricción que cortan sitios metilados. Se demostró un nuevo método de detección de la metilación de la región rs9939609 del gen FTO basado en la combinación de técnicas de QCM y PCR punto final.

BIBLIOGRAFÍA

1. Milagro FI and Martínez JA, "Epigenetics of obesity and weight loss", *Endocrinol Nutr*, vol 60, pp. 12-14, Dic. 2014.
2. Dolinoy DC, Jirtle RL, "Environmental epigenomics in human health and disease", *Environ Mol Mutagen*, vol 49, no 1, pp. 4-8, Oct 2008.
3. Jie Wang, Zhiqiang Zhu, and Hongwei Ma, "Label-Free Real-Time Detection of DNA Methylation Based on Quartz Crystal Microbalance Measurement", *Anal. Chem.*, vol 85, pp. 2096-2101, Jan 2013.
4. Harbron J, Van der Merwe L, Zaahl MG, Kotze MJ and Senekal M, "Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Polymorphisms Are Associated with Physical Activity, Food Intake, Eating Behaviors, Psychological Health, and Modeled Change in Body Mass Index in Overweight/Obese Caucasian Adults", *Nutrients*, vol 6, no 8, pp. 3130-52, Aug. 2014.
5. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, et al., "A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity", *Science*, vol 11; no. 316(5826), pp. 889-894, May. 2007.
6. Zahra Taleat, Klaus Mathwig, Ernst J.R. Sudhölter, Liza Rassaei, "Detection strategies for methylated and hypermethylated DNA", *Trac*, vol 66, pp. 80-89, Mar. 2015.
7. Lucarelli F, Tombelli S, Minunni M, Marrazza G, and Mascini M, "Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection.", *Anal. Chim. Acta*, vol 609, no. 2, pp. 139-59, Jan 2008.
8. Tombelli S, Minunni M, and Mascini M, "Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices.", *Methods*, vol 37, no. 1, pp. 48-56, Sep. 2005.
9. Sassolas A, Leca-Bouvier BD, and Blum LJ, "DNA biosensors and microarrays.", *Chem. Rev.*, vol 108, no. 1, pp. 109-39, Dic. 2008.
10. Caygill R, Blair G, Millner P, "A review on viral biosensors to detect human pathogens", *Analytica Chimica*, vol 681, no. 1-2, pp. 8-15, Nov. 2010.
11. NM Pérez Vielma, "Funcionalización específica para el anclaje covalente de ADN sobre sustratos de oro: desarrollo, caracterización y aplicación en la determinación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en muestras de adolescentes obesos mediante Microbalanza de Cristal de Cuarzo con Monitoreo de Disipación", Ph.D.dissertation, Investigación en Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, 2015.
12. Shigeyoshi G, Kiwamu O, Yasuaki W and Hitoshi S, "Multimode Quartz Crystal Microbalance", vol. 39, no. 5B, pp. 3073-73, May 2000.