

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PROYECTO:

**“METILACIÓN DEL GEN DE REPARACIÓN DE
ADN *msh2* EN UN MODELO DE
ENVEJECIMIENTO DE RATONES HEMBRA
MULTÍPARAS”**

REALIZADO POR:

**Biol. JUAN CRISTÓBAL CONDE PÉREZ-PRINA
MATRÍCULA: 205182655**

TUTORA:

**Dra. Mina Königsberg Fainstein
Depto. Ciencias de la Salud
UAM-I**

ASESOR INTERNO:

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Depto. Biología de la Reproducción
UAM-I**

ASESOR EXTERNO:

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición “Salvador Zubirán”.**

INDICE

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Causantes bioquímicos del envejecimiento.....	5
1.2. Cambios epigenéticos y envejecimiento.....	6
1.3. Metilaciones de citosinas.....	6
1.4. Genes relacionados con los mecanismos de reparación del ADN	10
1.5. La multiparidad como modelo de estudio de envejecimiento prematuro.....	11
2. Justificación.....	14
3. Objetivo General.....	14
3.1. Objetivos Particulares.....	14
4. Hipótesis.....	15
5. Metodología.....	15
5.1. Control de animales.....	15
5.2. Aislamiento de ADN por la técnica de Nal.....	17
5.3. Cuantificación de ADN.....	19
5.4. Métodos de medición de modificaciones epigenéticas.....	20
5.5. Análisis de Metilación específica: Técnica COBRA.....	21
5.5.1. Tratamiento del ADN con bisulfito de sodio.....	21
5.6. Diseño de oligos específicos y elección de la enzima de restricción para la reacción en cadena de la polimerasa específica para metilaciones.....	23
5.7. Diseño de oligos específicos para el promotor metilado de msh2.	24

5.8. Diseño de oligos específicos para la técnica de RT-PCR para analizar la expresión del gen <i>msh2</i>	27
5.9. Extracción de ARNm de muestras de tejido	28
5.10. Condiciones para realizar RT-PCR.....	30
5.11. Análisis Estadístico.....	32
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Observaciones de control de los grupos de estudio.....	32
6.2. Extracción y aislamiento de ADN por la técnica de ioduro de sodio.....	33
6.3. Determinación de la metilación del gen <i>msh2</i> por la técnica COBRA.....	34
6.4. Secuenciación del producto del PCR.....	35
6.5. Secuencia determinada de gen <i>msh2</i> (5' a 3').....	36
6.6. Digestión de productos de PCR mediante la endonucleasa de restricción Mbol.....	37
6.7. Expresión del gen <i>msh2</i>	40
6.8. Análisis de los resultados densitométricos.....	41
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIÓN.....	45
9. PERSPECTIVAS.....	46
10. BIBLIOGRAFÍA.....	47

Resumen

El incremento en el daño al ADN asociado con la edad, puede ser reconocido como la acumulación de mutaciones inducidas fisiológica y ambientalmente, junto con un debilitamiento de los sistemas de reparación del ADN. Uno de estos sistemas es el de reparación de bases por mal apareamiento (MMR), la principal vía de corrección post-replicativa, que se sabe va en decremento conforme avanza la edad del organismo. Sin embargo, dado que la recurrencia del daño directo al ADN contrasta con la disfunción celular y tisular observada en individuos viejos, la falta de los sistemas reparadores de ADN puede estar también relacionada con cambios epigenéticos que se dan con la edad, tal como ocurre con la metilación de ADN. Se ha reportado que el desgaste de ratonas hembra utilizadas para fines reproductivos, las lleva a un estado de deterioro celular prematuro; por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue el relacionar la variable edad con la inestabilidad genómica y las modificaciones epigenéticas. De esta forma se determinó la correlación del silenciamiento del gen que codifica para la proteína de MMR *msh2*, con el desgaste de ratonas hembra multíparas asociada a la edad. Mediante el análisis de restricción con bisulfito combinado (COBRA) se comparó el ADN aislado de tejidos de ratonas hembras multíparas de 12 meses contra el de ratonas hembras nulíparas de 12 meses y el de ratonas hembras nulíparas de 2 meses. Los experimentos mostraron una hipermetilación de *msh2* asociada con el proceso de envejecimiento del 60% en las hembras multíparas en comparación con el 40% en hembras nulíparas de 12 meses (una diferencia del 20%). Sin embargo, dicha metilación adicional no fomentó una reducción en la expresión de *msh2* al realizarse la técnica de RT-PCR.

1. Introducción

1.1. Causantes bioquímicos del envejecimiento

El envejecimiento se ha definido como el deterioro, tanto estructural como funcional, que se va evidenciando en los tejidos y órganos de un individuo, conforme éste avanza por las etapas de la vida. A medida que un organismo envejece, sus procesos fisiológicos, bioquímicos y estructurales van en declive (Halliwell y Gutteridge, 2004), hasta llegar al punto de no poder responder a los estímulos que el organismo percibe, culminando con un malfuncionamiento general a nivel celular, tisular, de órganos y en la muerte del mismo.

Se ha sugerido que el origen del envejecimiento está relacionado con la generación y acumulación del daño sobre el ADN, el cual es en parte producido por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO más importantes son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y se generan tanto por agentes exógenos, como por diferentes procesos celulares, siendo el principal la respiración mitocondrial (Scandalios, 2002). Así mismo, se conoce que el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante para poder reducir el efecto de las ERO (Miura, 2004); como ejemplo se encuentran las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Estas enzimas, reducen los efectos oxidantes del $O_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 , respectivamente (Halliwell y Gutteridge, 2004), disminuyendo el daño ocasionado en las biomoléculas como el ADN.

Así mismo, se ha relacionado la exposición a agentes tóxicos, metales y contaminantes ambientales con el proceso de envejecimiento en los organismos (Florea *et al.*, 2005; Boley *et al.*, 2002). En el caso del ADN, se ha observado que los daños involucran apareamientos incorrectos de bases

nitrogenadas o bien deleciones y tienen como consecuencia una incorrecta expresión genética (Kültz, 2005).

1.2. Cambios epigenéticos y envejecimiento

Como se ha mencionado antes, aunque el estrés oxidativo puede alterar la expresión de ciertos genes, se sabe que las mutaciones puntuales del ADN no son suficientes para explicar todas las alteraciones que se han encontrado en las enfermedades y el envejecimiento, por lo que se propone, deben existir otros niveles de regulación. Uno de los niveles que pueden influir en este proceso es el epigenético.

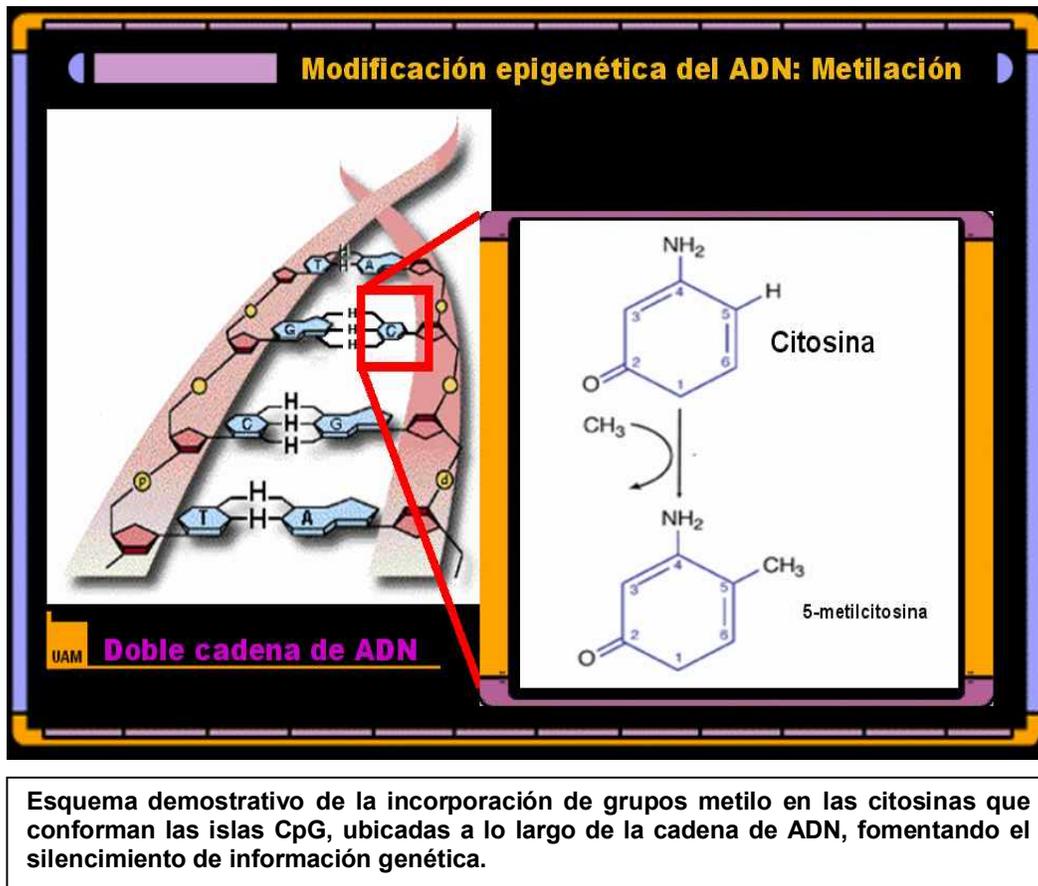
El conjunto de procesos que regulan la expresión de información del ADN sin cambiar su secuencia original se denomina epigenética (Allegrucci *et al.*, 2005).

La expresión génica está regulada por modificaciones químicas directamente sobre las citosinas que forman al ADN (metilaciones) o sobre las histonas (acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y metilación) (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002). En este trabajo se analizará el silenciamiento genético asociado a metilaciones del ADN.

1.3. Metilaciones de citosinas

Un mecanismo de silenciamiento génico a nivel del ADN se lleva a cabo cuando la célula adiciona un grupo metilo en la posición 5 de las citosinas mediante enzimas conocidas como metiltransferasas de ADN. Estas citosinas se encuentran preferentemente en agrupamientos denominados “islas CpG” (citidinas unidas por enlaces fosfodiéster a guaninas), las cuales al metilarse

reclutan a otros complejos que fomentan el silenciamiento genómico (Kisseljova y Kisseljov, 2005; Halliwell y Gutteridge, 2004; Belinsky *et al.*, 1996).



El proceso de metilación se ha estudiado recientemente en relación con algunas enfermedades severas como el cáncer. Se ha encontrado que el ADN de células normales puede ser metilado *de novo* y propiciar el silenciamiento de genes supresores de tumores, así como la desregulación de los mecanismos de control en el ciclo celular (Holliday, 2005; Mund *et al.*, 2005). Esta desregulación es un indicador de que existen modificaciones en la expresión del ADN que fomentan un funcionamiento incorrecto por parte de las células. Por lo tanto, es de especial importancia conocer si existen cambios en la metilación de genes encargados de la regulación de diversos procesos

celulares y críticos para la célula, en condiciones de estrés severo, como genes para la regulación y la reparación del ADN.

Se ha reportado que conforme el organismo envejece, el ADN se hipometila a nivel general; no obstante se ha visto que ciertas regiones críticas para el control de diversas enfermedades experimentan hipermetilaciones específicas (Szyf *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004). Dado que este proceso se relaciona con múltiples factores celulares y estímulos fisiológicos, durante un periodo determinado de tiempo, es posible que exista una modificación en el grado de metilaciones del genoma durante un estrés fisiológico severo generado por factores intrínsecos y ambientales que podrían favorecer procesos de deterioro fisiológico.

Se ha estudiado que la inactivación inducida por delección genética de la metiltransferasa de nucleótidos MT-Dnmt3b fomenta hipometilación anormal, inestabilidad estructural e inmortalización espontánea de fibroblastos de embriones de ratón. Estos experimentos muestran que las metilaciones pueden afectar a los organismos en su etapa de desarrollo embrionario, llevando a la formación de procesos fisiológicos anormales (Dodge *et al.*, 2005). Otros estudios muestran que el grado de metilación en el ADN de células de hígado de ratones recién nacidos se ve alterado por modificaciones en la dieta de las madres. Por ejemplo, se ha encontrado que al inducirles a éstas una condición de sobrepeso por sobrealimentación o una reducción drástica de la cantidad de alimento rico en arginina y ornitina, ocasiona un retraso en la velocidad del crecimiento de la placenta y del mismo feto (Wu *et al.*, 2004). Así mismo, en otro estudio se analizó el grado de metilaciones del ADN en muestras de

hígado de ratones con retraso en el crecimiento uterino y se relacionó con la presencia de modificaciones epigenéticas persistentes que fomentan en las crías el riesgo de contraer resistencia a la insulina e hipertriglicemia, un efecto semejante al observado en humanos (MacLennan *et al.*, 2004). Por otro lado se reportó que el antagonismo de la hipervitaminosis A indujo defectos del cierre del tubo neural anterior, con una deficiencia de donadores de grupos metilo en el cultivo de todo el embrión murino (Santos-Guzmán *et al.*, 2003). Otros experimentos denotan una mayor generación de transiciones CG>TT en las islas CpG metiladas con respecto a las no metiladas, como causa de un estrés oxidativo asociado a respuesta inflamatoria generada por el organismo, en células deficientes del sistema de reparación por escisión de nucleótidos NER (Lee *et al.*, 2002). Estos estudios plantean la posibilidad de una relación entre el daño al ADN y la generación anormal de metilaciones en genes que codifican a proteínas supresoras de tumores, pero dado la amplitud del alcance de las ERO sobre el resto de las biomoléculas, es difícil establecer un patrón o mecanismo que involucre estos procesos.

Se ha reportado también que durante el proceso de metilación del ADN participan en forma conjunta diversas moléculas que modifican la estructura general de la cromatina, para poder facilitar el proceso de silenciamiento. Un ejemplo de estas moléculas son los complejos remodeladores de la cromatina que participan en la formación de regiones de heterocromatina silenciadas con variantes de la histona H2A a medida que las células alcanzan el estado de senescencia, fomentando fallas en la regulación epigenética (Schulz y Tyler, 2005; Zhang *et al.* 2005). Por otro lado, se sabe que cuando una región del ADN se hipometila por la actividad de las enzimas desmetilasas (las cuales

remueven los grupos metilo), la cromatina presenta inestabilidad estructural que le permite cambiar en su forma, abrirse y permitir la expresión de la información. Por otro lado, cuando regiones cromatínicas se abren para su transcripción, otras regiones se cierran, debido a que otras histonas están asociadas con grupos metilo. Esto se debe, tanto a la actividad residual de las enzimas metiltransferasas, como a la incapacidad de las desmetilasas para acceder a las regiones metiladas del ADN, como consecuencia del cambio estructural en la cromatina. (Szyf *et al.*, 2004).

1.4. Genes relacionados con los mecanismos de reparación del ADN

Cuando la integridad estructural el ADN se daña debido a estímulos nocivos, los genes tales como *msh2*, *msh6*, *mhl1* y *pms2*, se activan para poder participar en el proceso de reparación del ADN denominado sistema de reparación de bases por mal apareamiento (MMR, del inglés Mismatch Repair), (Mullins *et al.*, 2005).

En particular la proteína MSH2 forma parte de una familia altamente conservada a nivel evolutivo de moléculas encargadas de reparaciones MMR en el ADN (Kültz, 2005). Estas reparaciones abarcan lo que son apareamientos de bases erróneas o deleciones e inclusiones incorrectas de las mismas. MSH2 se une con la proteína MSH6 para formar el heterodímero hMutS α al detectarse un mal apareamiento de bases, mientras que al darse una deleción incorrecta, MSH2 y otra proteína denominada MSH3 forman el heterodímero hMutS β , el cual corrige el error y posiciona la base faltante en la cadena de ADN (Peltomäki, 2001; Santuci-Darmanin y Paquis-Flucklinger, 2003). Se ha visto

que, al darse el silenciamiento de los genes *msh2* y *mlh1* como consecuencia de la metilación, se incrementa la cantidad de deleciones no reparadas en repeticiones de mono y dinucleótidos, de longitud variable. Este fenómeno se conoce como inestabilidad microsatelital, el cual se utiliza actualmente como un indicador de daño al ADN por fallas en el mecanismo MMR, comúnmente en estudios de cáncer colorectal y adenocarcinoma ovárico. (Hampel *et al.*, 2005; Helleman *et al.*, 2006).

Se ha observado que al inducir un silenciamiento homocigótico en el gen de reparación *msh2* en ratones, y al utilizar el agente metilante 1,2-dimetilhidrazina en dichos ratones, la incidencia de cáncer colorectal aumenta considerablemente, en comparación de ratones con su gen de reparación completamente activado (Colussi *et al.*, 2001). También se ha observado que la sobrevivencia y la fertilidad de nemátodos *Caenorhabditis elegans* mutantes nulos para *msh2*, se ve severamente comprometida, llegando al punto de que su ciclo vital se ve reducido como consecuencia de un deterioro fisiológico irreversible (Estes *et al.*, 2004).

1.5. La multiparidad como modelo de estudio de envejecimiento prematuro

El envejecimiento prematuro se presenta en organismos cuyos procesos celulares se alteran ante condiciones normales y anormales, tanto fisiológicas como ambientales, que fomentan una degeneración celular súbita antes de tiempo (Toth *et al.*, 2005). Este fenómeno ha sido observado en estudios previos y recientes mediante la ayuda de diferentes modelos celulares y animales, con el fin de determinar sus causantes. Por ejemplo, se ha utilizado

como un modelo animal de envejecimiento prematuro a las hembras de pie de cría de la cepa CD1 (Königsberg *et al.*, 2007). En estos grupos sometidos a multiparidad (múltiples partos) se han encontrado características fenotípicas asociadas a envejecimiento tales como alopecia severa, mientras que a nivel celular se ha observado una disminución de la proliferación y síntesis del ADN, una drástica disminución de funcionalidad, así como un aumento en el número de células senescentes (Königsberg *et al.*, 2007). Este modelo ha sido analizado junto con otros estudios, en base a la teoría de que los embarazos múltiples pueden estar alterando el estado fisiológico general de las hembras a favor de un estado de envejecimiento prematuro.

En otros reportes, se ha señalado que el embarazo es una etapa fisiológica muy importante en la vida de las hembras de los mamíferos, ya que se exponen a una gran cantidad de estímulos, tanto intrínsecos como extrínsecos, que modifican una gama de procesos a nivel hormonal, celular y genético. Se ha reportado que factores como la constante y oscilante producción de hormonas y el número de crías que una hembra puede concebir, influyen en el balance metabólico, incrementando su propensión al deterioro fisiológico (Westendorp y Kirkwood, 1998). Se ha reportado también la relación entre el comportamiento reproductivo en ratones de pie de cría y la longevidad, observándose que las hembras de pie de cría de algunas cepas de ratón como C3H/HeJ, disminuyen su ciclo de vida hasta un 50%, lo que se atribuye, entre otros factores, a su alta incidencia de embarazos (Russell, 1968). Otros estudios revelan un incremento en los niveles de ERO del organismo durante el embarazo (Agarwal *et al.*, 2005) y un incremento en los niveles de lipoperoxidación de tejidos como pulmón, riñones y útero en hembras después

del parto comparadas con aquellas que eran nulíparas (Sainz *et al.*, 2000). Así mismo, se ha observado que presentan patologías relacionadas con un estado de alto deterioro fisiológico, como son el mal funcionamiento del hígado, la pérdida temprana de pelo y una alta incidencia de tumores mamarios, especialmente en la cepa C3H/HeJ (Russell, 1968; Foster *et al.*, 1983). Lo anterior es un indicador de que los efectos causados por alteraciones fisiológicas, entre ellas las relacionadas con la multiparidad, pueden promover un estado de deterioro tisular que afecta al organismo, el cual se relaciona con el envejecimiento prematuro en nuestro modelo.

Dado que las metilaciones anormales pueden culminar en el desarrollo de procesos que perjudican al organismo, sería de importancia observar si en nuestro modelo de estudio, las alteraciones fisiológicas causadas por embarazos continuos o multiparidad pueden fomentar modificaciones epigenéticas a nivel de ADN. La razón por la cual se piensa que existe esta relación es que durante el embarazo participan una gran gama de procesos de regulación y crecimiento celular, que al estar bajo un estrés fisiológico constante y severo podrían estar funcionando de forma incorrecta. Esto nos lleva a tratar de vislumbrar información que revele cómo pueden alterarse sus procesos de regulación y mantenimiento celular y, a su vez, cómo se puede afectar el estado fisiológico a causa de cambios en el grado de metilaciones en genes específicos, y en aquellos genes encargados de la reparación del ADN, tal como el gen *msh2*.

2. Justificación

Como consecuencia del estrés fisiológico severo causado por la multiparidad, Diversos procesos anormales de regulación y modificación epigenética podrían ocurrir. Estos procesos de silenciamiento podrían afectar genes de reparación del ADN como *msh2*, generando un deterioro estructural fisiológico asociado al envejecimiento prematuro. Puesto que este deterioro metabólico y estructural se ha asociado a la falta de reparación de los sistemas, es muy factible que se pudieran encontrar cambios en la metilación de este gen. El propósito de este proyecto es el de analizar si existen cambios en la metilación del ADN, en particular en el gen *msh2*, como consecuencia del estrés fisiológico causado por la multiparidad. Estos estudios podrían servir como base en experimentos posteriores, para evitar el deterioro fisiológico asociado al envejecimiento.

3. Objetivo General:

- Determinar el porcentaje de metilación y los niveles de expresión del gen *msh2* en tejidos reproductivos y no reproductivos de ratones hembra multíparas y nulíparas.

3.1. Objetivos Particulares:

- Aislar ADN de la glándula mamaria, hígado y ovario, de ratones hembra de la cepa CD-1 multíparas y nulíparas.
- Comparar el porcentaje de metilación del gen *msh2* en los diferentes tejidos de los sujetos de estudio bajo estrés fisiológico por multiparidad

con hembras de la misma edad sin dicho estrés, mediante la técnica de COBRA.

- Determinar la expresión del gen *msh2* mediante el aislamiento de ARNm de la glándula mamaria, hígado y ovario, de ratones hembra de la cepa CD-1 multíparas y nulíparas.

4. Hipótesis

- Si la multiparidad, como modelo de envejecimiento prematuro, induce cambios epigenéticos, en particular cambiando el porcentaje de metilación del gen de reparación del ADN *msh2*, entonces las hembras multíparas presentarían un mayor grado de metilación de este gen comparadas con hembras nulíparas de la misma edad, afectando sus niveles de expresión a nivel de ARNm.

5. Metodología

5.1. Control de animales

1.- Se establecieron 3 grupos de estudio, cada uno formado por 30 ratones de la cepa CD-1.

- El primer grupo, hembras nulíparas sacrificadas a los 2 meses de edad.
- El segundo grupo, hembras nulíparas sacrificadas a los 12 meses de edad.
- El tercer grupo, hembras multíparas (3-4 hijos por camada; 8-9 camadas) sacrificadas a los 12 meses.

2.- Los 3 grupos de estudio permanecieron bajo observación hasta el tiempo de su sacrificio, bajo condiciones que aseguraron que otras variables no afectarían

las condiciones fisiológicas de los ratones, evitando de esta forma otros tipos de estrés:

- El grupo experimental de hembras multíparas consistió de las siguientes características: en un mismo contenedor denominado unidad reproductiva, se pusieron entre 3 o 4 hembras de 2 meses de edad junto con 1 macho. El tiempo de gestación de las hembras normalmente es de 19 días y el de lactancia de 21 días; Generalmente entran en estro inmediatamente después de dar a luz, lo cual asegura que puedan ser fecundadas en un corto tiempo. Las hembras pueden comenzar a amamantar a las crías al mismo tiempo que están embarazadas. Normalmente, a los 9 meses las hembras se retiran de la unidad reproductiva debido a su deterioro fisiológico y pérdida de fecundidad, y para fines de este trabajo, se agruparon con las características que se mencionan en el siguiente punto.
- Cada grupo de 5 animales separó por cada caja de mantenimiento. Esto se hizo con el fin de evitar conflictos de territorialidad entre individuos, así como competencia por agua y alimento.
- El alimento que se proporcionó equivalía a 500 gramos de alimento disponible *ad libitum* para que los individuos de estudio no estuvieran en condiciones de desnutrición. Antes de acabarse la cantidad dada, se recambiaba el alimento. El alimento proporcionado eran croquetas de la marca Harlan Teklad Global Diets, el cuál tiene un mínimo proteico del 18%, un mínimo de 5% de grasa cruda y un máximo del 5% de fibra cruda.

- El agua proporcionada *ad libitum* a los animales fue agua libre de impurezas y otras moléculas que pudieran afectar su salud.
- El ritmo circadiano de los organismos fue regulado por control de apagado cíclico programado de la luz cada 12 h.
- Cada 4 días se les cambió el aserrín de las cajas, con el fin de evitar infecciones y condiciones de insalubridad que afectaran a los ratones de manera negativa (bacterias, virus, etc.).
- Se inspeccionó individualmente cada organismo, para determinar si los individuos presentaban heridas por conflictos de territorialidad o por infección.

3.- Los individuos pertenecientes a cada grupo se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajeron quirúrgicamente las glándulas mamarias, hígado y ovario, para poder obtener y analizar su ADN. Se eligieron el ovario y la mama debido a que estos órganos son tejidos que están relacionados con el proceso reproductivo y dado que se quiere determinar su deterioro fisiológico, son tejidos que cumplen con los requisitos de estudio. El hígado se eligió por ser un órgano con una alta tasa metabólica en el cual se sabe que se acumulan daños asociados a la edad (López-Díazguerrero *et al.*, 2005).

4.- Se obtuvieron los diferentes tejidos de cada animal, se lavaron en solución salina y se envolvieron en papel aluminio para ser congelados a -80° C hasta ser utilizados.

5.2. Aislamiento de ADN por la técnica de Nal (Matos *et al.*, 2001)

- Se aisló el ADN obtenido de dichos órganos y se cuantificó la metilación específica del promotor del gen *msh2* por la técnica de COBRA (del

idioma inglés, Análisis de Restricción por Bisulfito Combinado).

- Se homogenizó 1 g de tejido de hígado, 0.5 g de tejido de ovario y 0.2 g de mama, el cuál estuvo en hielo para evitar la degradación del tejido y del ADN.
- El tejido homogenizado se centrifugó a 1500 g por 10 min a 4° C y se resuspendió el botón obtenido en 2 ml de solución amortiguadora A (Sacarosa 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0.1 mM y 1% de Tritón-100, pH=7.5). Posteriormente se centrifugó a 1500 g por 10 min a 4° C.
- Se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de solución amortiguadora A, se resuspendió el botón y se volvió a centrifugar a 1500 g durante 10 min a 4° C.
- Se descartó el sobrenadante, se agregaron 1 ml de solución amortiguadora B (EDTA-Na₂ 5 mM, desferroxamina 0.15 mM, Tris-HCl 10 mM, pH=8) y se resuspendió el botón.
- Se agregaron 350 µl de SDS al 10% y se agitó suavemente por inversión.
- Se agregaron las enzimas ARNasas: 40 µl de ARNasa T1 (solución madre con una concentración de 1000 U/mL), 60 µl de ARNasa A (solución madre con una concentración de 10 mg/mL) y se agitó suavemente por inversión. Las ARNasas estaban disueltas en solución amortiguadora C (Tris.HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, desferroxamina 2.5 mM a pH=7.4). Se incubó durante 1 h a 37° C a baño María.
- Se le agregaron 100 µl de proteinasa K en agua (concentración 20 mg/mL, se prepara en el momento). Se incubó una h a 37° C.
- Se centrifugó a 5000 g por 15 min a 4° C.

- Se agregaron 2.4 ml de solución de NaI (NaI 7.6 mM, Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0.3 mM, pH=8) y 4 ml de isopropanol al 100 %. Se agitó por inversión y se metió al congelador hasta el día siguiente.
- Las muestras se centrifugaron a 9000 g por 15 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante.
- Se agregó 1 ml de isopropanol al 60 %. Se volvió a centrifugar a 9000 g por 10 min a 4° C.
- Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente a 9000 g por 10 min a 4° C.
- Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 µl de desferroxamina 0.1 mM, debe quedar con una consistencia viscosa.
- Se guardó a -70° C.

5.3. Cuantificación de ADN

Para cuantificar la cantidad de ADN en las muestras finales, se tomaron 10 µl de muestra deseada en 990 µl de agua. La muestra se leyó a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro y se cuantificó la cantidad de ADN presente por medio de la siguiente relación:

Valor de absorbancia a 260 nm x dilución x 50 = **Cantidad de ADN obtenida en µg/ml.**

Se determinó el cociente 260/280 para ver la pureza del ADN tomando como valor aceptable > 1.75

Se corrieron las muestras de ADN en un gel de agarosa 0.8 % en una solución TBE 0.5X, para asegurar su integridad.

5.4. Métodos de medición de modificaciones epigenéticas

Las metilaciones de las citosinas del ADN pueden ser cuantificadas mediante el uso de técnicas moleculares como la técnica de bisulfito de Na⁺, en las cuales se inducen polimorfismos de nucleótidos sencillos a partir de nucleótidos no metilados en islas específicas y permite la conservación de las citosinas no metiladas. Las islas de nucleótidos tratadas son reconocidas y amplificadas por PCR específico para metilaciones, donde las bases convertidas en uracilo a partir de citosina son reconocidas como timinas, permitiendo la cuantificación apropiada de las bases metiladas conservadas (Yang *et al.*, 2004; Sandoval-Guerrero *et al.*, 2005). Estos métodos han sido utilizados para estudiar patologías relacionadas con el silenciamiento genómico resultante de diversos estímulos, como por ejemplo el estrés oxidativo, desordenes fisiológicos o la transcripción de proteínas y enzimas.

5.5. Análisis de Metilación específica: Técnica COBRA

5.5.1. Tratamiento del ADN con bisulfito de sodio

El ADN previamente aislado se trató con la técnica de bisulfito de sodio para convertir todas las citosinas no metiladas en timinas (Frommer *et al.*, 1992).

Para ello se realizó lo siguiente:

1. Se diluyó ADN (hasta 2 µg) en 50 µl con H₂O destilada.
2. Se agregó 5.5 µl de NaOH 2M.
3. Después se incubó a 37°C durante 10 min (para crear una cadena sencilla de ADN).
4. Se agregó 30 µl de 10 mM hidroquinona en agua a cada tubo, preparada en el momento.
5. Se adicionaron 520 µl de Bisulfito de Sodio 3M preparado en el momento (agregando 1.88 g de bisulfito de sodio por cada 5 ml de H₂O, y ajustar su pH a 5.0 con NaOH).
6. Hubo que asegurarse que los reactivos se mezclan bien con el ADN.
7. Se aplicó una capa de aceite mineral como medio de aislamiento de ADN.
8. Se incubó a 50°C durante 16 h (se evitaron incubaciones que sobrepasen dicho tiempo de incubación, debido a que las C metiladas comenzarán a convertirse en T).
9. Se agregó 1 ml de solución Wizard Cleanup (Promega A7280) a cada tubo y se dispuso la mezcla en una minicolumna de preparación.

10. Se filtró al vacío y se removió todo, incluido el aceite mineral previamente incorporado.
11. Posteriormente se lavó con 2 ml de isopropanol al 80% en agua.
12. Se lavó la columna en un tubo de 1.5 ml.
13. Se agregaron 50 μ l de agua caliente (60-70 °C).
14. Se centrifugó el tubo junto con su columna en la microcentrífuga durante 1 minuto, a temperatura ambiente y velocidad máxima.
15. Se adicionaron 5.5 μ l de NaOH 3 M a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min.
16. Se agregó 1 μ l de glicógeno 1mM para que funcionara como un acarreador (se utiliza el glicógeno, sin diluir).
17. Se agregó 33 μ l de NH_4Ac 10 M, y 3 volúmenes de etanol.
18. Se precipitó el ADN a -20°C , toda la noche. Posteriormente, se realizó una centrifugación posteriormente durante 30 min a 13,000 g y se realizó un lavado con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar, se obtuvo el botón seco y se resuspendió en 20 μ l de agua.
19. Se utilizó al ADN para el proceso de PCR (se mantuvo en ambiente frío a -20°C).

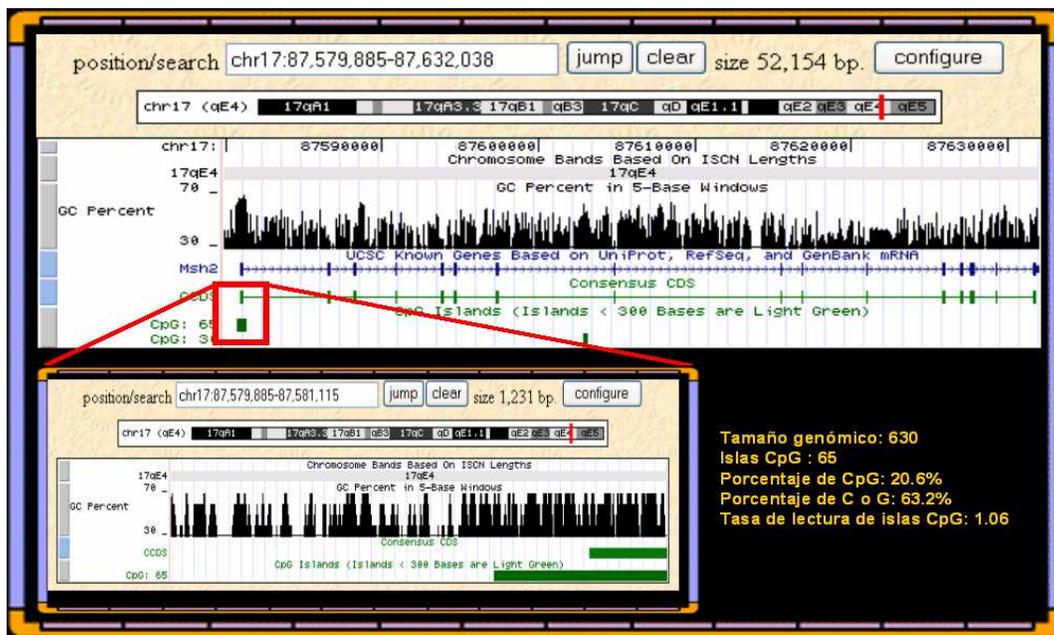
5.6. Diseño de oligos específicos y elección de la enzima de restricción para la reacción en cadena de la polimerasa específica para metilaciones.

Se diseñaron los oligos o cebadores específicos para el gen *msh2* considerando la secuencia del ADN obtenida y tratada con bisulfito. Posteriormente se realizó un PCR para amplificar dicha secuencia (Issa *et al.*, 2005).

- Se identificó la región de interés con islas CpG. Se hizo el mapa de restricción de un área denominado mapa no transformado.
- Se copió la secuencia y se incorporó en un editor de texto (Microsoft Word).
- Se convirtieron todos los grupos CG en XG. Después, se convirtieron todas las C restantes en T y posteriormente todas las X de los grupos XG en C. Una vez terminado este proceso, se hizo un mapa de restricción de esta secuencia transformada (mapa metilado).
- Se convirtieron todas las C en T y se realizó el mapa de esta secuencia (mapa no metilado).
- Se encontraron los sitios para las enzimas de restricción únicas para el mapa metilado, ya que son los mejores. Si no existían sitios disponibles en este mapa, se tenían que encontrar aquellos que fuesen la segunda mejor opción.
- Se diseñaron los cebadores para el proceso de PCR, buscando una región de 200 pares de bases (pb), a la que pudiera unirse las enzimas y

que estuvieran cerca del inicio de transcripción, incluyendo 20 bases corriente arriba donde se encuentra el promotor. Se utilizó la secuencia metilada convertida para el diseño del cebador. Hubo que evitar tener C en los cebadores sentido y anti sentido (máximo 1 C en cada cebador y en el extremo 5'). Al sintetizar los cebadores, se incorporaron ya sea C o T en el cebador sentido y G o A en el cebador anti sentido en lugar de C o G.

5.7. Diseño de oligos específicos para el promotor metilado de *msh2*. Para poder diseñar los oligos requeridos en este proyecto, se analizó el locus del gen *msh2*. Al ubicar la región codificante con mayor cantidad de islas CpG en la región cercana al promotor, se realizaron los mapas metilados y no metilados. De esta forma se pudo realizar el diseño de los oligos.



Secuencia completa del gen: [87580885...87632038](#)
Número GeneID: [17685](#)

Secuencia cercana al promotor con mayor porcentaje de islas CpG: [87520686-87581315](#)

Mapa metilado de la región analizada (5' a 3'):

TTTTGTGTTTTAGTGGTGTGGTGTGGAGCGGTTTCGGAAATGGCGGTGTA
GTTTAAGGAGACGTTGTAGTTGGAAGGCGCGGTTCGAGGCGGGTTTCGTG
CGTTTTTTTGGAGGGTATGTCGGAGAAGTCGAGTATTACGGTGCCTTTTTTC
GATCGCGGCGATTATACGGCGTACGGAGAGGACGCGTTGTTGGCGGT
TCGCGAGGTGTTAAGATTTAGGGCGTGATTAAGTATATGGGGTCGGTAG

Oligo Delantero:

5'-TCTTAAACACCTCGCGAACC-3'

Oligo Reverso:

5'-TGGCGGTGTAGTTTAAGGAGA-3'

Tamaño de la secuencia: 200 bp

- Se amplificaron utilizando la temperatura correcta de alineación de los oligos con la secuencia del producto. Se utilizó una solución amortiguadora especial para PCR 10X ((NH₄)₂.SO₄ 166 mM, Tris 670 mM a pH 8.8, MgCl₂ 67 mM, β-mercaptoetanol 100mM).
- Se preparó la Mezcla Maestra (5 µl de Sol. amortiguadora PCR 10x, 1 µl de la mezcla con dNTP (nucleótidos de incorporación) 25mM, 1 µl del cebador u oligo sentido (300ng/µl), 1 µl del cebador u oligo anti sentido (300ng/µl) y 15.8 µl de agua MiliQ ultrapura) para cada reacción de PCR. Por cada reacción se utilizaron 25 µl como volumen final en un tubo para PCR de 0.5 ml.
- Se agregó 1 µl (2-5 µg) del molde de ADN modificado por el bisulfito en cada tubo. Se tuvieron las reacciones para cada proceso metilado y no metilado por cada muestra, así como los controles positivos y negativos de ADN.
- Cada tubo se introdujo en un termociclador. Se inició el proceso de PCR mediante una desnaturalización a 94°C. Se agregó la GoTaq polimerasa

(1.25 unidades diluidas en 10 µl) después de la desnaturalización inicial.

Posteriormente, se iniciaron los 35 ciclos designados para la reacción:

- 30 segundos a 94°C (desnaturalización)
- 30 segundos a 55°C (alineamiento).
- 30 segundos a 72°C (elongación).
- 4 min a 72°C (final de la elongación).
- Posteriormente, se utilizó la enzima Mbol, con el propósito de cortar en una región específica de la secuencia del producto del PCR obtenido. Se tomaron 15 µl del producto de PCR y se le agregaron 12 µl de la enzima Mbol (10 U/µl), 10 µl de la solución amortiguadora NE (Acetato de potasio a 50 mM, TRIS-acetato a 20 mM, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, pH= 7.9 a 25°C) y completar hasta tener un volumen de 100 µl con agua MiliQ ultrapura por cada muestra para digerir con la enzima.
- Cada muestra se dejó incubando en un baño a 37°C durante 16 h para que la enzima pudiera digerir las muestras utilizadas. Pasado este tiempo, se agregaron 11 µl de NH₄Ac 3 M, 1 µl de glicógeno y 220 µl de etanol absoluto (se agitó con vórtex) y se dejó durante 45 min a -70°C, o bien -20°C toda la noche para permitir que el producto precipitara.
- Después de este periodo de tiempo, se centrifugaron las muestras precipitadas durante 30 min a 13,000 g. Se desechó el sobrenadante, se secaron las muestras y se resuspendió el botón con 10 µl de agua MiliQ ultrapura y 5 µl de solución amortiguadora de cargado LB.

- Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida PAGE al 5% durante 50 min a 85 V, con el fin de ver fragmentos del corte de restricción.

5.8. Diseño de oligos específicos para la técnica de RT-PCR para analizar la expresión del gen *msh2*.

Para determinar si las metilaciones encontradas en el gen *msh2* afectaron la expresión del mismo, se utilizó la técnica de RT-PCR (del inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante una Transcripción Reversa). Mediante la técnica de RT-PCR, se logró obtener una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de muestras de ARNm de tejidos de hígado, ovario y mama, las cuales fueron sometidas a la acción de una Enzima Transcriptasa Reversa (Lowe, 2001). Para el PCR se utilizaron cebadores correspondientes al sitio de inicio de transcripción de *msh2*, así como para el gen constitutivo y de normalización *gapdh*.

- Se utilizó el programa Gene Sorter de la página USCS Genome Bioinformatics (<http://www.genome.ucsc.edu>). Mediante este programa se determinó la secuencia de inicio de transcripción para el gen *msh2*, en base al análisis de la secuencia completa CDS del ARNm de la especie *Mus musculus*. El gen de *gapdh* se utilizó como gen de normalización en el experimento. Se buscó de la misma forma que con *msh2*.
- Posteriormente se realizó una búsqueda de los cebadores que tuvieran mejor interacción con la secuencia correspondiente a *msh2* y *gapdh*. Estos cebadores se diseñaron con la ayuda del programa SciTools

PrimerQuest de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>). Aquellos cebadores que tuvieron una Penalidad de Cebador con un valor menor a 1 fueron los elegidos, ya que se aseguró que no tendrían interacciones inespecíficas que alteraran el resultado.

Oligos utilizados para la reacción de RT-PCR

MSH2 - Oligo Delantero:

5' - GATAGGAACAGGATAGAGGAGAGG - 3'

MSH2 - Oligo Reverso:

5' - CTTCTTCGTATTTCTCCAGAGCC - 3'

GAPDH – Oligo Delantero:

5' - AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC - 3'

GAPDH – Oligo Reverso:

5' – TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA - 3'

- Una vez elegidos estos cebadores, se extrajeron muestras de tejido de hígado, ovario y mama de ratones hembras multíparas de la cepa CD-1, de 12 meses, de hembras nulíparas de 12 meses y hembras nulíparas de 2 meses. De estos tejidos se aislaron los ARNm necesarios para la reacción de RT-PCR. Para poder realizar este estudio se consideró una n=9.

5.9. Extracción de ARNm de muestras de tejido (Chomczynski & Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993).

Previamente se preparó una solución inhibidora de ARNasas “ZAP” (500 ml de a 1 mM de EDTA y 100 mM de NaOH, a partir de soluciones concentradas de 200 ml de 0.5 M de EDTA tetrasódico tetrahidratado y 200 ml de 1 M de NaOH). Esta solución se utilizó para limpiar la región y utensilios de trabajo, la cual

aseguró que las moléculas de ARNm no fueran degradadas. Se preparó también Agua DEPC al 0.1% (2 litros), EtOH al 75% con el agua DEPC al 0.1% previamente hecha y Agua de sistema MiliQ al 0.1% con Agua DEPC. Estas soluciones se esterilizaron antes de utilizarse.

Se colocó cada muestra de tejido (1-2 g) en un tubo de cultivo celular Falcon de 5 ml en tubo nuevo con 0.8-1 ml de TRIZOL (Invitrogen). Este reactivo se utilizó para aislar y preservar el ARNm en los tejidos. Se homogeneizó (mediante perlas o Politron) el tejido embebido con TRIZOL. Se dejó incubar la muestra por 5 min.

-
-
- Se agregaron 500-800 μ l de cloroformo al 100% y se agitó **vigorosamente** durante 15 segundos.
 - Una vez agitada la muestra se vació a un tubo nuevo y se dejó incubar durante 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g x 15 min. (11,400 RPM) a -4° C.
 - Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se incorporaron 500 μ l de isopropanol al 100%. Se incubó a 1 h a -20° C.
 - Se centrifugó a 12,000 g a -4° C. x 10 min y se decantó el sobrenadante.
 - Se agregó 1ml de etanol-DEPC al 75%. Se voló el pellet con un vortex y se centrifugó nuevamente a 7500 g x 5 min a -4° C.
 - Se removió todo rastro del etanol-DEPC al 75% secando con una pipeta y se agregaron 20-100 μ l de H₂O-DEPC + MiliQ.
 - Las muestras de ARNm se guardaron a -70° C.

Para poder determinar la integridad de las muestras obtenidas de ARNm, se realizaron pruebas con un gel para electroforesis especial que requirió lo siguiente: 35 ml de Agua DEPC 0.1%, 10 ml de formaldehído, 5 ml de MOPS 1X, 0.6 gramos de agarosa regular. Se utilizaron 250 ml de una solución MOPS 1X que se usó como líquido para la cámara de electroforesis.

5.10. Condiciones para realizar RT-PCR

Para poder realizar la técnica de Retrotranscripción a partir de 10 o 5 μ l de la muestra de ARNm se utilizó el Kit SuperScript First-Strand Síntesis System for RT-PCR (Invitrogen). De este kit se utilizaron los siguientes reactivos:

- 2 μ l de RANDOM HEXAMERES, 1 μ l de DNTPs a 25 mM y 2 μ l de Agua DEPC.
- Se Incubó a 65° C por 5 min. Posteriormente se incubó en hielo por 1 minuto.
- Se preparó una mezcla maestra o "Mix" para poder realizar la retrotranscripción para cada reacciones:
 - 2 μ l de solución amortiguadora para RT 10X
 - 2 μ l de MgCl₂ 50 mM
 - 2 μ l de solución DTT 0.1 M
 - 1 μ l de solución inhibidora de ARNasas "RNAsaOUT"
- Se colocaron 7 μ l del "Mix" a cada uno y se incubó a 2 min a temperatura ambiente. Pasado este periodo se agregó 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (SSII) por muestra.

- Se incubó a temperatura ambiente por 10 min, después de ese periodo de tiempo se incubó a 42° C por 50 min y finalmente a 70° C por 15 min para detener la reacción.

Una vez obtenido el ADNc a partir de la reacción anterior, se utilizaron las muestras correspondientes para poder realizar la técnica de PCR. Se utilizaron los cebadores específicos para *msh2* y *gapdh*. Finalmente se hace una reacción de PCR normal partiendo de lo siguiente:

- Se amplificaron las muestras utilizando la temperatura correcta de alineación para los oligos (60 °C). Se utilizó la solución amortiguadora especial para PCR 10X (NH₄)₂SO₄ 166 mM, Tris 670 mM a pH 8.8, MgCl₂ 67 mM, β-mercaptoetanol 100mM).
- Se preparó la Mezcla Maestra para cada muestra (3 µl de Sol. amortiguadora PCR 10x, 1 µl de la mezcla con dNTP 25 mM, 1 µl del cebador u oligo sentido y 1 µl del cebador anti sentido para *msh2* (300 ng/µl), así como 1 µl del cebador u oligo sentido y 1 µl del cebador anti sentido para *gapdh*). Por cada reacción se utilizaron 30 µl como volumen final en un tubo para PCR de 0.5 ml, completando el volumen final con agua MiliQ ultrapura libre de ARNasas.
- Se agregó 5 µl del molde de ADNc cada tubo incluyendo 0.3 µl de la enzima polimerasa GoTaq.
- Cada tubo se introdujo en el termociclador. Se Inició el proceso de PCR mediante una desnaturalización a 94°C. Se iniciaron los 35 ciclos designados para la reacción:

- 30 segundos a 94°C (desnaturalización)
- 30 segundos a 60°C (alineamiento).
- 30 segundos a 72°C (elongación).
- 4 min a 72°C (final de la elongación).

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 % en 250 ml de TBE 0.5X durante 1 h 20 min a 80 V, con el fin de ver los productos de la reacción de PCR.

5.11. Análisis Estadístico

Para el ensayo COBRA se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos de los 30 animales por cada grupo, utilizando las pruebas estadísticas ANOVA-Tukey con una $p < 0.05$. Para los ensayos de expresión de *msh2* se utilizaron las muestras de 9 animales de cada grupo y se emplearon las mismas pruebas estadísticas.

6. RESULTADOS

6.1. Observaciones de control de los grupos de estudio.

Durante 1 año, se supervisaron a los 3 grupos de estudios, para determinar que no tuvieran algún tipo de complicaciones u otro tipo de estrés que pudiera alterar el estado de los organismos de estudio.

Tipo de hembra	Alopecia	Tumores	Mortalidad
Nulíparas de 2 meses	0 %	0%	0 %
Nulíparas de 12 meses	0 %	0%	3.3 %
Múltiparas de 12 meses	86.6 %	10%	6.6 %
(n=30)			

6.2. Extracción y aislamiento de ADN por la técnica de yoduro de sodio.

Se obtuvieron concentraciones de ADN y pureza aceptables con el aislamiento por la técnica de yoduro de sodio, como se muestra en la Tabla 1. Así mismo, se verificó la integridad de los mismos en geles de agarosa al 0.8 % (Figura 1). Los geles confirmaron que en efecto, se estaba obteniendo una gran concentración de cada tejido tratado con la técnica de yoduro de sodio.

Tejido (C.N.)	260 nm	280 nm	260/280	ADN (ua/ul)
Hígado (H)	1.3794	0.882	1.564	4.4
Ovario (O)	0.8867	0.621	1.428	2.7
Mama (M)	0.4434	0.344	1.289	1.4
Tejido (N)	260 nm	280 nm	260/280	ADN (µg/µl)
Hígado (H)	1.6801	0.987	1.7023	3.4
Ovario (O)	0.6994	0.465	1.5041	2.3
Mama (M)	0.2795	0.211	1.325	1.2
Tejido (M)	260 nm	280 nm	260/280	ADN (ua/ul)
Hígado (H)	1.2794	0.6699	1.9096	5.3
Ovario (O)	0.5171	0.3166	1.6336	3.4
Mama (M)	0.1663	0.1173	1.4183	1.5

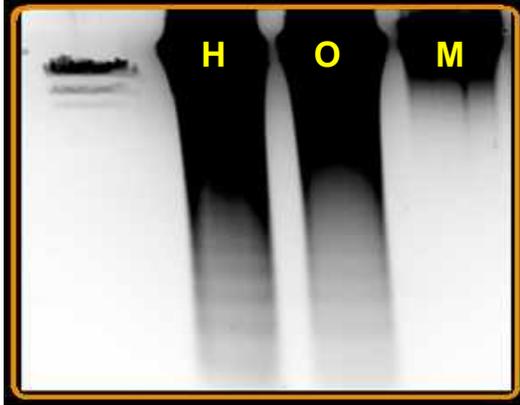


Tabla 1. Concentraciones y pureza obtenidas de muestras de ADN.

Fig. 1. (Derecha). Imagen demostrativa de gel de agarosa al 0.8% para determinar la integridad estructural de las muestras de ADN. Carril 1: Marcador de alto peso molecular; Carril 2: ADN de hígado; Carril 3: ADN de ovarios; Carril 4: ADN de glándulas mamarias.

6.3. Determinación de la metilación del gen *msh2* por la técnica COBRA.

Para poder establecer las condiciones óptimas para la reacción de PCR con los oligos específicos, se hizo un gradiente de temperaturas para determinar que temperatura de alineamiento era la óptima para la reacción. Se determinó que la temperatura de 55 °C era la que daba mejores resultados, con un 1 µl del ADN tratado con bisulfito de sodio. Estos resultados se observan en los geles de agarosa al 1.2 % como el gel demostrativo de la Figura 2.

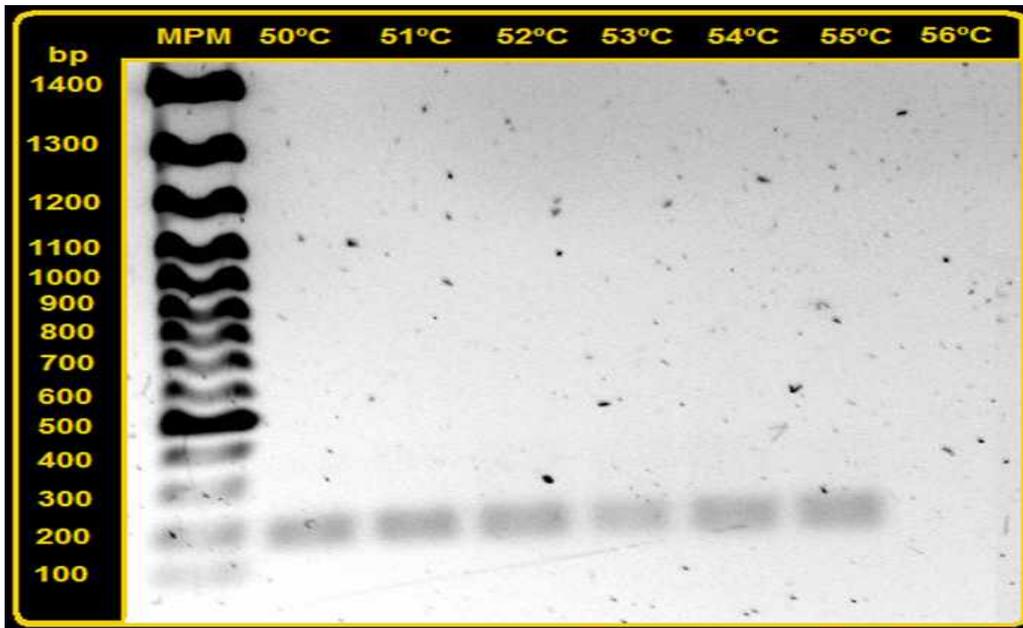


Figura 2. Geles de agarosa al 1.2 % donde se observa el resultado de las reacciones de PCR para *msh2* en estado metilado, obtenidos a diferentes temperaturas de alineamiento de los cebadores u oligos. Los productos obtenidos corresponden a bandas de 200 pares de bases, (MPM: marcador de peso molecular).

6.4. Secuenciación del producto del PCR.

Una vez obtenido el producto en base a los oligos o cebadores diseñados, se secuenció el producto de PCR, para poder determinar si se había obtenido la secuencia de análisis deseada. Se purificó el producto mediante un estuche comercial de purificación de ADN Quiquick (Quiagene), el cuál fue utilizado para una reacción de PCR para secuenciación con el oligo sentido y otra reacción para el oligo antisentido. La secuenciación se hizo con el ABI Prism BigDye Terminators Versión 3.1 y con un secuenciador automatizado ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) en base a la descripción de Villarreal-Molina et al., 2007.

El resultado obtenido indicó que, en efecto, se obtuvo un producto de PCR que concordó con la secuencia de interés (Figura 3). El producto se obtuvo a partir

de muestras de ADN de ratonas hembra nulíparas de 2 meses tratadas con la enzima Sssl.

6.5. Secuencia determinada de gen msh2 (5' a 3'):

TGGCGGTGTAGTTTAAAGGAGACGTTGTAGTTGGAAGGC GCGGTTCGAGGC GGGTT
TCGTGCGTTTTTTTGAAGGTATGTCGGAGAAATCGAGTATTACGGTGC GTTTTTTTC
GATCGCGGCGATTTTTATACGGCGTACGGAGAGGACGCGTTGTTGGCGGTTCCGC
GAGGTGTTTAAAGAT

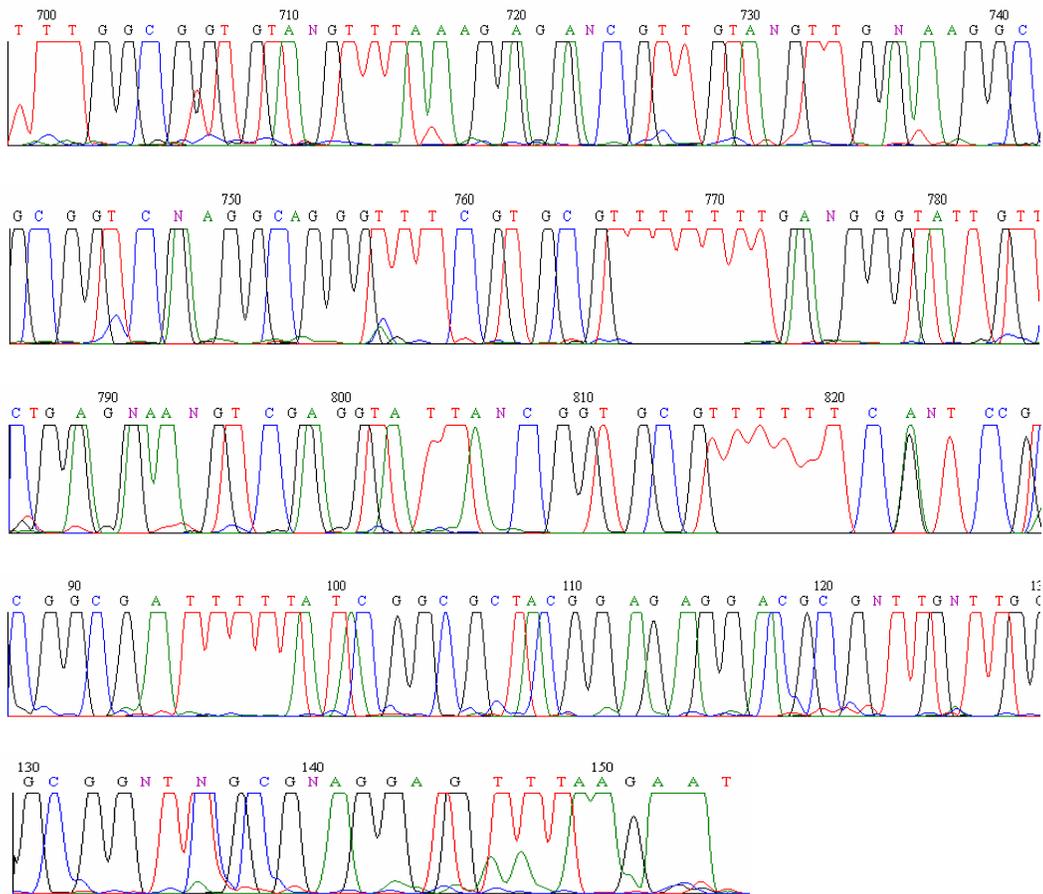


Figura 3. Imágenes obtenidas que indican que la secuencia escogida coincide con el producto de PCR obtenido de las muestras de ADN tratadas con bisulfito de sodio.

6.6. Digestión de productos de PCR mediante la endonucleasa de restricción Mbol. Los resultados utilizando la enzima de restricción indicaron que se dio una digestión en los productos de MSP.

El sitio de corte que reconoció la enzima es el siguiente:



El control positivo de las muestras tratadas con la enzima Sssl, sin embargo, no presentaron una digestión del 100%. Los fragmentos digeridos equivalieron a un 70% del producto total. Se realizaron condiciones de geles de poliacrilamida PAGE al 5 % y las muestras metiladas por completo, así como las muestras experimentales y control presentaron fragmentos de corte (Figura 4). La conclusión a la que se llegó es que la enzima reconoció el sitio que debía porque ese sitio de reconocimiento se encuentra en la secuencia del gen en estado metilado. Si la secuencia no estuviera metilada, la enzima no reconocería un sitio de corte, como ocurrió en las muestras de los animales de 2 meses de edad. Se realizó la comparación por análisis densitométrico, comparando los fragmentos de digestión (porcentaje metilado) contra el producto no digerido (porcentaje no metilado).

Los resultados indicaron lo siguiente: las muestras de control positivo de hígado de hembras nulíparas de 2 meses y tratado con la enzima Sssl dio una digestión en promedio del 69.17%. Basándose en muestras de hígado del mismo grupo pero sin tratar con la enzima Sssl, sólo dio una digestión del 7.56%, por lo que a éste se le consideró como el control negativo,

Por otro lado, el resultado obtenido de la digestión en las muestras de hembras multíparas de 12 meses fue el siguiente:

Hígado Multíparas	(% Metilado)	60.31 ± 1.2
Ovario Multíparas	(% Metilado)	60.46 ± 0.8
Mama Multíparas	(% Metilado)	61.15 ± 2.1
n=30		

El resultado obtenido de la digestión en las muestras de hembras nulíparas de 12 meses y de las nulíparas de 2 meses, respectivamente, fue el siguiente:

Hígado Nulíparas	(% Metilado)	41.07 ± 0.1
Ovario Nulíparas	(% Metilado)	40.34 ± 5.7
Mama Nulíparas	(% Metilado)	42.48 ± 3.5
n=30		

Hígado Nulíparas 2m	(% Metilado)	7.56 ± 0.9
Ovario Nulíparas 2m	(% Metilado)	8.23 ± 0.8
Mama Nulíparas 2m	(% Metilado)	7.87 ± 1.2
n=30		

Al comparar los resultados del grupo de hembras multíparas de 12 meses con las hembras nulíparas de 12 meses, se observó una diferencia del 19.24% de porcentaje metilado en hígado, 20.12% en ovario y 18.67% en mama. Los resultados, al analizarse mediante estadística descriptiva, si presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 5).

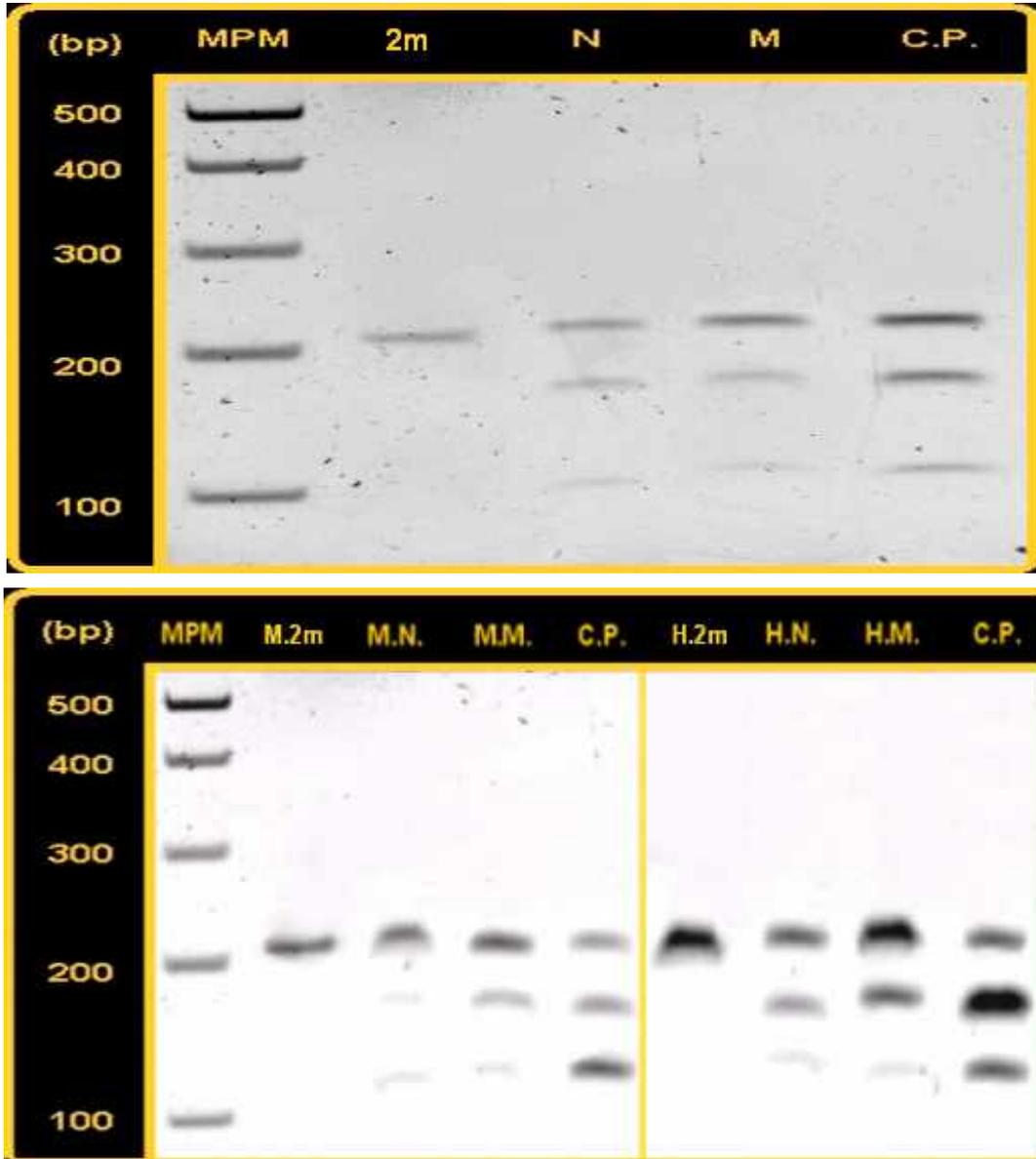


Figura 4. Geles de PAGE al 5% donde se aprecian las muestras del PCR tratadas con Mbol.

La imagen de arriba corresponde a las muestras de MSP de Ovario; (2m): Control Negativo. (N): Muestras de ratonas nulíparas. (M): Muestras de ratonas multiparas. (C.P.): Control Positivo.

La imagen de abajo corresponde a las muestras de Mama e Hígado tratadas con Mbol. (2m): Control Negativo. (M.N.): Mama de Nulíparas. (H.N.): Hígado de Nulíparas. (M.M.): Mama de Multiparas. (H.M.): Hígado de Multiparas. (C.P.): Control Positivo.

Los fragmentos de un peso menor a los 200 bp son consideradas como el porcentaje metilado, ya que fue el producto digerido por la enzima Mbol mientras que el fragmento de aprox. 200 bp se considera como el producto no metilado, debido a que no fue digerido por la misma enzima.

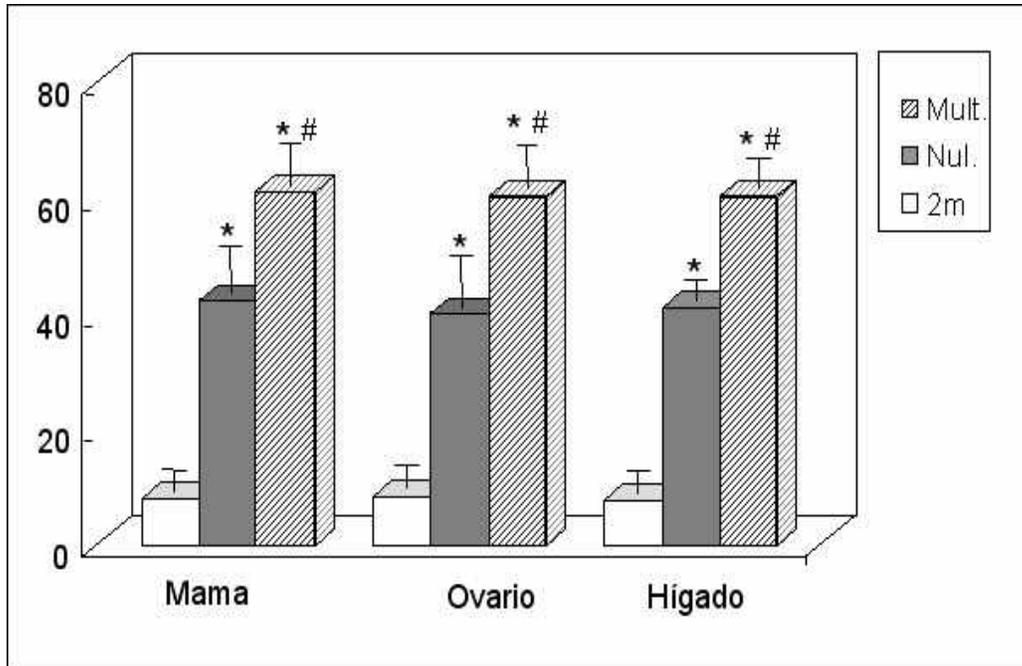


Figura 5. Resultados obtenidos del análisis densitométrico de las muestras de PCR (digeridas por la enzima Mbol) de hígado, ovario y mama de las hembras multíparas de 12 meses, nulíparas de 12 meses y nulíparas de 2 meses.

6.7. Expresión del gen *msh2*.

Para determinar si el silenciamiento del gen *msh2* se correlaciona con una disminución en su expresión, se aisló el ARNm del gen y se realizó un RT-PCR. Para poder establecer las condiciones óptimas para la reacción con los oligos específicos, se hizo un gradiente de temperaturas para determinar que temperatura de alineamiento era la óptima para la reacción. Se determinó que la temperatura de 60 °C era la adecuada, con 5 µl de ADNc obtenido de la reacción de retrotranscripción. Los resultados observados en los geles, donde se trabajaron con muestras de ARNm de hembras multíparas de 12 meses, nulíparas de 12 meses y nulíparas de 2 meses, indican que al utilizar dichas condiciones, el PCR de estos genes dio resultados favorables para su análisis (Figura 6).

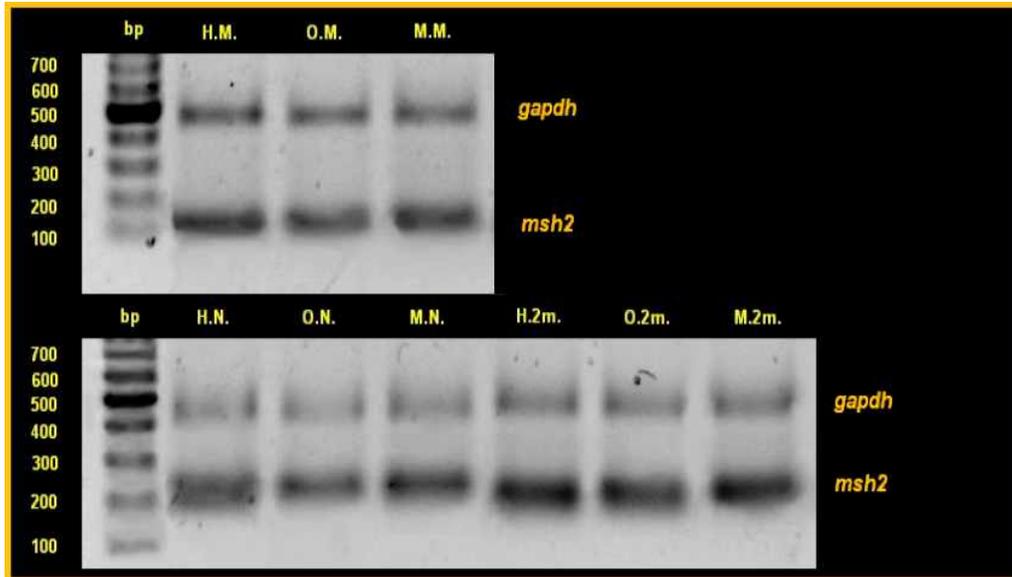


Figura 6. Geles demostrativos de agarosa al 1.2% donde se aprecian los productos del RT-PCR de *msh2* (200 bp) y *gapdh* (450 bp), obtenidos a una temperatura de alineación en el PCR de 60° C. La imagen de arriba corresponde a las siguientes muestras: (H.M.): Hígado de hembra múltipara de 12 meses. (O.M.): Ovario de hembra múltipara de 12 meses. (M.M.) Mama de hembra múltipara de 12 meses. En la imagen de abajo se aprecian los productos de: (H.N.): Hígado de hembra nulípara de 12 meses. (O.N.): Ovario de hembra nulípara de 12 meses. (M.N.): Mama de hembra nulípara de 12 meses. (H.2m.): Hígado de hembra nulípara de 2 meses. (O.2m.): Ovario de hembra nulípara de 2 meses. (M.2m.): Mama de hembra nulípara de 2 meses.

6.8. Análisis de los resultados densitométricos. Se realizó la comparación por análisis densitométrico, comparando los productos del RT-PCR de las muestras de hembras múltiparas de 12 meses, nulíparas de 12 meses y el control negativo de hembras nulíparas de 2 meses. Cada muestra se normalizó con el producto de la co-amplificación, siendo en este caso el gen de *gapdh*.

Los resultados de la ANOVA y Tukey-Kramer indicaron que existía una diferencia significativa entre los grupos de ratonas hembra nulíparas de 2 meses con respecto a los otros 2 grupos de hembras múltiparas de 12 meses y nulíparas de 12 meses. Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre los productos obtenidos de las muestras de ratones hembra múltiparas y los productos de las nulíparas de 12 meses ($p < 0.05$). Esto es un

indicador que el aumento de la metilación en el gen de *msh2* de las hembras multíparas, por sí solo, no depende del efecto de la multiparidad, sino que es un factor relacionado con la edad de los organismos. (Figura 7).

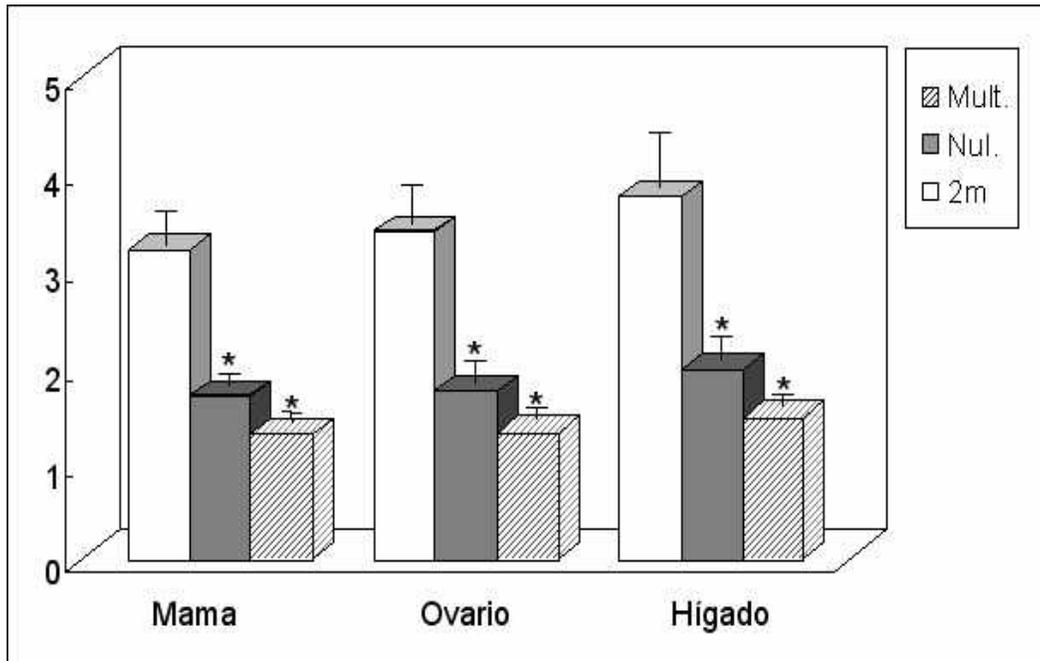


Figura 7. Resultados obtenidos del análisis densitométrico de las muestras de RT-PCR de hígado, ovario y mama de las hembras multíparas de 12 meses, nulíparas de 12 meses y nulíparas de 2 meses.

7. DISCUSIÓN

La hipótesis original que se planteó al inicio del proyecto fue si durante la multiparidad, como modelo de envejecimiento prematuro, se podrían encontrar cambios epigenéticos en la metilación del gen de reparación del ADN *msh2*. Por lo que se compararon hembras multíparas con hembras nulíparas de la misma edad.

Los resultados obtenidos muestran que en efecto, en las muestras de hembras multíparas hubo un incremento en el patrón de metilación en un 19.24% en hígado, 20.12% en ovario y 18.67% en mama, con respecto a las hembras

nulíparas de 12 meses. Si bien la digestión de las muestras de las hembras multíparas de 12 meses fue del 60% y las nulíparas de 12 meses presentaron una digestión del 40%, las hembras nulíparas de 2 meses presentaron una digestión aproximada al 7.5%. Esto es un indicativo que en las hembras de 12 meses, se ve una tendencia hacia una mayor metilación del promotor del gen en comparación con las ratonas hembras de 2 meses. Es decir, se ve una correlación de la edad con el aumento de la metilación, aún cuando en las multíparas de 12 meses se observó una diferencia del 20%, que puede verse relacionada con el desgaste por multiparidad. De acuerdo con estos hallazgos, se esperó que este marcador de silenciamiento epigenético fuera por sí solo, lo necesario para alterar los niveles de expresión del mismo gen.

Sin embargo, al momento de realizar la técnica de RT-PCR y revisar la expresión del gen a nivel de ARNm se comprobó mediante estadística paramétrica que el nivel de expresión encontrado en las muestras de hembras multíparas de 12 meses y las nulíparas de 12 meses fue significativamente diferente con respecto al grupo de control negativo de hembras de 2 meses, sin embargo no era significativamente diferente entre estos dos grupos. Esto hace suponer que aunque existe una relación entre la metilación y la edad de los animales, así como el factor de multiparidad (que agrega un 20 % de metilación), deben existir otros factores que generan el fenotipo asociado a envejecimiento prematuro observado en las hembras multíparas de 12 meses. El aumento en la metilación de las islas CpG es, a pesar de estos resultados, un marcador interesante que estaría señalando de forma indirecta un fenómeno

anormal en las células de las hembras multíparas y que culminaría con el desarrollo de un estado de envejecimiento prematuro en las mismas.

Una posibilidad que explicaría defectos en la reparación de errores por mal apareamiento, implicaría una mutación en la secuencia de proteínas de la familia MSH. Se ha visto que una sustitución de fenilalanina por alanina, en la región N-terminal de la proteína MSH6, siendo más específico en el motivo GXFY(X)₅DA, induce una falla en la capacidad de dicha proteína para unirse con MSH2 y poder formar el heterodímero que genera la señalización de reparación de ADN en la especie *Thermus aquaticus* (Dufner *et al.*, 2000). En este estudio también se encontró que, aunque MSH2 presentó mutaciones en esta misma región, su actividad no se vio afectada, relegando la responsabilidad de la unión a la región alterada en MSH6.

Esto podría explicar porque, a pesar de estarse expresando MSH2 de igual manera en las células de hembras multíparas del proyecto, hay un fenotipo evidente de envejecimiento en las mismas. Es posible que ciertas proteínas tales como MSH6, pudieran estar quedando “inutilizadas”, ya sea por el efecto de alteraciones en la secuencia original de ADN o en la proteína misma como parte de un proceso post-traducciona l alterado. Si los malos apareamientos o las deleciones de bases, generados por diversos tipos de estrés fisiológico, rebasan la capacidad de reparación por la maquinaria MMR, esto llevaría a un círculo vicioso, donde las secuencias de los propios genes tales como MSH6 pudieran experimentar mutaciones y no cumplir con su función dentro de la célula.

Otra razón por la cual podría estarse afectando al balance fisiológico de las hembras multíparas es una falla en la maquinaria de reparación MMR, pero a nivel de la proteína p53. Se ha visto que al darse un daño al ADN en células humanas, el heterodímero hMutS α formado por hMSH2 y hMSH6 inicia la señalización, activando a cinasas específicas para que fosforilen a las Serinas 15 y 392 de la proteína p53, activándola y de esta forma iniciar la reparación de apareamientos de bases incorrectos. La respuesta de p53, la cual se cree que depende del tipo de estímulo de activación que percibe, es causada en parte por modificaciones post-traduccionales de la proteína en sitios distintivos. Esto significa que la eficiencia de la proteína puede verse modificada como consecuencia de mutaciones en su secuencia original genética o por estímulos nocivos que estén generando ya sea un daño directo al ADN o fomenten mutilaciones anormales en genes encargados de reparación como ocurre con la familia MSH (Duckett *et al.*, 1999).

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos para este proyecto pudieron determinar que se observó un aumento de aproximadamente 20% en la metilación de las islas CpG del promotor del gen de *msh2* en las hembras multíparas de 12 meses en comparación con las hembras nulíparas de 12 meses. Sin embargo, se observó que: la expresión del gen no se vio afectada significativamente, aunque si presentó una leve tendencia diferencial y que dicha expresión varió en base a la variable de la edad, más que solamente en cuestiones relacionadas con la multiparidad.

9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas se podría analizar los niveles de la proteína presente en las células de los organismos mediante la técnica de Western Blot. Dado que los niveles de la proteína deberían corroborar los datos obtenidos de la técnica de RT-PCR, observar variaciones en los niveles de MSH2 podría ser un factor que indicaría alguna posible modificación post-traducciona que inhiba su efecto de señalizador de reparación en el ADN.

Otra forma de determinar si la proteína tiene alguna variación en su estructura terciaria, sería realizar una técnica de inmunoprecipitación. Mediante esta técnica, se podría observar si se forma adecuadamente el heterodímero ya sea con MSH6 y MSH3, dependiendo del tipo de error de mal apareamiento presente en la secuencia de ADN.

Para poder determinar que tipo de daño se está presentando en la secuencia genética, se podría realizar un experimento utilizando muestras de ADN original de los tejidos y someterlos a un análisis con Cromatografía Líquida Alto Rendimiento o HPLC (del Inglés High Performance Liquid Chromatography), para poder determinar la formación de aductos tales como 8-hidroxi-desoxiguanosina, O6-metilguanosa, entre otros, originados por fallas en el mecanismo de reparación MMR.

Otra perspectiva a realizar es determinar el nivel de inestabilidad microsatelital en las muestras de ADN de estos grupos de estudio. Dicha inestabilidad es un marcador usado para ver el grado de daño en el ADN de las células, principalmente por la falla de mecanismos de reparación de ADN, tal es el caso del sistema MMR. Dicho sistema pudiera estar verse afectado por el

silenciamiento generado por hipermetilación en genes como el de *msh2*, afectando los niveles de inestabilidad microsatelital.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, A. Gupta, S. Sharma, R.R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3(28): 1-21.
2. Allegrucci, C. Thurston, A. Lucas, E. Young, L. 2005. Epigenetics and the germline. *Reproduction.* 129: 137-149.
3. Arenas-Huertero, F. Recillas-Targa, F. 2002. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac. Med. Méx.* 138(6): 547-555.
4. Barouki, R. 2006. Ageing free radicals and cellular stress. *Med. Sci.* 22(3):266-72.
5. Boley, S.E. Wong, V.A. French, J.E. Recio, L. 2002. p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. *Toxicol. Sci.* 66(2):209-215.
6. Belinsky, S. A. Nikula, K. J. Baylin, S. B. Issa, J.P. 1996. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4045-4050.
7. Chomczynski, P. Sacchi, N. 1987. Single-step method od RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

8. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15: 532-534. 536-537.
9. Colussi, C. Fiumicino, S. Giuliani, A. Rosini, S. Musiani, P. Macri, C. Potten, C.S. Crescenzi, M. Bignami, M. 2001. 1, 2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in *msh2(-/-)* mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 93(20): 1534-1540.
10. Dodge, J. E. Okano, M. Dick, F. Tsujimoto, N. Chen, T. Wang, S. Ueda, Y. Dyson, N. Li, E. 2005. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.* 280(18): 17986-17991.
11. Duckett, D.R. Bronstein, S.M. Taya, Y. Modrich, P. 1999. hMutS α and multi-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(22): 12384–12388.
12. Dufner, P.; Marra, G.; Räschle, M.; Jiricny, J. 2000. Mismatch Recognition and DNA-dependent Stimulation of the ATPase Activity of hMutS α Is Abolished by a Single Mutation in the hMSH6 Subunit. *J. Biol. Chem.* 275 (47): 36550-36555.
13. Estes, S. Phillips, P.C. Denver, D.R. Thomas, W.K. Lynch, M. 2004. Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 166(3):1269-79.
14. Florea, A.M. Yamoah, E.B. Dopp, E. 2005. Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation

- to genomic damage and apoptosis induction. *Environ. Health Perspect.* 113(6): 659-664.
15. Foster, H. L. Small, J.D. Fox, J. G. 1983. *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. 3. Academic Press. New York. U.S.A. Pp: 154-164.
 16. Frommer, M. McDonald, L. E. Millar, D. S. Collis, C. M. Watt, F. Grigg, G. W. Molloy, P. L. Paul, C. L. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1827-1831.
 17. Ghoshal, K. Li, X.; Datta, J. Bai, S. Pogribny, I. Pogribny, M. Huang, Y. Young, D. Jacob, S.T. 2006. A Folate- and Methyl-Deficient Diet Alters the Expression of DNA Methyltransferases and Methyl CpG Binding Proteins Involved in Epigenetic Gene Silencing in Livers of F344 Rats. *J. Nutr.* (136):1522-1527.
 18. Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C. 2004. *Free radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford University Press. India. 936 págs. Pp: 17, 23, 32, 115, 123, 133, 248, 280, 327-8, 351, 789.
 19. Hampel, H. Frankel, W.L. Martin, E. Arnold, M. Khanduja, K. Kuebler, P. Nakagawa, H. Sotamaa, K. Prior, T.W. Westman, J. Panescu, J. Fix, D.; Lockman, J. Comeras, I. de la Chapelle, A. 2005. Screening for the Lynch Syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer). *N. Engl. J. Med.* 352 (18):1851-60.
 20. Helleman, J. van Staveren, I.L. Dinjens, W.N. V. Ritstier, K.; Ewing, P.C.; van der Burg, M.E. Stoter, G. Berns, E.M. 2006. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer.* 6: 201-210.

21. Holliday, R. 2005. DNA methylation and epigenotypes. *Biokhimiya*. 70(5): 612-617.
22. Issa, J.P. 2005. Epigenetic Variations and Human Disease. *J. Nutr.* 132: 2388S-2392S.
23. Iwahashi, Y. Ito, E. Yanagisawa, Y. Akiyama, Y. Yuasa, Y. Onodera, T. Maruyama, K. 1998. Promoter analysis of the human mismatch repair gene hMSH2. *Gene*. 213(1-2):141-7.
24. Kisseljova, N.P. Kisseljov, F.L. 2005. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biokhimiya*. 70(7): 743-752.
25. Königsberg, M. López-Diazguerrero, N.E. Aguilar, M.C. Ventura, J. L. Gutierrez-Ruíz, M. C. Zentella, A. 2004. Senescent phenotype achieved in vitro is indistinguishable, with the exception of Bcl-2 content, from that attained during the in vivo aging process. *Cell. Biol. Intl.* 28(9): 641-651.
26. Königsberg, M. Lopez-Diazguerrero, N.E. Rivera-Martinez, L.P. Gonzalez-Puertos, V.Y. Gonzalez-Vieira, R. Gutierrez-Ruiz, M.C. Zentella, A. 2007. Physiological deterioration associated with breeding in female mice: A model for the study of senescence and aging. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 146: 695-701.
27. Kültz, D. 2005. Molecular and evolutionary basis of the Cellular Stress Response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225-57.
28. Lee, D.H. O'Connor, T.R. Pfeifer, G.P. 2002. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG>TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acid Res.* 30(16): 3566- 3573.

29. Lopez-Diazguerrero, N.E. Luna-Lopez, A. Gutierrez-Ruiz, M.C. Zentella, A.; Königsberg, M. 2005. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life Sci.* 77(22): 2840-54.
30. Lowe, K. 2001. First cDNA strand synthesis. Practical Approach Series. Oxford University Press. 1-3.
31. MacLennan, N.K. James, S.J. Melnyk, S. Piroozi, A. Jernigan, S. Hsu, J.L. Janke, S.M. Pham, T.D. Lane, R.H. 2004. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol. Genomics.* 18(1): 43-50.
32. Matos, H.R. Capelozzi, V.L. Gomes, O.F. Di Mascio, P. Medeiros, M.H.G. 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* 396 (2): 171-177.
33. Miura, Y. 2004. Oxidative stress, radiation-adaptive responses and aging. *J. Radiat. Res.* 45: 357-372.
34. Mullins, D.N. Crawford, E.L. Khuder, S.A. Hernandez, D.A. Yoon, Y. Willey, J.C. 2005. CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. *BMC Cancer.* 5(141): 1-14.
35. Mund, C. Beier, V. Berewunge, P. Dahms, M. Lyko, F. Hoheisel, J.D. 2005. Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of the tumor suppressor gene p16^{INK4A} promoter in colon carcinoma cell lines. *Nucleic Acid Res.* 33(8): 1-10.
36. Peltomäki, P. 2001. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10(7): 735-40.

37. Russell, E. 1968. Lifespan and aging patterns. Biology of the laboratory mouse. Second edition. Dover Publications. New York. U.S.A. Pp: 511-519.
38. Sainz, R.M. Reiter, R.J. Mayo, J.C. Cabrera, J. Tan, D-X. Qi, W. García, J.J. 2000. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: the effect of pinealectomy. *J. Reprod. Fertil.* 119(1): 143-149.
39. Sandoval-Guerrero, K. Revilla-Vázquez, A. Segura-Pacheco, B. Dueñas- González, A. 2005. Determination of 5-methyl-cytosine and cytosine in tumor DNA of cancer patients. 26(6): *Electrophoresis.* 1057-1062.
40. Santos-Guzmán, J. Arnhold, T. Nau, H. Wagner, C. Fahr, S.H. Mao, G.E. Caudill, M.A. Wang, J.C. Henning, S.M. Swendseid, M.E. Collins, M.D. 2003. Antagonism of hypervitaminosis-A induced anterior neural tube closure defects with a methyl-donor deficiency in murine whole-embryo culture. *J. Nutr.* 133(11):3561-3570.
41. Santuci-Darmanin, S. Paquis-Flucklinger, V. 2003. Les homologues de MutS et de MutL au cours de la méiose chez les mammifères. *Med Sci.* 19(1):85-91.
42. Scandalios, J.G. 2002. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* 3(7): 1019.1-1019.6.
43. Schulz, L. Tyler, J. 2005. Heterochromatin focuses on senescence. *Mol. Cell.* 14: 657-666.
44. Sun, L.Q. Lee, D.W. Zhang, Q. Xiao, W. Raabe, E.H. Meeker, A. Miao, D. Huso, D.L. Arceci, R.J. 2004. Growth retardation and premature aging

- phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev.* 18(9):1035-1046.
45. Szyf, M. Pakneshan, P. Rabbani, S.A. 2004. DNA methylation and breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* 68(6):1187-1197.
46. Toth, J.I. Yang, S.H. Qiao, X. Beigneux, A.P. Gelb, M.H. Moulson, C.L. Miner, J.H. Young, S. G. Fong, L.G. 2005. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(36): 12873-12878.
47. Westendorp, R.G.J. Kirkwood, T.B.L. 1998. Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature.* (396): 743-746.
48. Wu, G. Bazer, F.W. Cudd, T.A. Meininger, C.J. Spencer, T. E. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134(9): 2169-2172.
49. Yang, A.S. Estécio, M.R.H. Doshi, K. Kondo, Y. Tajara, E.H. Issa, J.P. 2004. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acid Res.* 32(3): 1-6.
50. Zhang, R. Poustovoitov, M. V. Ye, X. Santos, H.A. Chen, W. Daganzo, S.M. Erzberger, J.P. Serebriiskii, I.G. Canutescu, A.A. Dunbrack, R.L. Pehrson, J.R. Berger, J.M. Kaufman, P.D. Adams, P.D. 2005. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell.* 8(1):19-30.