

# Nuevos métodos de diagnóstico molecular

TRANSCRIPTÓMICA (MARN Y MIR) *pág. 155* EPIGENÓMICA *pág. 160*  
 LA PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO: APLICACIÓN EN EL HEPATOCARCINOMA *pág. 172*

## Puntos clave

En el núcleo de los mamíferos, el ADN está asociado a unas proteínas llamadas histonas en un complejo dinámico llamado cromatina.

La epigenética engloba el estudio de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, y los ARN no codificantes.

La metilación del ADN es el fenómeno epigenético más estudiado, y los tres métodos básicos para su estudio incluyen el tratamiento con bisulfito sódico, el tratamiento con endonucleasas y el enriquecimiento por afinidad.

El análisis por *microarray* y la aplicación de la secuenciación de nueva generación al estudio de la metilación suponen los avances más significativos en el estudio de este fenómeno.

## Epigenómica

FRANCESC BALAGUER Y LETICIA MOREIRA

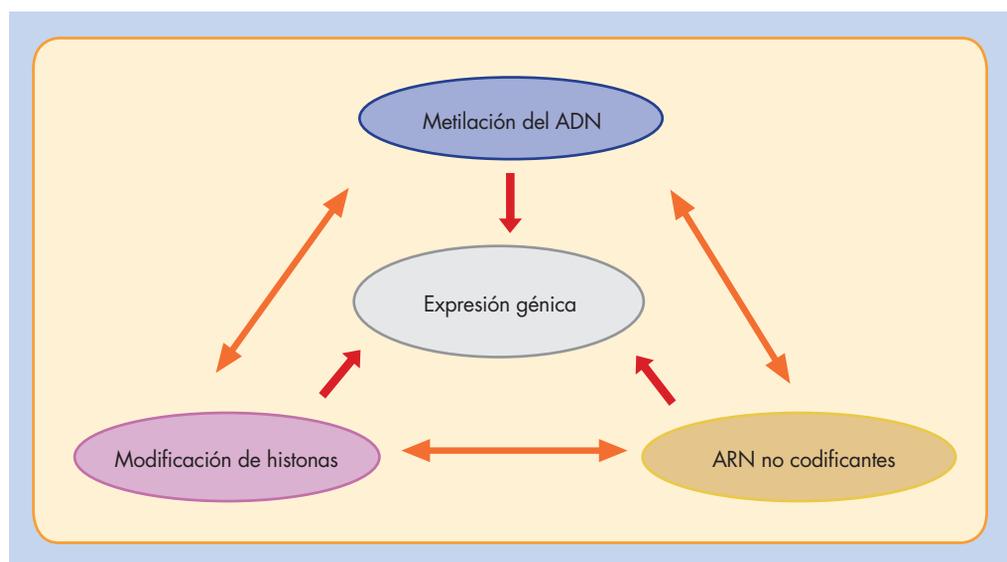
Servicio de Gastroenterología. Hospital Clínic. Barcelona. España.

En biología, la epigenética hace referencia a los cambios heredables en la expresión génica no debidos a cambios en la propia secuencia del ADN, y la epigenómica al estudio de los mecanismos epigenéticos<sup>1</sup>. La regulación epigenética, que determina la expresión génica de una determinada célula y por tanto su diferenciación, es fundamental en el desarrollo del ser humano, de modo que alteraciones en la maquinaria epigenética causan diversas enfermedades, entre las que se incluye el cáncer<sup>2</sup>. En el núcleo de los mamíferos, el ADN está asociado a unas proteínas llamadas histonas en un complejo dinámico llamado cromatina<sup>3</sup>. En este complejo, diversos mecanismos moleculares, entre los que se encuentran la metilación del ADN y diversas modificaciones covalentes de las histonas, participan en la conformación de la cromatina favoreciendo o inhibiendo la expresión génica. Por otro lado, los ARN no codifican-

tes, entre los que se encuentran los microARN, también regulan la expresión de los genes<sup>4,5</sup> (fig. 1).

## Análisis de la metilación del ADN

La modificación epigenética más estudiada en humanos es la metilación del ADN, que típicamente ocurre en el contexto de los llamados sitios CpG<sup>6</sup>. Debido a una mayor mutabilidad, los dinucleótidos CpG se encuentran infrarrepresentados en el genoma. Sin embargo, determinadas regiones del genoma son ricas en sitios CpG (las llamadas islas CpG), localizándose habitualmente en la región promotora de hasta un 40% de los genes<sup>2,3,7,8</sup>. Estas islas CpG se encuentran habitualmente no metiladas, favore-



**Figura 1.** Mecanismos epigenéticos. La expresión génica viene determinada por tres mecanismos que interactúan entre sí: la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de las histonas (metilación, acetilación, fosforilación, etc.) y los ARN no codificantes.

## Lectura rápida



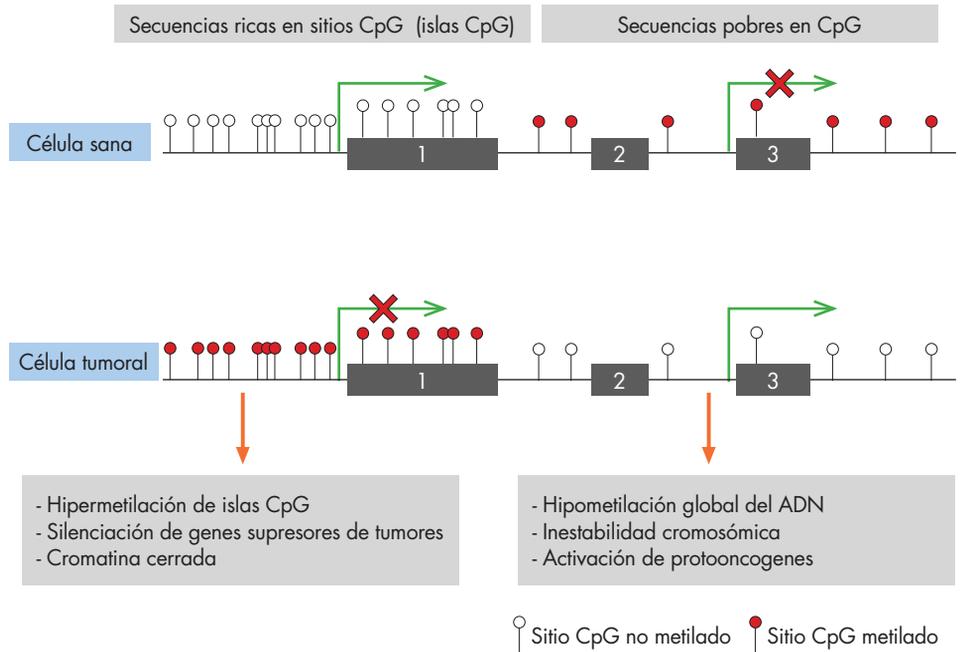
La epigenética hace referencia a los cambios heredables en la expresión génica no debidos a cambios en la propia secuencia del ADN.

En el núcleo de los mamíferos, el ADN está asociado a unas proteínas llamadas histonas en un complejo dinámico llamado cromatina.

La epigenética engloba el estudio de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, y los ARN no codificantes.

La modificación epigenética más estudiada en humanos es la metilación del ADN, que típicamente ocurre en el contexto de los llamados sitios CpG y su presencia se asocia a silenciación génica.

En el cáncer, el patrón de metilación característico consiste en la hipermetilación de genes supresores de tumores, que conlleva su silenciación, y la hipometilación global del ADN, que contribuye a la expresión de protooncogenes e inestabilidad cromosómica.



**Figura 2.** Alteración del patrón de metilación del ADN en el cáncer. En las células sanas, las islas CpG de genes supresores de tumores (1) se encuentran habitualmente no metiladas, de forma que el gen se expresa normalmente. Por otro lado, las secuencias repetitivas del ADN (2, 3) se encuentran metiladas y silenciadas. En el cáncer, el patrón de metilación se invierte, promoviendo la silenciación de genes supresores de tumores, y la reexpresión de secuencias repetitivas y protooncogenes.

ciendo la expresión génica en presencia de factores de transcripción. Sin embargo, en el contexto de diversas enfermedades, fundamentalmente en el cáncer, la hipermetilación de estas islas CpG conlleva la silenciación génica. Si esto ocurre en genes supresores de tumores, la metilación del ADN desempeña un papel clave en la carcinogénesis<sup>9</sup>. Por otro lado, las secuencias repetitivas del ADN, llamadas también secuencias parasíticas, se encuentran habitualmente metiladas y silenciadas. El mantenimiento de esta metilación es fundamental para preservar la integridad cromosómica. Aunque menos estudiado, la hipometilación global del ADN, y por tanto la expresión de estas secuencias repetitivas, es un fenómeno frecuente en el cáncer, y contribuye a las alteraciones cromosómicas características en la carcinogénesis<sup>10</sup> (fig. 2).

El análisis de la metilación ha experimentado una revolución durante la última década, especialmente desde la adaptación de la tecnología de *microarray* al estudio de metilación y la aparición de la secuenciación de nueva generación<sup>11,12</sup>. En esta actualización se revisarán brevemente los fundamentos del análisis de metilación, especialmente en relación con el tratamiento con bisulfito sódico, centrándonos en algunas de las técnicas más usadas en la actualidad.

Dado que la información de la metilación del ADN se borra tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (debido a la ausencia de me-

tiltransferasas que mantengan el patrón de metilación), la gran mayoría de técnicas se basan en un tratamiento metil-dependiente previo a la amplificación o hibridación<sup>13-16</sup>. Existen tres aproximaciones posibles: tratamiento con bisulfito sódico, tratamiento con enzimas de restricción, y enriquecimiento por afinidad. En función de la cobertura deseada, las técnicas se clasifican en análisis *locus*-específico, basado en gel, basado en *microarray* y basado en secuenciación de nueva generación<sup>11,12</sup> (tabla 1).

### Tratamiento con bisulfito sódico

El tratamiento del ADN con bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos (y timinas tras la reacción de PCR), sin modificar las citosinas metiladas<sup>17,18</sup> (fig. 3A). Por tanto, este tratamiento convierte un fenómeno epigenético en una diferencia genética y, en consecuencia, analizable mediante diferentes técnicas. Este método se considera el patrón oro, dada su potencial alta resolución cuando se combina con métodos de secuenciación.

### Análisis *locus* específico

Entre las técnicas no cuantitativas, una de las más usadas ha sido la metilación específica mediante PCR (MSP)<sup>19</sup>, en la que tras la modificación con bisulfito, se realiza una reacción de PCR usando dos sets de cebadores diseñados para amplificar el estado metilado y el no me-

tilado por separado (fig. 3B). Esta técnica tiene la ventaja de ser muy sensible, sin embargo, es poco específica y no cuantitativa.

Entre las técnicas cuantitativas, la secuenciación por bisulfito se ha considerado el patrón oro para el mapeo del estatus de metilación de una región específica<sup>17</sup>. En este método, tras amplificar una región de ADN bisulfitado usando cebadores sin sitios CpG (con lo que se amplifican tanto los alelos metilados como los no metilados), el producto de PCR se liga en un plásmido y se clona usando células competentes (bacterias). Posteriormente, se seleccionan colonias de forma individual, se aísla el plásmido y se secuencia la región de interés. Si se secuencia un número suficiente de clonas, este método puede ser cuantitativo y permite un análisis alelo-específico (fig. 3C).

La pirosecuenciación de ADN bisulfitado permite un análisis cuantitativo y preciso de la metilación basándose en la secuenciación por síntesis<sup>20</sup> (fig. 4). A diferencia de la secuenciación Sanger, basada en dideoxinucleótidos terminadores, esta técnica se fundamenta en la detección de la liberación de pirofosfato tras la incorporación de un nucleótido en una cadena de ADN mediante una reacción de luciferasa. Así, la pirosecuenciación consiste en la extensión de un cebador sobre una cadena simple de ADN, de modo que la incorporación de cada nucleótido genera una intensidad de luz proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados. Dado que el tratamiento con bisulfito

genera un polimorfismo C/T en los sitios CpG (C = alelos metilados; T = alelos no metilados), la pirosecuenciación permite cuantificar el porcentaje de metilación en cada sitio CpG en una región de hasta 50 pares de bases (fig. 4).

La técnica MethyLight, basada en la técnica MSP, permite un análisis cuantitativo de la metilación usando PCR en tiempo real<sup>21</sup>. Para ello, se utiliza una sonda fluorescente que tan solo se hibrida en la secuencia metilada, de modo que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la presencia de alelos metilados. Esta técnica requiere del análisis de un control 100% metilado (habitualmente ADN artificialmente metilado con la enzima *SssI*) como calibrador, y de la amplificación de un gen control endógeno para normalizar la cantidad de ADN utilizada para cada muestra.

### Análisis del genoma a gran escala

El tratamiento con bisulfito reduce de forma drástica la complejidad del ADN, dado que las citosinas no metiladas se convierten en timinas y, por tanto, la gran mayoría del genoma se reduce a tres bases (A, G y T) en lugar de cuatro. Este hecho resulta en una disminución de la especificidad en la hibridación, por lo que se requiere del diseño de ensayos específicos para el genoma bisulfitado.

Illumina Inc. ha aplicado su plataforma de *microarray* Infinium® al análisis de metilación por *microarray*<sup>22</sup>. En este ensayo, tras una amplificación del genoma bisulfitado, se procede a

## Lectura rápida



Dado que la información de la metilación del ADN se borra tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la gran mayoría de técnicas de estudio de la metilación se basan en un tratamiento metil-dependiente previo a la amplificación o hibridación: tratamiento con bisulfito sódico, tratamiento con enzimas de restricción y enriquecimiento por afinidad.

El tratamiento del ADN con bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos (y timinas tras la PCR), sin modificar las citosinas metiladas.

Pese a que el bisulfito sódico se considera el patrón oro para el análisis de metilación, su principal limitación reside en la reducción de la complejidad en la secuencia del ADN.

Dentro de las técnicas de análisis *locus* específico se encuentran la metilación específica mediante PCR (MSP), la secuenciación por bisulfito, la pirosecuenciación y MethyLight.

La pirosecuenciación de ADN bisulfitado permite un análisis cuantitativo y preciso de la metilación basándose en la secuenciación por síntesis.



**Tabla 1.** Métodos de análisis de la metilación del ADN

Pre-tratamiento	Análisis <i>locus</i> -específico	Análisis en gel	Análisis en <i>array</i>	Secuenciación de nueva generación
Bisulfito sódico	Pirosecuenciación MethyLight Secuenciación por bisulfito	MSP COBRA	Infinium® BiMP	RRBS BC-seq BSPP WGBS
Endonucleasas	<i>HpaII</i> -PCR MS-MLPA	Southern-blot RLGS AIMS	DMH MCAM HELP MethylScope® CHARM MMASS	Methyl-seq MCA-seq HELP-seq MSCC
Afinidad (anticuerpos o proteínas MBD)	MeDIP-PCR		MeDIP mDIP mCIP MIRA	MeDIP-seq MIRA-seq

AIMS: amplification of inter-methylated sites; BC-seq: bisulfite conversion followed by capture and sequencing; BiMP: bisulfite methylation profiling; BSPP: bisulfite padlock probes; CHARM: comprehensive high-throughput arrays for relative methylation; COBRA: combined bisulfite restriction analysis; DMH: differential methylation hybridization; HELP: *HpaII* tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR; MeDIP-PCR: methylated DNA immunoprecipitation; MSP: methylation specific PCR; MBD: methyl-binding domain; MCAM: methylated CpG island amplification with microarray; MMASS: microarray-based methylation assessment of single samples; MeDIP, mDIP, mCIP: methylated DNA immunoprecipitation; MIRA: methylated CpG island recovery assay; MSCC: methylation-sensitive cut counting; MS-MLPA: methylation-specific multiplex ligation probe amplification; RLGS: restriction landmark genome scanning; RRBS: reduced representation bisulfite sequencing; WGBS: whole-genome shotgun bisulfite sequencing; -seq: sequencing.

## Lectura rápida



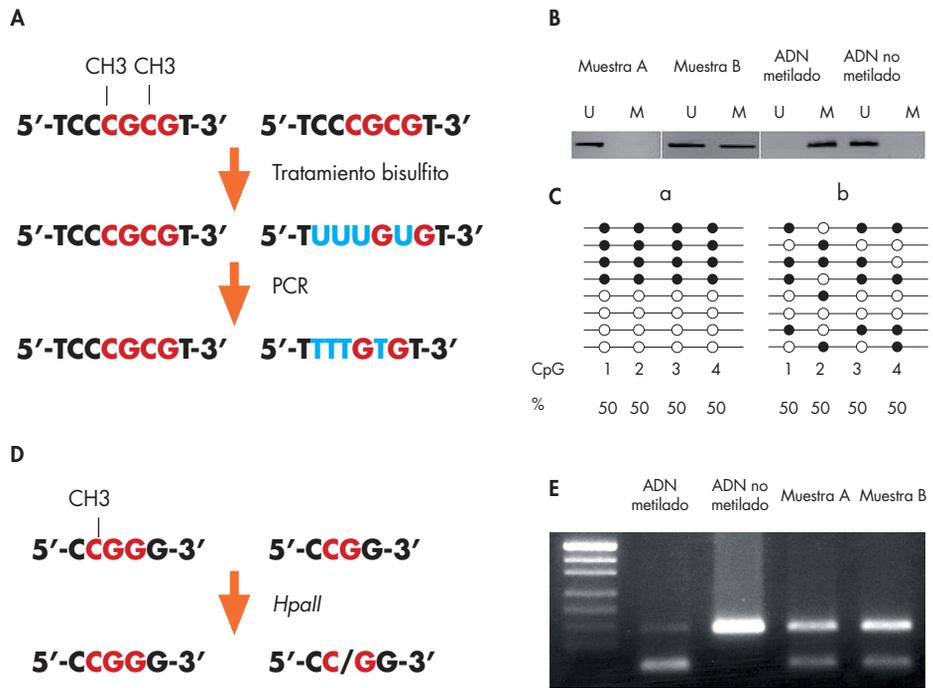
El análisis del genoma a gran escala de ADN bisulfitado puede realizarse mediante tecnología de *microarray* o por secuenciación de nueva generación.

La existencia de enzimas de restricción o endonucleasas metil-sensibles ha sido ampliamente usado para el análisis de metilación.

Los principales inconvenientes de las endonucleasas son una alta tasa de falsos positivos por digestión incompleta, y la falta de una cobertura pangénómica.

Las endonucleasas se han usado principalmente en el análisis de la metilación por *microarray*, aunque también se han utilizado para reducir la complejidad del ADN en la secuenciación de nueva generación.

La captura de la fracción metilada del ADN mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra las citosinas metiladas, o bien con proteínas que se unen al ADN metilado, constituye otro método de estudio de la metilación del ADN.



**Figura 3.** Métodos de estudio del ADN. **A.** Tratamiento con bisulfito sódico. El bisulfito sódico consiste en una reacción química de deaminación en la que las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas (indicadas con el grupo metilo -CH<sub>3</sub>) permanecen como tales. Tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los uracilos son substituidos por timinas. **B.** Metilación específica mediante PCR (MSP). En esta técnica se realizan dos reacciones de PCR independientes para el estatus metilado (M) y el no metilado (U), con cebadores complementarios al estatus metilado y no metilado, respectivamente. Se requiere el uso de controles positivos (metilado) y negativos (no metilado). **C.** Ejemplo de secuenciación por bisulfito de 4 sitios CpG mostrando en la parte inferior el porcentaje de metilación hipotético obtenido mediante una técnica no alelo-específica. Puede observarse cómo dos situaciones completamente diferentes pueden dar lugar a resultados similares. **D.** Mecanismo de acción de HpaII. Esta enzima corta el ADN en las secuencias CCGG no metiladas. **E.** Análisis de metilación por COBRA. El tratamiento con BstUI tras la conversión con bisulfito corta solo las secuencias metiladas, por lo que la presencia de una banda de menor tamaño indica la presencia de metilación.

fragmentar el ADN e hibridarlo con sondas de oligonucleótidos metil-específicas, generando una señal fluorescente independiente para el estatus metilado y no metilado. Esta tecnología permite el análisis cuantitativo de la metilación en 27.578 sitios CpG correspondientes a 14.495 genes codificantes y 110 microARN, ofreciendo por tanto una cobertura razonable, con la posibilidad de analizar múltiples muestras de forma simultánea.

La secuenciación de nueva generación (*next-generation sequencing*) ha sido aplicada recientemente al análisis de metilación de ADN bisulfitado, permitiendo analizar todo el metiloma con alta resolución<sup>23-25</sup>. Actualmente existen varias plataformas de secuenciación de nueva generación: Solexa Sequencing, de Illumina Inc.; SOLiD™ System, de Applied Biosystems; HeliScope™ Single Molecule Sequencer, de Helicos Biosciences; 454 Sequencing, de Roche, y SMRT™, de Pacific Biosciences. Todas las plataformas apro-

vechan el procesado masivo en paralelo de cientos de millones de secuencias de ADN de forma simultánea, y de la secuenciación basada bien en el método Sanger bien en la pirosecuenciación. Dado que tan solo el 1-6% de todas las citosinas se encuentran normalmente metiladas, y la baja complejidad del ADN bisulfitado, se han aplicado diferentes estrategias para reducir el estudio a las zonas ricas en sitios CpG<sup>26,27</sup> (fig. 5). La secuenciación base a base del primer metiloma humano se ha publicado recientemente utilizando un método llamado Methyl-CSeq basado en la plataforma Solexa<sup>28</sup>. Este estudio ha puesto de manifiesto resultados inesperados en relación a la metilación de citosinas que no están en contexto de sitios CpG, y su potencial papel en la regulación de la expresión génica. Pese a que esta tecnología ofrece una aproximación no sesgada y sistemática de la metilación, su elevado coste todavía limita el analizar un número elevado de muestras.

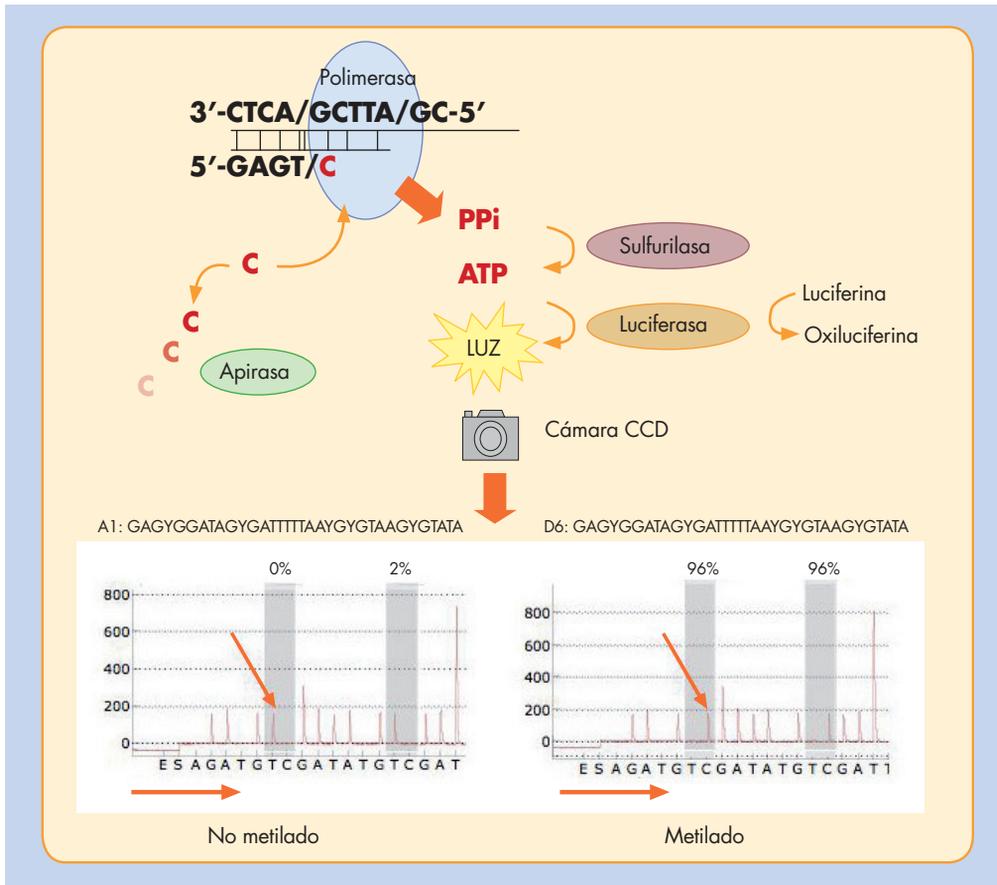
## Bibliografía recomendada

American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force; European Union, Network of Excellence, Scientific Advisory Board. Moving AHEAD with an International human epigenome project. *Nature*. 2008;454:711-5.

Artículo en el que se resumen los principios de la alianza internacional para el estudio del epigenoma humano (AHEAD, Alliance for the Human Epigenome and Disease).

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-59.

Artículo de revisión en el que se repasan los conceptos básicos en epigenética (metilación del ADN, código de las histonas, etc.), se describen las principales alteraciones epigenéticas durante la carcinogénesis, y se discute el potencial de los fármacos epigenéticos en el tratamiento del cáncer.



**Figura 4.** Pirosecuenciación de ADN bisulfitado. La parte superior de la figura muestra la naturaleza bioquímica de la técnica, basada en la generación de luz mediante la luciferasa. La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados a la cadena de ADN. La parte inferior muestra un ejemplo de pirograma en el que los sitios CpG (indicados en fondo gris) representan un polimorfismo C/T. Dado que la intensidad de luz de C y T corresponde a una misma posición en la cadena de ADN, esta técnica permite cuantificar la proporción de secuencias metiladas para cada sitio CpG (indicado en cuadros con fondo azul).

### Digestión por endonucleasas

Una enzima de restricción (endonucleasa) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción. La presencia de metilación en el sitio de restricción puede inhibir la acción de determinadas enzimas, por lo que el patrón de acción de estas enzimas puede ser usado para determinar el estatus de metilación de un determinado locus (fig. 3C).

Los inconvenientes de las endonucleasas son, por un lado, la presencia de una alta tasa de falsos positivos debido a una digestión incompleta, y por otro, que cuando se usa para un análisis pangenómico, el estudio de metilación está sesgado a las zonas con más metilación<sup>11</sup>.

### Análisis locus específico

Una de las técnicas más usadas ha sido la llamada COBRA (*combined bisulphite restriction analysis*)<sup>29</sup>, que combina una reacción de bisul-

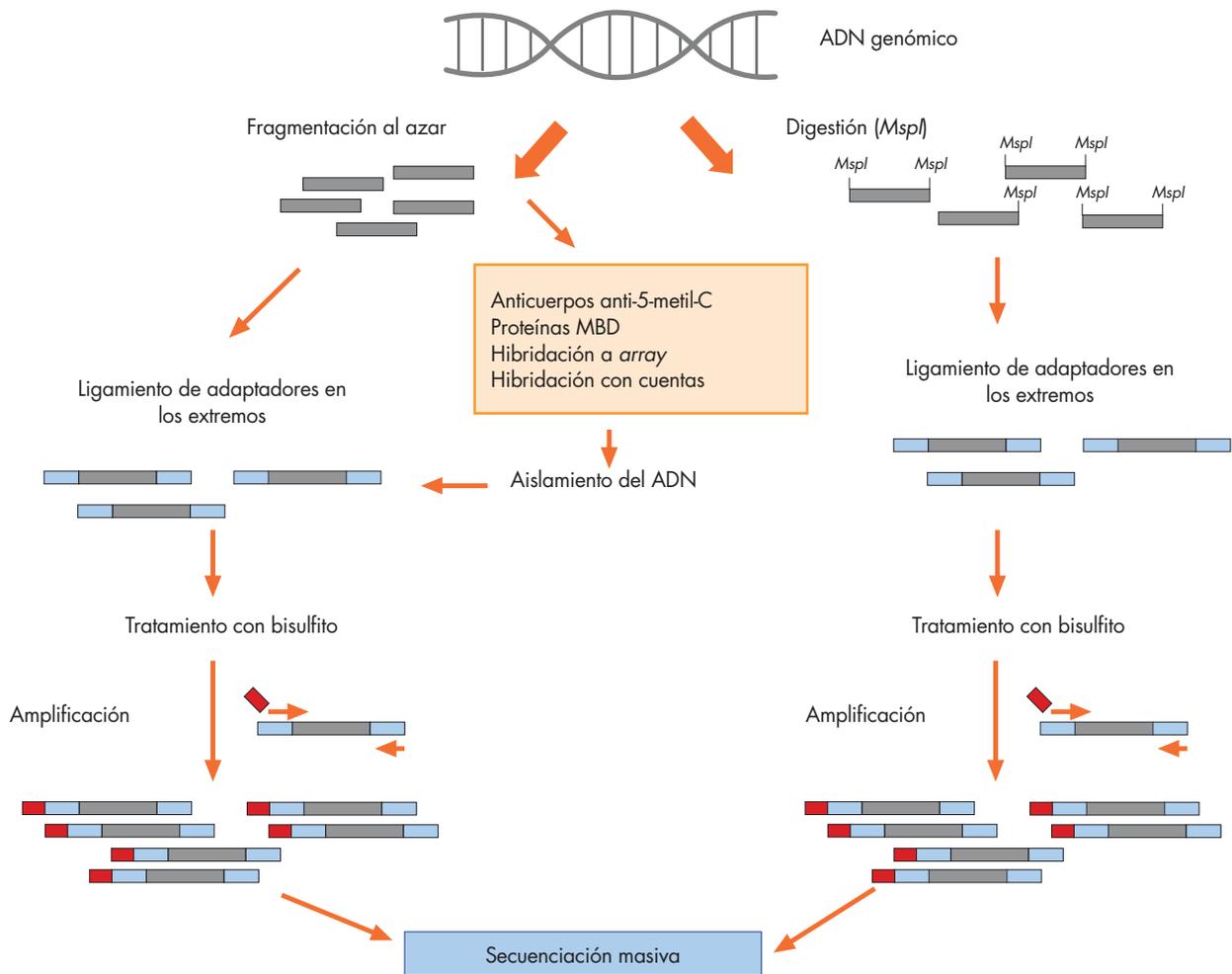
fito inicial, seguida de una digestión del producto de PCR con una enzima de restricción, y finalmente la separación de los fragmentos en un gel (fig. 3D). Esta técnica permite un análisis cuantitativo de la metilación, dado que la cantidad de producto digerido es proporcional al estatus de metilación de un determinado locus.

La técnica MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation probe amplification*) constituye otra alternativa para el análisis semicuantitativo de la metilación. Este método consiste en una adaptación de la técnica MLPA usada para el análisis de la variación en el número de copias, añadiendo una reacción de digestión mediante una endonucleasa metilsensible (*HhaI*)<sup>30</sup>.

### Análisis del genoma a gran escala

Dada la dificultad inicial en el desarrollo de *microarrays* basados en ADN bisulfitado, se han desarrollado múltiples modificaciones del método de enzimas de restricción aplicadas al estudio mediante *microarray* con el objetivo de incrementar la sensibilidad y especificidad del





**Figura 5.** Secuenciación de nueva generación aplicada al estudio de la metilación. Representación esquemática de las distintas estrategias utilizadas para analizar la metilación mediante la secuenciación de nueva generación. Metil-C: metil-citosina; MBD: methyl binding domain.

método<sup>31</sup>. Algunos de estos métodos (por ejemplo, MCAM)<sup>32</sup> aprovechan la existencia de los llamados isosquizómeros, que son enzimas que reconocen un mismo sitio de restricción, pero presentan diferente sensibilidad a la presencia de metilación (por ejemplo, *SmaI* y *XmaI*). Este tratamiento permite simplificar el genoma facilitando su amplificación de una forma no sesgada. Sin embargo, los *microarrays* basados en enzimas de restricción no son realmente pangenómicos, dado que la digestión ocurre preferentemente en aquellas zonas del genoma con más metilación. Algunas de las técnicas más usadas se detallan en la tabla 1.

El uso de enzimas de restricción, en combinación o no con el tratamiento con bisulfito sódico, unido a la secuenciación de nueva generación, constituye una nueva y excitante herramienta para el estudio de metilación<sup>11,31,33</sup> (fig. 5). Por ejemplo, la técnica RRBS (*reduced representation bisulphite sequencing*) simplifica la redundancia del ADN bisulfitado mediante la selección de fragmentos de ADN cortados mediante enzimas de restricción (*BglIII* o *MspI*)<sup>34</sup>.

### Técnicas de afinidad

Otra estrategia para el análisis de metilación consiste en capturar la fracción metilada del ADN mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra las citosinas metiladas, o bien proteínas que se unen al ADN metilado (*methyl binding domain proteins* o MBD)<sup>35,36</sup>. Este principio ha sido ampliamente usado tanto para estudio mediante *microarray*<sup>36-38</sup>, como recientemente en la secuenciación de nueva generación<sup>39</sup> (fig. 5). Algunas de las técnicas basadas en este principio se detallan en la tabla 1.

### Bibliografía

GH [www.ghcontinuada.com](http://www.ghcontinuada.com)  
Encontrará enlaces a los resúmenes de esta bibliografía

● Importante ●● Muy importante

1. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 1:R95-101.
2. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286-98.

3. ● **Esteller M. Epigenetics in cancer.** *N Engl J Med.* 2008;358:1148-59.
4. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857-66.
5. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:87-95.
6. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042-54.
7. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457-63.
8. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:143-53.
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
10. ● Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415-28.
11. ●● **Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis.** *Nat Rev Genet.* 2010;11:191-203.
12. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31-46.
13. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques.* 2002;33:632, 634, 636-49.
14. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:253-66.
15. Pomraning KR, Smith KM, Freitag M. Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods.* 2009;47:142-50.
16. Schones DE, Zhao K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet.* 2008;9:179-91.
17. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:1827-31.
18. Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res.* 1980;8:4777-90.
19. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9821-6.
20. Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis.* 2002;23:4072-9.
21. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:E32.
22. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay. *Epigenomics.* 2009;1:177-200.
23. Korshunova Y, Maloney RK, Lakey N, Citek RW, Bacher B, Budiman A, et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res.* 2008;18:19-29.
24. Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, Guo J, Duff DJ, Xu D, et al. Ultra-deep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res.* 2007;67:8511-8.
25. Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature.* 2008;452:215-9.
26. Gu H, Bock C, Mikkelsen TS, Jager N, Smith ZD, Tomazou E, et al. Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat Methods.* 2010;7:133-6.
27. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 2008;454:766-70.
28. ● **Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.** *Nature.* 2009;462:315-22.
29. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2532-4.
30. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e128.
31. Estecio MR, Issa JP. Tackling the methylome: recent methodological advances in genome-wide methylation profiling. *Genome Med.* 2009;1:106.
32. Estecio MR, Yan PS, Ibrahim AE, Tellez CS, Shen L, Huang TH, et al. High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res.* 2007;17:1529-36.
33. Brunner AL, Johnson DS, Kim SW, Valouev A, Reddy TE, Neff NF, et al. Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Res.* 2009;19:1044-56.
34. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:5868-77.
35. Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet.* 1994;6:236-44.
36. **Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome.** *Nat Genet.* 2007;39:457-66.
37. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet.* 2006;38:149-53.
38. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005;37:853-62.
39. Down TA, Rakyan VK, Turner DJ, Flicek P, Li H, Kulesha E, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nat Biotechnol.* 2008;26:779-85.

## Bibliografía recomendada

**Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis.** *Nat Rev Genet.* 2010;11:191-203.

*Artículo de revisión en el que se describen los principios del estudio de la metilación, haciendo especial énfasis en las técnicas de estudio del metiloma a gran escala.*

**Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.** *Nature.* 2009;462:315-22.

*Este estudio describe, por primera vez, el metiloma humano con resolución base a base utilizando tecnología de secuenciación de nueva generación.*