

Análisis del imprinting genómico en neuronas tetraploides

Álvaro Gómez Jiménez^{1,2*} y José María Frade López²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, España.

Resumen

En las células diploides, la mayoría de genes tienen dos copias, localizadas en el cromosoma materno y el cromosoma paterno. El *imprinting* es una de las excepciones a esta regla. En humanos, aproximadamente 100 genes se encuentran sujetos a *imprinting*, de forma que sólo el alelo paterno o el materno de un gen está activo. A día de hoy, se piensa que el silenciamiento de genes con *imprinting* ocurre en la línea germinal, y que este estado se mantiene en los tejidos somáticos después de la fertilización. El descubrimiento en el sistema nervioso de vertebrados de neuronas tetraploides, con el doble de contenido de DNA debido a la realización de una fase S sin mitosis posterior, y el interés por su caracterización morfológica y fisiológica, nos llevó a realizar este estudio para comprobar si el *imprinting* genómico se ve alterado en este tipo de neuronas. Tras aislar núcleos de neuronas 2C y 4C mediante citometría de flujo, y realizar una modificación del DNA con bisulfito sódico, se analizó mediante secuenciación la región cromosómica en la que se encuentra el gen *Snrpn*, por ser una de las regiones con *imprinting* más estudiadas. La existencia de enfermedades relacionadas con el *imprinting*, como el síndrome de Prader-Willi o el síndrome de Angelman, hacen de especial interés, además, la búsqueda de las consecuencias fisiológicas y/o patológicas del aumento de la dosis de un gen con esta característica en la tetraploidía neuronal.

Palabras clave: tetraploidía neuronal; ciclo celular; endorreduplicación; *imprinting*; *Snrpn*; enfermedad de Alzheimer.

Cita: Álvaro Gómez Jiménez, José María Frade López (2015) Análisis del imprinting genómico en neuronas tetraploides. *Dianas* 4(1): e20150906. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150906. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 23 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Álvaro Gómez Jiménez et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** alvaro.gj91@gmail.com



Introducción

Tetraploidía neuronal

El sistema nervioso (SN) de los vertebrados se ha considerado clásicamente constituido por neuronas con un contenido de DNA diploide [1]. Sin embargo, en el año 1968 Lowell W. Lapham introdujo la primera idea de tetraploidía neuronal (en sentido laxo, pues no se puede determinar el número de cromosomas, al tratarse de células que no proliferan) en el SN, indicando que las células de Purkinje eran tetraploides [2]. A día de hoy, se ha podido confirmar la presencia de neuronas tetraploides en diferentes regiones del sistema nervioso central de pollo [3, 4] y de ratón [3, 5], e igualmente se ha demostrado que hasta el 10% de las neuronas de la corteza cerebral humana son hiperploides [6].

Se ha observado que con la edad, y también en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [7-10], la aparición de neuronas tetraploides o el aumento del número de estas neuronas es un evento importante [11].

Endorreduplicación y neuronas tetraploides

El ciclo celular canónico da como resultado dos células hijas diploides, con un contenido 2C de DNA, igual al de la célula madre. Sin embargo, existen variaciones del ciclo celular en las cuales resultan células poliploides, es decir, con un contenido de DNA superior a 2C. Este hecho se ha presentado frecuentemente en todo el reino animal y vegetal, y no sólo en condiciones patológicas, concepción que se tiene habitualmente, ya que se ha demostrado que en vertebrados supone un mecanismo de defensa

frente al estrés celular, los estímulos de inducción a apoptosis o las mutaciones que pueden originar cáncer [12-14].

Endorreduplicación
G1→S→G2→S→G

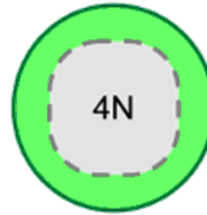


Figura 1. Esquemas del mecanismo de endorreduplicación [15].

La observación de neuronas que incorporan BrdU durante la fase de diferenciación neuronal en la retina de embriones de pollo [3] sugiere que la endorreduplicación es el mecanismo por el cual se forman las neuronas tetraploides. Es un mecanismo que se da frecuentemente en la naturaleza (Angiospermas, moluscos, artrópodos, e incluso organismos superiores, como los anfibios) y que está caracterizado por la realización de la fase S sin mitosis posterior, causando la poliploidía (figura 1). Para ello es necesario que disminuya la actividad CDK/ciclina [13, 15].

La endorreduplicación está normalmente asociada con la hipertrofia celular [13, 15], consistente con el aumento del diámetro del soma y mayor árbol dendrítico en comparación con las neuronas diploides homólogas [3], lo cual se ha comprobado tanto en *Xenopus laevis* [16], como en RGCs de pollo [3]. Se ha demostrado que las neuronas tetraploides son funcionalmente activas [5], y asimismo, tienen un papel fisiológico puesto que se encuentran asociadas a neuronas de proyección que inervan regiones subcorticales [5] y del tecto óptico [3]. Así pues, este fenómeno indicaría un aumento de la diversidad neuronal con la finalidad de inervar regiones específicas del SN [4].

Sin embargo, la neurodegeneración, como la producida por la enfermedad de Alzheimer, está a menudo asociada a la reentrada en ciclo celular de las neuronas [17]. Específicamente en Alzheimer, hay evidencias de la presencia de neuronas tetraploides en la corteza cerebral normal, y también del aumento del número de neuronas tetraploides en la corteza afectada por la enfermedad [6], e incluso se ha demostrado que concretamente las neuronas que aumentan su contenido de DNA son las que mueren selectivamente en estadios más tardíos de la enfermedad [10]. Así pues, los cambios funcionales en las neuronas afectadas, derivados de los cambios morfológicos, podrían participar en el curso de la enfermedad.

Imprinting

En las células diploides, todos los genes tienen dos copias, localizadas en el cromosoma materno y el cromosoma paterno. En la mayor parte de los casos, ambas copias son susceptibles de expresarse, pero en los animales marsupiales y placentarios hay dos excepciones a esta regla: los genes en el cromosoma X en las hembras, y los genes con *imprinting*.

En humanos, aproximadamente 100 genes se encuentran sujetos a *imprinting*. Como consecuencia, sólo el alelo paterno o el alelo materno de un gen está activo en las células somáticas de los descendientes [18]. El silenciamiento de genes con *imprinting* ocurre en la línea germinal, y se piensa que este estado se mantiene en los tejidos somáticos después de la fertilización [19].

Entre las funciones que pueden tener estos genes se encuentran el control del crecimiento prenatal, el desarrollo de determinados linajes, el correcto funcionamiento del cerebro, y la homeostasis energética postnatal [20].

Los genes con *imprinting* se encuentran a menudo agrupados en dominios o *clusters* cromosómicos de varias megabases de tamaño, existiendo mecanismos reguladores del *imprinting* específicos para cada dominio. El estudio detallado de los dominios de *imprinting* ha revelado algunas características comunes. La primera es que todos los grupos tienen una región de control del *imprinting* (*Imprinting Control Region*, ICR) que es normalmente de entre 1 y 5Kb de longitud, y que actúa en *cis* regulando el *imprinting* de múltiples genes de un grupo a lo largo del dominio. En todos los casos estudiados más detalladamente, se ha observado que presenta regiones de DNA ricas en CG, llamadas islas CpG, que se encuentran diferentemente metiladas (*Differentially Methylated Region*, DMR). Estas regiones se requieren para mantener la expresión monoalélica parental de los genes con *imprinting* correspondientes. La segunda es que todos los grupos poseen al menos un RNA no codificante (*noncoding RNA*, ncRNA), es decir, un RNA que no se traduce a proteína, que normalmente se expresa en el alelo parental codificante opuesto (generalmente en el alelo materno), y múltiples genes codificantes de proteínas que se expresan generalmente en el alelo paterno [21].

Las enzimas fundamentales para llevar a cabo la metilación de un gen por la adición de un grupo metilo a una citosina de un dinucleótido CG son las DNA metiltransferasas (DNMT) [22]. Según su función se

conocen la DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La DNMT1 reconoce el nuevo DNA replicado formado por una hebra metilada y una hebra no metilada, y metila el CpG correspondiente. De este modo, se encarga de mantener el patrón de *imprinting*. La DNMT3, por su parte, realiza una metilación de novo. DNMT3A y DNMT3B difieren en su velocidad de metilación, siendo más rápida DNMT3A.

De las regiones cromosómicas con *imprinting* que hasta ahora se han descubierto en humanos, elegimos aquella en la que se encuentra el gen *Snrpn* para el estudio del *imprinting* genómico en neuronas tetraploides, al ser una de las regiones cromosómicas más estudiadas con esta característica [23-25].

El objetivo de este estudio será el análisis del *imprinting* genómico en neuronas tetraploides con el fin de comprobar si esta característica se mantiene también inalterada en esta población neuronal. Como perspectiva de futuro para este proyecto, se podría estudiar si la alteración o no del *imprinting* en neuronas tetraploides tiene alguna consecuencia a nivel fisiológico o patológico en el organismo.

Materiales y métodos

Ratones

Se utilizaron ratones C57 wild type (WT), en estadio postnatal P15.

Aislamiento de núcleos

Los hemisférios de ratón fueron procesados según el protocolo descrito por López-Sánchez et al. (2013), optimizado para la edad de estos ratones. Cada hemisférico de ratón fue introducido en 2mL de *buffer* de aislamiento de núcleos, formado por tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*, PBS) frío libre de DNAsas, con 0,1% de Tritón X-100 (Sigma), y una mezcla de inhibidor de proteasas 1X (Roche). A continuación fue disgregado mecánicamente usando un homogenizador *Dounce*. Tras ello se diluyó añadiendo 1mL de PBS frío, y el tejido indisociado se eliminó por una centrifugación a 200g durante 1,5min a 4°C. El sobrenadante fue diluido 8 veces con PBS frío, y centrifugado a 400g durante 4min a 4°C. El sobrenadante con *debris* celular fue descartado, y el *pellet*, incubado a 4°C en 150µL de PBS frío durante 10-30min. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 4mL de PBS. La calidad y pureza de los núcleos aislados fue comprobada en el microscopio después de teñir con 100ng/ml de DAPI.

Citometría de flujo

Para la tinción nuclear, en primer lugar se realizó un bloqueo con 1% de suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*, FCS) y 1,25mg/mL de albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) y se utilizó una alícuota como control de anticuerpo secundario. A la muestra se añadió anticuerpo primario (Mouse anti-NeuN (Millipore, ref. MAB377)) a una dilución 1:1.500, y anticuerpo secundario (Goat anti-mouse 488 (Alexa Invitrogen, ref. A11001)) a una dilución 1:500. La reacción se incubó *Overnight* a 4°C en oscuridad. Los núcleos teñidos se filtraron por una membrana de *nylon* estéril de 40µm, y fueron incubados durante 20min con yoduro de propidio (IP) (25-50µg/ml) y RNasa libre de DNAsas (25µg/ml). La calidad de los núcleos y la especificidad de la señal de la tinción fueron comprobadas mediante microscopía de fluorescencia.

La separación de núcleos 2C y 4C fue realizada mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro FACSAria (BD Biosciences) equipado con láseres doble argón (488nm) y helio-neón (633nm). Los datos fueron recogidos usando un proceso de señal digital lineal. Los filtros de emisión utilizados fueron BP 530/30 para Alexa 488 y BP 616/23 para el yoduro de propidio. Los datos se analizaron con el software FACSDiva (BD Biosciences). El *debris*, que se distinguía claramente de los núcleos por su incapacidad para incorporar yoduro de propidio, se excluyó del análisis. Se generaron histogramas según el contenido de DNA, excluyendo dobletes y agregados según las características de *Area* y *Height* (Nunez, 2001). Finalmente, se obtenían en torno a 10.000 núcleos 4C.

Aislamiento y purificación de DNA de núcleos

Se utilizó el DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen, ref. 69504) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Modificación del DNA con bisulfito

Tras cuantificar la concentración de DNA con Nanodrop (y asegurar una cantidad mínima de 100ng de DNA), y fragmentar el DNA a tamaños máximos de 30Kb pasando la muestra 10 veces a través de una jeringa de insulina, se utilizó el EpiTect Bisulfite Kit (Quiagen, ref. 59104) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Amplificación por PCR y extracción y purificación del DNA

Se utilizaron *primers* generados para amplificar específicamente un fragmento de las DMR del gen *Snrpn* modificado con bisulfito, diseñados mediante el software MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>).

SnrpnUp: 5' TTA GAG GGA TAG AGA TTT TTG TAT TG 3'

SnrpnDown: 5' CTA AAA TCC ACA AAC CCA ACT AAC 3'

Tamaño del fragmento: 215pb

Para generar los 50µL de producto de PCR, se realizó una ronda de amplificación utilizando: 5µL de 10X *buffer* de PCR (BioTools), 2µL de 50mM MgCl₂ (BioTools), 5µL de 2mM dNTPs (BioTools), 1µL de los *primers* a concentración 100µg/mL, 0,15U de Taq polimerasa (1U/µL)(BioTools), 2µL de DNA 2C/4C, o 2µL de H₂O miliq autoclavada en el caso del control de PCR. Las condiciones en el termociclador fueron: 5min a 94°C; 35 ciclos de 30seg a 94°C, 1min a 56°C y 1min a 72°C; 10min a 72°C.

Para confirmar la amplificación de *Snrpn*, 5µL de cada muestra se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y GelRed nucleic acid gel stain (BioTium, ref. 41003) a una dilución 1:20.000.

Se realizó un aislamiento de DNA de un gel preparativo de agarosa al 0,8%, cortando las bandas de amplificación y eluyendo el DNA utilizando columnas del kit Cut&Spin DNA Gel Extraction (GRiSP, ref. GS131.0250). A continuación se siguió un protocolo estándar de purificación de DNA mediante fenol-cloroformo.

Clonación y purificación de DNA plasmídico

Tras realizar una extensión de 15min a 72°C de los productos purificados de PCR, y una nueva purificación del DNA siguiendo un protocolo estándar mediante fenol-cloroformo, se clonaron los fragmentos de DNA en plásmidos pGEM-T Easy (Promega, ref. A1360), los cuales fueron aislados usando el kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, ref. A1222), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de restricción y Secuenciación

Aproximadamente 1µg de plásmidos fue digerido con la enzima de restricción EcoR1 (10U/µL) (Fermentas, ref. er0271) para determinar la presencia del inserto del tamaño esperado (215pb).

Tras la secuenciación del DNA, se analizaron los resultados con el software MegAlign y EditSeq (Lasergene).

Análisis estadístico

Todos los datos son representados como el promedio ± el Error Estándar de la Media (EEM). Las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando la prueba t de Student. Los datos fueron considerados significativos si $p < 0,05$. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Statistics (Blackwell Scientific Publications, London, UK).

Resultados y discusión

Aislamiento de núcleos de neuronas 2C y 4C

Tras procesar los hemisferios de ratones C57 WT de 15 días postnatales como se describe en el protocolo de López-Sánchez et al. [5] optimizado para dicha edad, y comprobar mediante microscopía el correcto estado de la muestra (figura 2), se procedió a la separación de los núcleos de neuronas 2C y 4C mediante citometría de flujo.

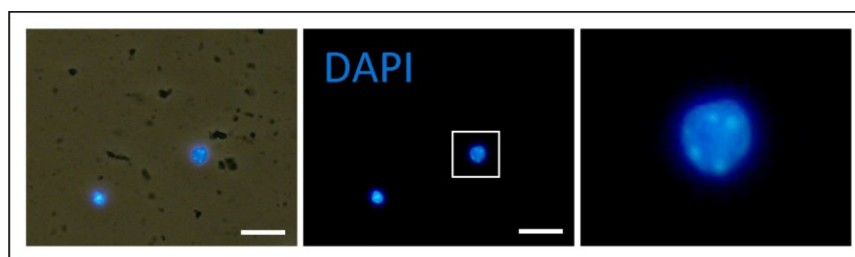


Figura 2. Imagen representativa del correcto estado de la muestra tomada con microscopio de fluorescencia, en la que se observa que los núcleos, teñidos con DAPI, no se encuentran deformados. La barra de escala indica un tamaño de 20µm.

Se generaron histogramas según el contenido de DNA, excluyendo dobletes (dos núcleos diploides) y agregados según las características de *Area* y *Height* [26] (figura 3). El *debris*, que se distingue de los núcleos por su incapacidad para incorporar yoduro de propidio, se excluyó del análisis. Tras un primer *sorting*, los porcentajes de núcleos tetraploides eran de aproximadamente el 30% de la fracción NeuN⁺ (consultar figura suplementaria 1 para ver el procedimiento de selección de poblaciones). Para aumentar la pureza de núcleos tetraploides, se realizó un segundo *sorting* de la muestra, consiguiendo una pureza de más de un 95% (figura 4).

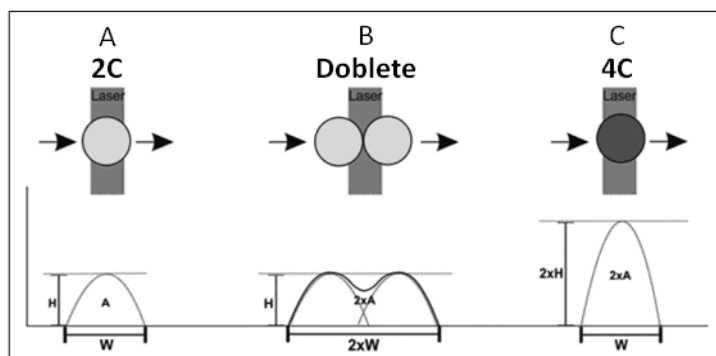


Figura 3. Imagen tomada de López-Sánchez et al. [5]. Esquema del método utilizado para discriminar dobletes. Al pasar por el láser un núcleo marcado con yoduro de propidio, la señal de fluorescencia se convierte en un pulso eléctrico, definido por su ancho (*Width*, W), su intensidad máxima (*High*, H), y su área integrada (A). La señal de un núcleo tetraploide (C) tiene el doble valor de H comparado con el de un núcleo diploide (A), mientras que un doblete (B) muestra una señal con el doble valor de W comparado con el de un núcleo diploide.

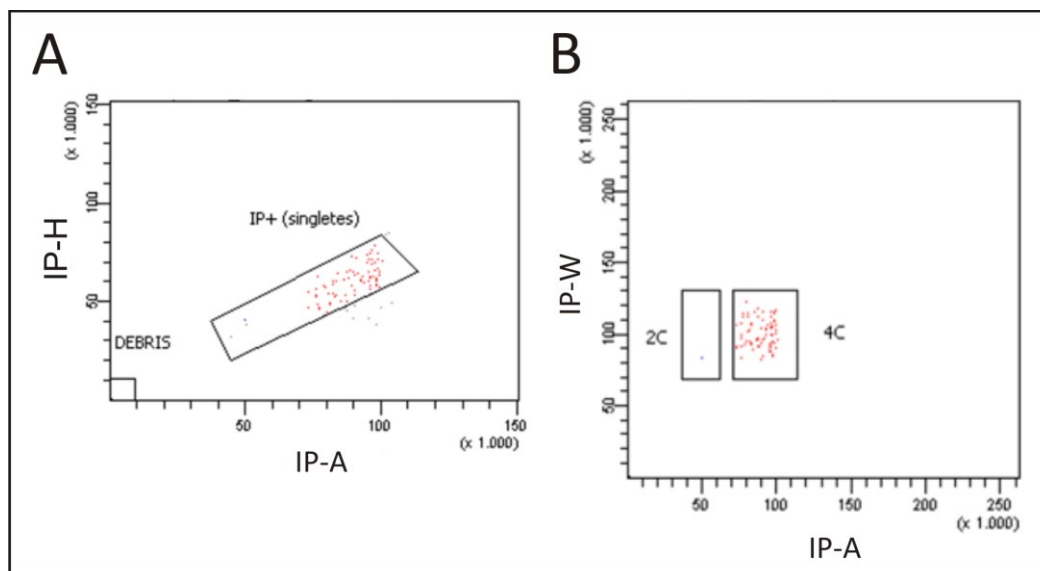


Figura 4. Confirmación del aislamiento y enriquecimiento de núcleos 4C. A partir de la muestra obtenida en un primer *sorting* (figura suplementaria 1), se repitió el proceso para enriquecer la muestra en núcleos 4C. El contenido de DNA fue evaluado a partir de la ventana de población de núcleos a partir de los niveles de IP-H frente a los niveles de IP-A (A), y también a partir de la ventana de población de núcleos, en la gráfica (B) de IP-W frente a IP-A.

Tras separar los núcleos, se aisló y purificó el DNA y se procedió a su modificación con bisulfito sódico, de modo que las citosinas de la secuencia no metilada son modificadas por uracilos, mientras que la secuencia metilada no se ve modificada.

Análisis del imprinting en neuronas diploides y tetraploides

La figura 5A representa el *cluster* de *imprinting* en el que se encuentra el gen *Snrpn*, entre otros, que se expresa a partir del alelo paterno. La secuencia en la que se encuentra *Snrpn* contiene dos regiones diferentemente metiladas (DMRs), y para este estudio elegimos una zona dentro de la DMR1 ya descrita anteriormente en diferentes artículos [27, 28], que incluye una porción del promotor y del sitio de inicio de transcripción del gen. En la figura 6B se muestra la secuencia completa del fragmento de amplificación con los oligos para *Snrpn*, en la que se ven las 13 CpGs incluidas en el fragmento que se analizarán.

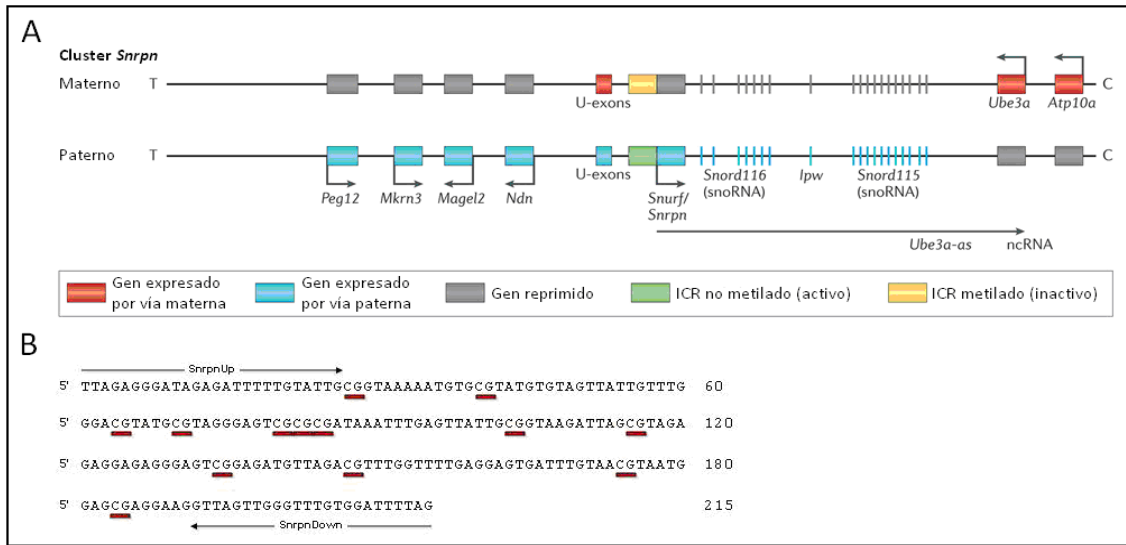


Figura 5. Esquema del *clúster* de *imprinting* (A) tomada de Peters et al., [29] en cuya ICR se encuentra localizado el fragmento de 215pb (B) utilizado para el estudio. Las 13 CpGs estudiadas en el fragmento se encuentran señaladas con una línea roja. Los *primers* utilizados para la amplificación se muestran con una flecha en la secuencia.

Tras modificar con bisulfito el DNA de 2C y 4C, se realizó la amplificación del fragmento por PCR, para comprobar que el tamaño era el esperado: 215pb. En la figura 6 se muestra el resultado tras realizar la electroforesis en gel de agarosa.

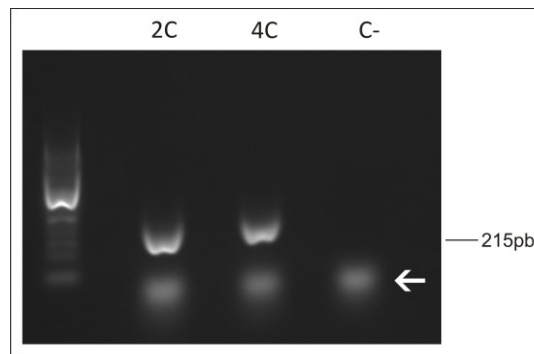


Figura 6. Imagen del resultado de la amplificación del fragmento de 215pb por PCR en 2C y 4C. Se utilizó como patrón un marcador de 100 pares de bases, y se añadió un control negativo (C-) con agua para mostrar la ausencia de contaminación. La flecha blanca indica la presencia de *primer-dimers*, que fueron posteriormente eliminados al realizar el gel preparativo para evitar contaminaciones en la secuencia.

El fragmento se clonó en bacterias *E. coli*, previo paso a la secuenciación. En la figura 7A se muestran dos esquemas representativos del estado de metilación en las CpGs estudiadas en neuronas 2C y 4C. En el Material suplementario, se muestran todos los esquemas del estado de metilación, obtenidos de 4 ensayos diferentes para neuronas 2C (figura suplementaria 2), y 3 ensayos diferentes para neuronas 4C (figura suplementaria 3), con un mínimo de 11 clones estudiados en cada ensayo. El número de clones reportado varía de acuerdo al número de clones con el inserto correcto y en cuyas secuencias aparecían correctamente secuenciadas un mínimo de 7 CpGs. El criterio utilizado para discernir si un clon se encontraba metilado o no metilado fue que tuviese 7 o más CpGs en un estado u otro. En la figura 7B, se muestran los resultados mediante los porcentajes promedio de metilación analizados en los diferentes ensayos. El porcentaje de metilación en el fragmento clonado a partir de neuronas 2C fue de $39,86\% \pm 2,46$ ($n = 4$). En el caso de las neuronas 4C, el resultado fue de $34,59\% \pm 5,93$ ($n = 3$).

El análisis estadístico realizado mediante la prueba t de Student dio como resultado una $p > 0,05$, y por tanto la diferencia de metilación entre neuronas 2C y 4C no es significativa. El reducido número de muestras que permite utilizar este método de secuenciación, unido a la variabilidad del número de clones que finalmente se secuencian correctamente en cada ensayo, hacen que estos resultados se deban tomar con cautela. Sin embargo, estos resultados fueron posteriormente confirmados mediante pirosecuenciación (datos aún no publicados del laboratorio), un método alternativo de determinación de secuencias a gran escala, más preciso, que permite realizar un estudio estadístico concluyente. De esta forma, se pudo confirmar que el *imprinting* en la región estudiada no varía en neuronas 4C, por lo que cabe esperar que sea la enzima DNMT1 la que se encargue de llevar a cabo la metilación de esta secuencia en neuronas 4C por el proceso ya mencionado en la Introducción. También se pudo confirmar que el porcentaje de metilación en esta región es de aproximadamente el 40% en cerebro, datos que

contrastan con diversos resultados de otros estudios [23, 30] en los que los porcentajes de metilación obtenidos en cerebro varían considerablemente.

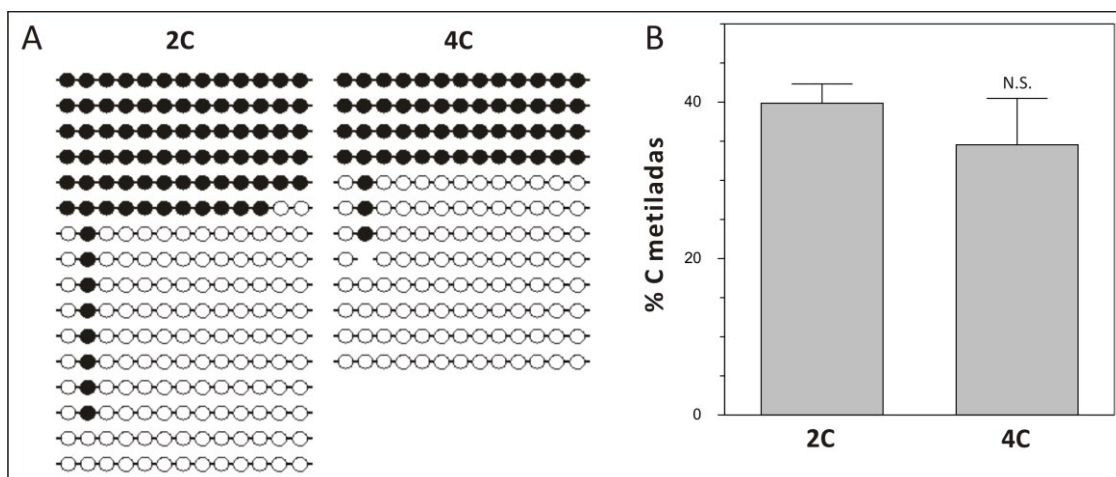


Figura 7. A) Esquema representativo del estado de metilación en neuronas 2C y 4C. Los círculos negros representan C metiladas; los círculos blancos representan C no metiladas; la ausencia de círculo representa las CpGs cuya secuencia no se pudo determinar; B) Estudio del porcentaje promedio de C metiladas en 2C y 4C. El gráfico representa el estudio realizado en 4 ensayos con 2C y 3 ensayos con 4, con un mínimo de 11 clones estudiados en cada ensayo. El resultado se muestra como Porcentaje promedio ± EEM. N.S.: No Significativo.

A pesar de que no se produzca modificación en el patrón de *imprinting* en las neuronas tetraploides, es necesario pensar las repercusiones a nivel fisiológico y/o patológico de haber duplicado por tetraploidía la dosis de un gen que ya de por sí se encuentra limitado por el *imprinting* a un único alelo. Las funciones del *imprinting* y de los genes con *imprinting* presentan aún a día de hoy controversia [31-34]. Se ha visto que tienen importancia, entre otras cosas, en el correcto funcionamiento del cerebro [20], y por tanto, es posible que la alteración en esta característica pueda desembocar en patología, como ya se observa en enfermedades como el síndrome de Prader-Willi o el síndrome de Angelman, que se deben a modificaciones en el *imprinting* en este mismo locus.

Estudio individualizado del porcentaje de metilación de CpGs

Al analizar el estado de metilación de los diferentes clones, observamos que la CpG situada en la posición 40 respecto a los 215pb del fragmento clonado se encontró metilada en un porcentaje llamativamente superior al resto de CpGs. Por tanto, decidimos hacer un estudio individualizado de las diferentes CpGs del fragmento, puesto que el que un clon se encuentre metilado no es indicativo de que todas sus CpGs presenten el mismo patrón de metilación. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de metilación de cada CpG, y el número de CpGs estudiadas. A continuación también se incluye una gráfica (figura 8) en la que se representan estos resultados, y en los cuales se puede apreciar que hay una diferencia considerable entre 2C y 4C en las CpGs 27 (51,31% y 32,43%, respectivamente), 64 (55,71% y 32,43%) y 115 (53,73% y 32,43%), y que el porcentaje es muy superior en la CpG 40, tanto para 2C como 4C (70,27% y 71,42%, respectivamente).

	CpG	27	40	64	70	80	82	84	103	115	134	147	174	184
2C	n	76	74	70	69	69	69	67	70	67	66	65	63	62
	% met	51,31	70,27	55,71	40,57	40,57	40,57	38,80	35,71	53,73	43,93	38,46	36,50	37,09
4C	n	37	35	37	37	37	37	37	37	37	36	36	36	36
	% met	32,43	71,42	32,43	32,43	32,43	32,43	32,43	32,43	32,43	30,56	30,56	30,55	30,55

Tabla 1. Estudio individual del porcentaje de metilación en las CpGs. En la fila superior se indica la posición (en pares de bases) de la CpG en la secuencia del fragmento de 215pb. La n indica el número de clones en los que se ha podido analizar esa CpG. El gráfico representa el estudio realizado en 4 ensayos con 2C y 3 ensayos con 4C, y se incluyen todas las CpGs cuya secuenciación fue correctamente realizada.

Análisis *a posteriori* mediante pirosecuenciación de las CpGs 64 y 115 revelaron que tales diferencias entre las secuencias de 2C y 4C no existían, lo que puede ser debido al motivo anteriormente comentado de que la reducida n hace que el análisis estadístico no sea del todo concluyente. Los *primers* necesarios para pirosecuenciación amplifican una región ligeramente más corta que la amplificada en este estudio, y debido a ello, los datos de las CpGs 27 y 40 no se pudieron contrastar. Sí es posible, por la alta diferencia frente a las demás, que la variación en la CpG 40 en cerebro sea real y aproximada a los datos obtenidos.

Otros estudios en los que se analizaba esta secuencia, como el llevado a cabo por Li et al. [28], no mostraban diferencias en la CpG 40, si bien hay que tener en cuenta que estos datos fueron obtenidos a partir de hígado. Será necesaria la confirmación en futuros ensayos de esta variación, para buscar un posible significado, puesto que a día de hoy, se escapa de nuestro conocimiento.

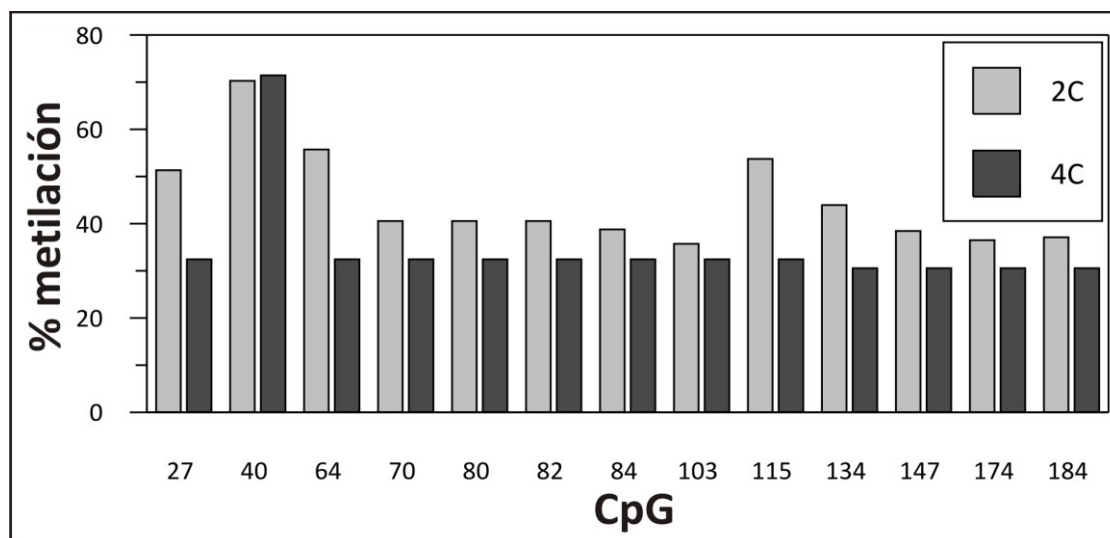


Figura 8. Estudio del porcentaje individual de metilación de CpGs. La barra gris clara indica las CpGs estudiadas en neuronas 2C, y la barra gris oscura, en neuronas 4C. Cada CpG se identifica por su posición (en bases) en el fragmento de 215pb. El gráfico representa el estudio realizado en 4 ensayos con 2C y 3 ensayos con 4C, y se incluyen todas las CpGs cuya secuenciación fue correctamente realizada.

Así pues, las conclusiones finales de este estudio no existen diferencias significativas en el patrón de *imprinting* en la región estudiada entre neuronas 2C y 4C.

El porcentaje de metilación en esta región es de en torno al 40%.

El *imprinting* en tejido somático después de la fertilización no se ve modificado.

Existe un patrón diferencial en la metilación de las diferentes CpGs. La variación en la metilación de la CpG 40 con respecto a las demás en cerebro, que debe ser confirmada, puede tener un significado fisiológico y/o patológico que a día de hoy se escapa de nuestro conocimiento.

Referencias

1. Swift, H. 1953. Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *International Review of Cytology*. 2:1-76.
2. Lapham, L.W. 1968. Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science*. 159:310-2.
3. Morillo, S.M., Escoll, P., de la Hera, A. and Frade, J.M. 2010. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:109-14.
4. López-Sánchez, N., Ovejero-Benito, M.C., Borreguero, L. and Frade J.M. 2011. Cell cycle in development. Springer, Heidelberg.
5. López-Sánchez, N. and Frade, J.M. 2013. Genetic evidence for p75NTR -dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice. *Journal of Neuroscience*. 33:7488-500.
6. Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A. and Arendt, T. 2007. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 27:6859-67.
7. Yang, Y., Geldmacher, D.S. and Herrup, K. 2001. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience*. 21(8): 2661-2668.
8. Spremo-Potparevic, B., Zivkovic, L., Djelic, N. and Bajic, V. 2004. Analysis of premature centromere division (PCD) of the X chromosome in Alzheimer patients through the cell cycle. *Experimental Gerontology*. 39:849-54.

9. Iourov, I.Y., Vorsanova, S.G., Liehr, T. and Yurov, Y.B. 2009. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiology of Disease*. 34:212-20.
10. Arendt, T., Brückner, M.K., Mosch, B. and Lösche, A. 2010. Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*. 177:15-20.
11. Frade, J.M. 2010. Somatic tetraploidy in vertebrate neurons, implications in physiology and pathology. *Communicative & Integrative Biology*. 3:2, 201-203.
12. Biesterfeld, S., Gerres, K., Fischer-Wein, G. and Böcking, A. 1994. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *Journal of Clinical Pathology*. 47:38-42.
13. Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*. 105:297-306.
14. Ullah, Z., Lee, C.Y., Lilly, M.A and DePamphilis, M.L. 2009. Developmentally programmed endoreduplication in animals. *Cell cycle*. 8:1501-1509.
15. Ullah, Z., Lee, C.Y. and DePamphilis, M.L. 2009. Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Division*. 4:10.
16. Szaro, B.G. and Tompkins, R. 1987 Effect of tetraploidy on dendritic branching in neurons and glial cells of the frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology*. 258:304-316.
17. Moh, C., Kubiak, J.Z., Bajic, V.P., Xiongwei, Z., Hyoung-gon, L. and Smith, M.A. 2011. Cell cycle and development. Springer, Heidelberg.
18. Barlow, D.P. and Bartolomei, M.S. 2014. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1:6(2).
19. Reik, W., Dean, W. and Walter, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293:1089-1093.
20. Bartolomei, M.S. and Ferguson-Smith, A.C. 2011. Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1:6(2).
21. Wan, L.B. and Bartolomei, M.S. 2008. Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Advances in Genetics*. 61:207-223.
22. Goll, M.G. and Bestor, T.H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*. 74:481-514.
23. Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D. and Razin, A. 1997. Structure of the imprinted mouse *Snrpn* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:10267-10272.
24. Watrin, F., Roëckel, N., Lacroix, L., Mignon, C., Mattei, MG., Disteche, C. et al. 1997. The mouse *Necdin* gene is expressed from the paternal allele only and lies in the 7C region of the mouse chromosome 7, a region of conserved synteny to the human Prader-Willi syndrome region. *European Journal of Human Genetics*. 5:324-332.
25. Horsthemke, B. and Wagstaff, J. 2008. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *American Journal of Medical Genetics*. 146A:2041-2052.
26. Nunez, R. 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*. 3:67-70.
27. Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H.J., Bestor, T.H. and Trasler, J.M. 2002. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics*. 79:530-538.
28. Li, J.Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.L. and Walsh, C.P. 2004. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*. 84:952-960.
29. Peters, J. 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Reviews Genetics*. 15:517-530.
30. Scoles, H.A., Urraca, N., Chadwick, S.W., Reiter, L.T. and LaSalle, J.M. 2011. Increased copy number for methylated maternal 15q duplications leads to changes in gene and protein expression in human cortical samples. *Molecular Autism*. 2:19.
31. Moore, T. and Haig, D. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics*. 7:45-49.
32. Varmuza, S. and Mann, M. 1994. Genomic imprinting – defusing the ovarian time bomb. *Trends in Genetics*. 10:118-123.

33. Wilkins, J.F. and Haig, D. 2003. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics*. 4:359-368.
34. Keverne, E.B. and Curley, J.P. 2008. Epigenetics, brain evolution and behaviour. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29:398-412.

Material suplementario

Sorting Núcleos 2C y 4C

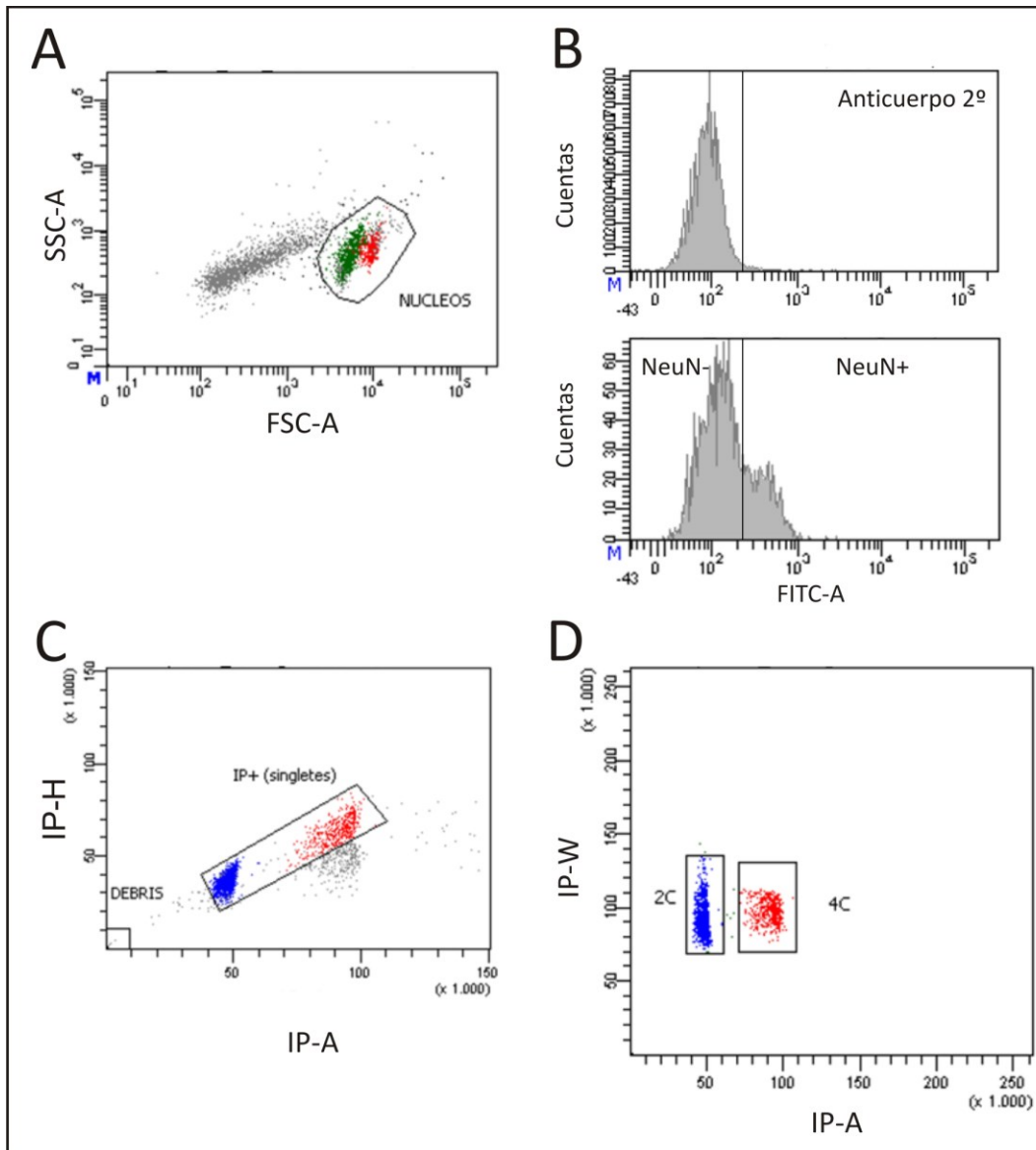


Figura suplementaria 1. Procedimiento de selección de poblaciones para obtener neuronas 2C y 4C. Los núcleos frescos fueron aislados de corteza cerebral de ratones P15, marcados con IP, y sometidos a análisis por citometría de flujo. Los núcleos se seleccionaron en la gráfica A de FCS-A (medida del tamaño de la partícula), y SSC-A (medida de la complejidad de la partícula). Se realizó un control de Anticuerpo 2º (B) para separar la población NeuN⁺. El contenido de DNA fue evaluado a partir de la ventana de población de núcleos a partir de los niveles de IP-H frente a los niveles de IP-A (C). Los núcleos diploides y tetraploides fueron subsiguientemente seleccionados de los diferentes gráficos, mientras que los dobletes fueron descartados. El contenido de DNA fue también evaluado a partir de la ventana de población de núcleos, en la gráfica (D) de IP-W frente a IP-A.

Resultados neuronas 2C

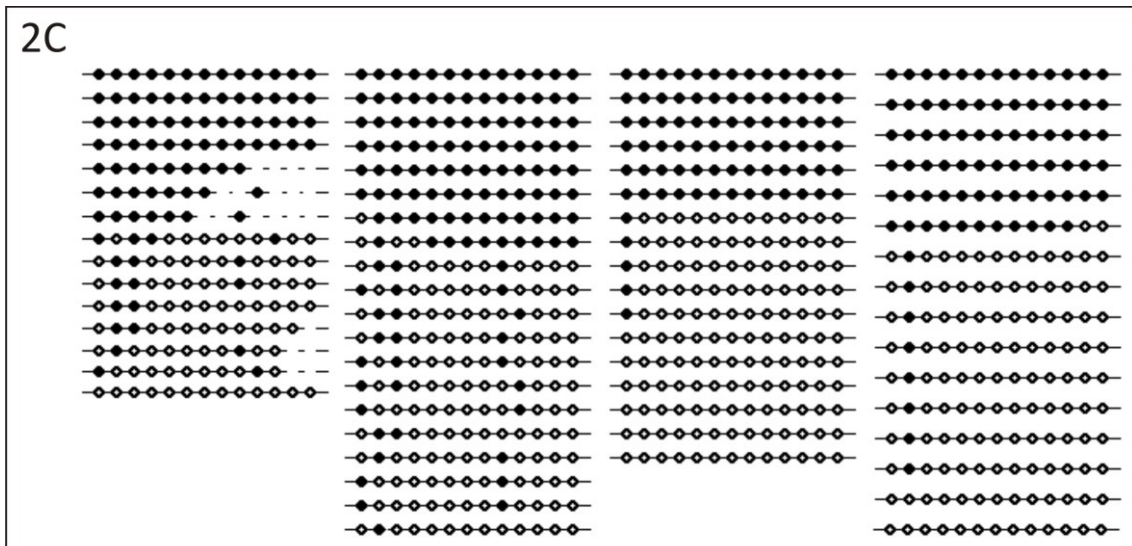


Figura suplementaria 2. Esquemas del estado de metilación de 4 ensayos diferentes con neuronas 2C. Los círculos negros representan C metiladas; los círculos blancos representan C no metiladas; la ausencia de círculo representa las CpGs cuya secuencia no se pudo determinar.

Resultados neuronas 4C

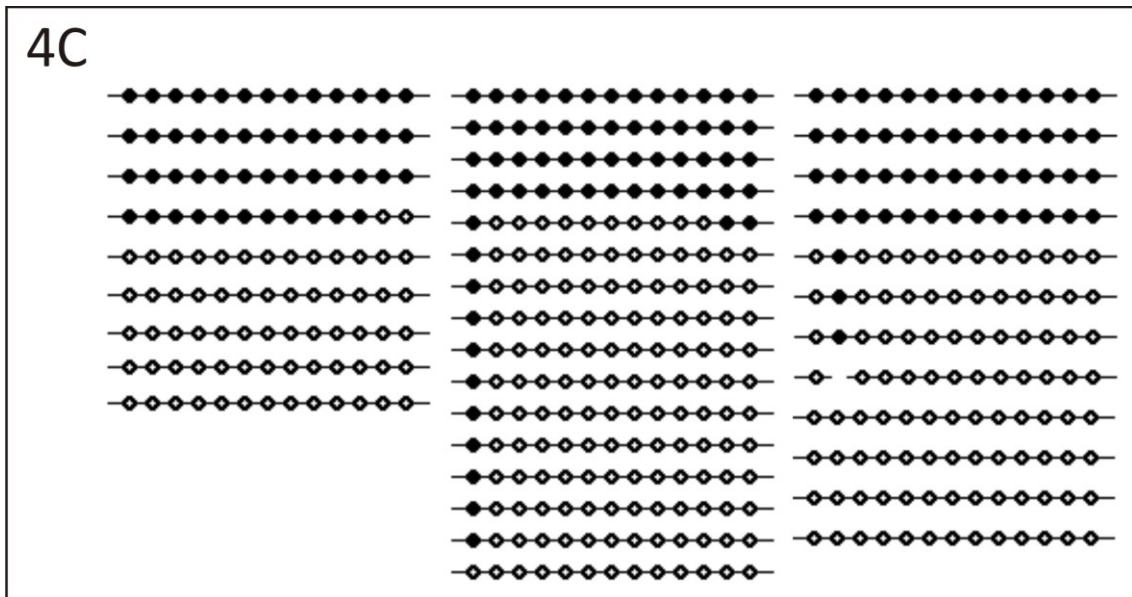


Figura suplementaria 3. Esquemas del estado de metilación de 3 ensayos diferentes con neuronas 4C. Los círculos negros representan C metiladas; los círculos blancos representan C no metiladas; la ausencia de círculo representa las CpGs cuya secuencia no se pudo determinar.