



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

# **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

## **Trabajo Fin de Máster**

Desarrollo de métodos de referencia para la cuantificación de citosinas  
metiladas en fragmentos de ADN.

**Lucía Fernández García**

**Oviedo, Julio 2023**

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abreviaturas y acrónimos .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Tabla de figuras .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>Resumen.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>1. Introducción .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.1 Epigenética y cáncer.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1.1 Estructura y función del ADN .....   | 5         |
| 1.1.2. Mecanismos implicados en la regulación epigenética.....   | 6         |
| 1.1.3 Metilación del ADN como biomarcador tumoral.....   | 8         |
| <b>1.2. Métodos de análisis de citosinas metiladas.....</b>  | <b>9</b>  |
| 1.2.1 Métodos analíticos tradicionales .....   | 9         |
| 1.2.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....  | 10        |
| 1.2.3 Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) .....  | 11        |
| <b>1.3. Cuantificación mediante Dilución Isotópica acoplada a Espectrometría de Masas (IDMS).....</b>                          | <b>13</b> |
| 1.3.1 Fundamento de la Dilución Isotópica .....  | 13        |
| 1.3.2 IDMS en análisis elemental y molecular.....  | 15        |
| 1.3.3 Deconvolución de perfiles isotópicos.....  | 17        |
| 1.3.4 Requisitos y ventajas .....  | 18        |
| <b>2. Objetivos .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3. Experimental .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3.1 Reactivos .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3.2 Instrumentación .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3.3 Procedimientos .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.3.1 Extracción de ADN marcado isotópicamente en <sup>15</sup> N .....  | 22        |
| 3.3.2 Hidrólisis de ácidos nucleicos para la obtención de nucleósidos marcados .....   | 23        |
| 3.3.3 Análisis de nucleósidos por UPLC-MS/MS mediante dilución isotópica .....   | 24        |
| 3.3.4 Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico de los nucleósidos marcados en <sup>15</sup> N ..... | 25        |
| <b>4. Resultados .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>4.1 Extracción de ADN de algas marcadas isotópicamente en <sup>15</sup>N .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>4.2 Hidrólisis enzimática de ADN .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>4.3 Optimización del análisis de dC y 5mdC mediante UPLC-MS/MS.....</b>   | <b>28</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>4.3.1 Prueba de las condiciones iniciales</i> .....   | 28        |
| <i>4.3.2 Prueba de diferentes tipos de sales en la fase móvil A</i> .....  | 30        |
| <i>4.3.3 Prueba de columna HILIC</i> .....   | 31        |
| <i>4.3.4 Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas</i> .....   | 33        |
| <i>4.3.5 Estudio de la variación de las señales con la concentración inyectada</i> .....   | 35        |
| <b>4.4 Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico de los nucleósidos marcados en <sup>15</sup>N</b> ..... | 37        |
| <b>4.5 Validación del método de medida en MRM</b> .....  | 38        |
| <b>4.6 Determinación del porcentaje de citosinas metiladas en ADN mediante análisis por dilución isotópica</b> .....               | 40        |
| <b>5. Conclusiones</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>6. Próximos enfoques</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>7. Bibliografía</b> .....   | <b>44</b> |

## Abreviaturas y acrónimos

| Abreviatura | Inglés                                      | Español   |
|-------------|---|---|
| ADN         | Deoxyribonucleic acid                       | Ácido desoxirribonucleico                             |
| ARN         | Ribonucleic acid                            | Ácido ribonucleico                                    |
| dA          | 2'- deoxyadenosine                          | 2'- desoxiadenosina                                   |
| dC          | 2'- deoxycytidine                           | 2'- desoxicitidina                                    |
| dG          | 2'- deoxyguanosine                          | 2'- desoxiguanosina                                   |
| DNMT        | DNA Methyltransferases                      | ADN metiltransferasas                                 |
| dT          | Thymidine                                   | Timidina  |
| ESI         | Electrospray                                | Electrospray  |
| FIA         | Flow Injection Analysis                     | Análisis de inyección en flujo                        |
| HPLC        | High Performance Liquid Chromatography      | Cromatografía de líquidos de alta resolución          |
| IDMS        | Isotope Dilution Mass Spectrometry          | Dilución isotópica acoplada a espectrometría de masas |
| IPD         | Isotope Pattern Deconvolution               | Deconvolución de perfiles isotópicos                  |
| MALDI       | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization | Desorción/ionización láser asistida por matriz        |
| MRM         | Multiple Reaction Monitoring                | Monitorización de reacciones múltiples                |
| MS          | Mass Spectrometry                           | Espectrometría de masas                               |
| MS/MS       | Tandem Mass Spectrometry                    | Espectrometría de masas en tándem                     |
| PI          | Product Ion                                 | Ión producto  |
| QqQ         | Triple Quadrupole                           | Triple cuadrupolo                                     |
| SAM         | S-Adenosyl Methionine                       | S-Adenosil Metionina                                  |
| SCAN        | Scan  | -   |
| SI          | International System                        | Sistema Internacional                                 |
| SIM         | Selected Ion Monitoring                     | Monitorización de iones seleccionados                 |
| TDG         | Thymine DNA Glycosylase                     | Timina ADN Glicosilasa                                |
| TET         | Ten Eleven Translocation                    | -   |
| TOF         | Time Of Flight                              | Tiempo de vuelo                                       |
| 5caC        | 5-carboxylcytosine                          | 5-carboxilcitosina                                    |
| 5fC         | 5-formylcytosine                            | 5-formilcitosina                                      |
| 5hmC        | 5-hydroxymethylcytosine                     | 5-hidroximetilcitosina                                |
| 5mdC        | 5-methyl-2'- deoxycytidine                  | 5-metil-2'-desoxicitidina                             |
| 6mA         | N6-methyladenine                            | N6-metiladenina                                       |

## Tabla de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Estructura química del ADN <sup>[6]</sup> .....  | 5  |
| Figura 2: Mecanismos de silenciamiento génico por metilación del ADN. A: Representación de una isla CpG sin metilación de ADN (bolas blancas) dando lugar a una expresión génica normal. B: Silenciamiento génico debido a la metilación del ADN en islas CpG (bolas negras) que impiden directamente la unión de la maquinaria transcripcional. C: Silenciamiento génico mediado por proteínas con dominio de unión a ADN metilado e impiden la transcripción <sup>[19]</sup> ..... | 7  |
| Figura 3: Ciclo de metilación-desmetilación activa de la citosina <sup>[22]</sup> .....  | 9  |
| Figura 4: Funcionamiento de una celda de colisión <sup>[40]</sup> .....  | 11 |
| Figura 5: Equipo de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1290 acoplado a espectrometría de masas tándem con fuente de ionización ESI y analizador de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460....   | 12 |
| Figura 6: Funcionamiento de la fuente de ionización de electrospray (ESI) <sup>[41]</sup> .....  | 12 |
| Figura 7: Funcionamiento de un cuadrupolo <sup>[42]</sup> .....  | 13 |
| Figura 8: Ejemplo esquematizado de la dilución isotópica <sup>[43]</sup> .....   | 14 |
| Figura 9: Representación gráfica de la abundancia de un isótopo "a" y un isótopo "b" en una muestra, en el trazador y en la mezcla de ambos.....   | 15 |
| Figura 10: Esquema de la técnica de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).....  | 17 |
| Figura 11: Esquema ilustrativo de la hidrólisis enzimática de ADN.....   | 24 |
| Figura 12: Cromatograma obtenido mediante UPLC-MS para una mezcla de patrones naturales de dC, dG, dA, dT y 5mdC a una concentración de 20 µg/g.....   | 29 |
| Figura 13: Espectro de masas obtenido para un patrón de 100 µg/g de dC en modo SCAN.....   | 30 |
| Figura 14: Espectro de masas obtenido para un patrón de 100 µg/g de 5mdC en modo SCAN.....   | 30 |
| Figura 15: Cromatogramas obtenidos para un mismo patrón de los 5 nucleósidos con diferentes sales en la fase móvil A: formiato de amonio 1 mM (negro), bicarbonato amónico 2 mM (granate) y bicarbonato amónico 1 mM (verde).....  | 31 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 16: Cromatograma obtenido en modo SCAN para una mezcla de patrones de dG, dA, dC, 5mdC y dT a una concentración de 20 $\mu\text{g/g}$ con la columna cromatográfica HILIC. Negro: fondo (agua ultrapura); Rojo: mezcla de patrones de los 5 nucleósidos. ....                | 32 |
| Figura 17: Espectro de masas obtenido para el 1 <sup>er</sup> pico cromatográfico de la Figura 15.....  | 32 |
| Figura 18: Espectro de masas obtenido para el 2 <sup>o</sup> pico cromatográfico de la Figura 15. ....  | 33 |
| Figura 19: Gráficas de los parámetros optimizados en la fuente de ionización para el dC y el 5mdC. Amarillo: señal del nucleósido de la 5mdC; Gris: señal de la base nitrogenada de la 5mdC; Azul: señal de la base nitrogenada de la dC; Verde: señal del nucleósido de la dC..... | 34 |
| Figura 20: Gráfica comparativa de la variación de las señales correspondientes a las m/z de la base nitrogenada, el nucleósido y un posible aducto del compuesto 5mdC con distintos volúmenes de inyección de un patrón de concentración 0,1 $\mu\text{g/g}$ .....                  | 36 |
| Figura 21: Gráficas comparativas de las abundancias teóricas y experimentales para las transiciones de MRM de los compuestos dC y 5mdC con patrones naturales y marcados. ....  | 39 |
| Figura 22: Cromatograma obtenido en MRM para la mezcla de trazador con la muestra de ADN de cerebro de los patrones comerciales de ratón. ....  | 40 |

## Resumen

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en seres humanos dada su vital importancia en diferentes procesos de la regulación génica. En los últimos años se ha comprobado que las alteraciones en los patrones de metilación están fuertemente asociadas a numerosas enfermedades entre las que se incluye el cáncer, por lo que la metilación del ADN se está monitorizando como biomarcador de determinados tipos de tumores. Con el auge de la espectrometría de masas y las ventajas que esta técnica proporciona, se han comenzado a desarrollar metodologías analíticas basadas en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de citosinas metiladas. En este trabajo se propone la puesta a punto de un método de referencia sencillo y preciso para la cuantificación de citosinas metiladas en fragmentos de ADN mediante HPLC-MS/MS y dilución isotópica. Durante el trabajo, se llevó a cabo la extracción de ADN en algas enriquecidas isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  y su posterior hidrólisis para la conversión a nucleósidos, mucho más fáciles de analizar por espectrometría de masas que las moléculas completas de ADN. Para ello se optimizó la separación cromatográfica y su posterior detección en el MS/MS, además de realizar la caracterización mediante dilución isotópica inversa de los compuestos obtenidos marcados isotópicamente. Finalmente, se cuantificó mediante dilución isotópica el porcentaje de metilación de ADN procedente de dos tejidos de órganos diferentes de un patrón comercial de ratón, siendo ésta insatisfactoria e impidiendo así la validación del método desarrollado, lo que se puede deber a distintos motivos que se discutirán a lo largo del trabajo.

## 1. Introducción

### 1.1 Epigenética y cáncer

#### 1.1.1 Estructura y función del ADN

El ácido desoxirribonucleico, o más conocido por su abreviatura ADN, es un tipo de ácido nucleico que contiene toda la información genética encargada del funcionamiento y desarrollo del organismo <sup>[1]</sup>. El ADN está formado por dos hebras antiparalelas unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno formando una cadena con estructura de doble hélice. Cada hebra está compuesta por secuencias de 4 tipos de nucleótidos, que a su vez están formados por una base nitrogenada y un azúcar de 5 carbonos (desoxirribosa) unido a un grupo fosfato. En una misma hebra, los nucleótidos están unidos entre sí formando un esqueleto azúcar-fosfato mediante enlaces fosfodiéster a través del grupo 3'-hidroxilo del azúcar y el 5'-fosfato del siguiente nucleótido; mientras que las hebras se unen entre sí para formar la doble hélice a través de enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, que son la guanina (G), citosina (C), adenina (A) o timina (T) <sup>[1-4]</sup>.

Dicha estructura tridimensional con forma de doble hélice se debe a las características estructurales y químicas de las dos cadenas de polinucleótidos, dejando en la zona exterior el esqueleto azúcar-fosfato y las bases nitrogenadas de las dos hebras en la zona interior de la doble hélice <sup>[4]</sup>. Para conseguir la disposición energéticamente más favorable, una base púrica se complementa siempre con una pirimidínica; así, como se muestra en la **Figura 1**, la guanina es complementaria de la citosina, uniéndose a la misma mediante tres enlaces de hidrógeno; y la timina es complementaria de la adenina, uniéndose a ella mediante dos enlaces de hidrógeno <sup>[5]</sup>.

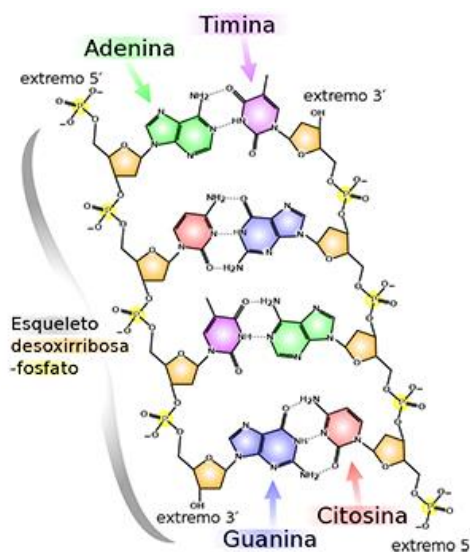


Figura 1: Estructura química del ADN [6].



En el caso de las células eucariotas, el ADN se encuentra en el núcleo celular, en la matriz mitocondrial y en el estroma de los cloroplastos, y está organizado en segmentos denominados “genes”, que, a través de la secuencia de nucleótidos de las hebras de ADN, contienen la información biológica que se transmite de generación en generación. El genoma es el conjunto de información de ADN contenida en un organismo necesaria para sintetizar todas las proteínas del mismo <sup>[4]</sup>, por lo que una de las funciones principales del ADN es el almacenamiento de esta información.

Por otra parte, el ADN realiza copias de sí mismo a través de un proceso de replicación que permite la transmisión de la información genética a las células hijas durante la división celular. Por último, la tercera función principal es la codificación de las proteínas, ya que el ADN aporta la información necesaria para la síntesis de cada proteína actuando como “molde”, mientras que el ARN es el responsable de llevar a cabo dicha síntesis <sup>[7]</sup>.

#### *1.1.2. Mecanismos implicados en la regulación epigenética*

El término “epigenética” abarca las modificaciones estructurales que afectan a la expresión génica y que se producen durante el desarrollo y la proliferación celular sin alterar la secuencia de nucleótidos del ADN <sup>[8]</sup> estableciendo así diferencias en el epigenoma de cada célula y de cada tejido <sup>[9]</sup>. Estas modificaciones requieren la interacción con enzimas y otros componentes moleculares y son reversibles y susceptibles a factores ambientales, lo que puede dar lugar a cambios en la salud del individuo <sup>[10]</sup>.

La regulación epigenética es, por tanto, un tipo de regulación génica que determina la diversidad funcional y morfológica de las células de un mismo genoma. Su estudio es fundamental ya que, como se indicó previamente, algunas alteraciones en el epigenoma pueden resultar en iniciaciones o inhibiciones inapropiadas de la regulación génica, dando lugar a diversas enfermedades entre las que se incluye el cáncer <sup>[11]</sup>.

Los mecanismos principales que intervienen en la regulación epigenética son los siguientes:

#### Metilación del ADN

Esta modificación epigenética es la más estudiada en humanos hasta la actualidad debido a su papel fundamental en la regulación génica a través del control de la estabilidad genómica, las alteraciones transcripcionales, la inactivación del cromosoma X o el desarrollo celular en mamíferos <sup>[12-14]</sup>. Consiste en la transferencia de un grupo metilo por parte de la S-adenosil metionina (SAM) a la posición 5 de la citosina en dinucleótidos CG gracias a un grupo de enzimas conocidas como ADN metiltransferasas (DNMTs) <sup>[15-16]</sup>.

Existen dos mecanismos principales para explicar la inhibición de la transcripción de genes causada por la metilación del ADN: por una parte, las zonas metiladas en el ADN pueden inhibir directamente la unión del factor de transcripción bloqueando directamente la transcripción del gen; por otra parte, una clase de proteínas entre las que se incluyen MBD1, 2 y 3 y MECP2 se unen a las citosinas metiladas produciendo así el silenciamiento génico [15,17,18]. En la **Figura 2** se representan los dos mecanismos que explican el silenciamiento génico por metilación del ADN.

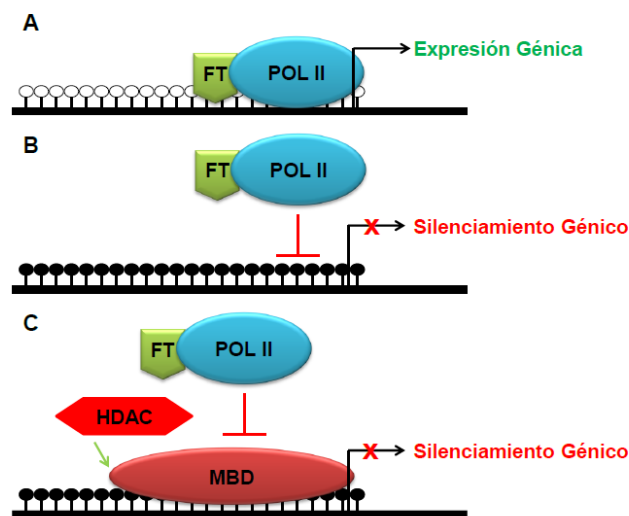


Figura 2: Mecanismos de silenciamiento génico por metilación del ADN. A: Representación de una isla CpG sin metilación de ADN (bolas blancas) dando lugar a una expresión génica normal. B: Silenciamiento génico debido a la metilación del ADN en islas CpG (bolas negras) que impiden directamente la unión de la maquinaria transcripcional. C: Silenciamiento génico mediado por proteínas con dominio de unión a ADN metilado e impiden la transcripción [19].

Las células madre normales requieren un determinado balance de metilación que tiene la función de regular algunas funciones celulares y suprimir la transcripción de algunos genes. Sin embargo, patrones anormales de metilación pueden servir como marca de desarrollo y proceso de determinados tumores. Estas alteraciones son bastante dinámicas y se pueden producir mediante la hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores o mediante la hipometilación de un protooncogén [15].

Por tanto, el control de las alteraciones en los patrones de metilación de ADN es primordial, ya que están fuertemente asociados a varias enfermedades como cáncer, diabetes, desórdenes cardiovasculares, mentales o neurodegenerativos, entre otros [16,20].

### Modificaciones post-traduccionales de las histonas

Las histonas son un tipo de proteínas a las que se une el ADN para formar la cromatina, de forma que el ADN se enrolla alrededor de complejos de proteínas histona (formando nucleosomas) para

dar una forma más compacta al cromosoma. Estas proteínas, además de su función estructural, también participan en la regulación génica <sup>[21]</sup>.

Las histonas también son susceptibles a modificaciones post-traduccionales como metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones o ubiquitinaciones<sup>1</sup>, entre otras <sup>[9]</sup>. Estas modificaciones alteran la estructura de la cromatina produciendo el silenciado o la activación de regiones completas del cromosoma y de los genes que abarca. Además, se ha observado que estos cambios tienen lugar en etapas tempranas del desarrollo de cáncer <sup>[19]</sup>.

### ARN no codificante

El ARN no codificante se puede dividir en dos tipos: los estructurales y los reguladores. Estos últimos pueden dividirse, a su vez, en varios subgrupos (microRNA, RNA pequeño de interferencia, RNA largo no codificante, etc) y son expresados en momentos concretos del desarrollo, como puede ser durante la diferenciación celular o también como respuesta a estímulos ambientales. Estos ARN no codificantes están directamente asociados a la expresión génica, pues intervienen en distintos procesos epigenéticos como la impronta génica o la inactivación del cromosoma X <sup>[18]</sup>.

#### *1.1.3 Metilación del ADN como biomarcador tumoral*

En el ADN de mamíferos aproximadamente entre un 3 % y un 8 % de los residuos de citosina se encuentran metilados, mientras que en plantas el porcentaje de metilación varía desde 6 a 30 %. Esta metilación ocurre normalmente en dinucleótidos CG que, aunque se encuentran infrarrepresentados en el genoma humano, se acumulan en determinadas regiones del genoma localizándose habitualmente en los promotores de un gran número de genes y cerca de los sitios de inicio de la transcripción. Dichas zonas, conocidas como “islas CpG”, se encuentran normalmente no metiladas, de forma que se favorece la transcripción génica; mientras que cuando se dan alteraciones como la hipermetilación de estas zonas, esto conlleva al “silenciamiento” de genes, entre ellos genes supresores de tumores, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer <sup>[21]</sup>.

Por otra parte, la hipometilación global del ADN también produce efectos graves en la salud ya que contribuye a inestabilidades en el genoma y además favorece la expresión aberrante de algunos genes en momentos o en tejidos inadecuados <sup>[21]</sup>.

---

<sup>1</sup> Ubiquitinación es un proceso de adición de cadenas de ubiquitina (pequeña proteína reguladora) a una proteína marcada para la degradación.

Aunque la metilación de ADN es una marca epigenética estable, es reversible, lo que sugiere un proceso de metilación-desmetilación dinámico como respuesta a diferentes señales del entorno. Existen dos tipos de desmetilación en mamíferos: activa y pasiva.

La desmetilación activa en mamíferos podría ocurrir a través de una oxidación mediada por la familia de proteínas TET, y por las enzimas TET1, TET2 y TET3 que catalizan la oxidación de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y de forma consecutiva a 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) <sup>[16][21]</sup>. A su vez, la 5fC y la 5caC pueden también ser procesadas por la TDG, como se indica en la **Figura 3**.

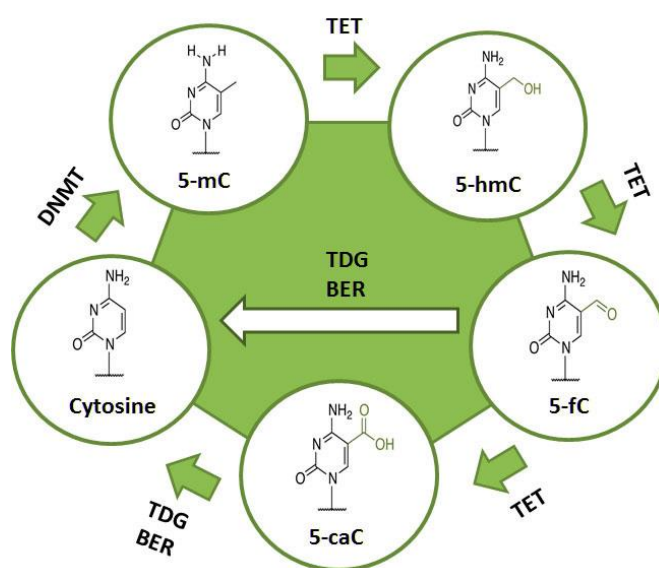


Figura 3: Ciclo de metilación-desmetilación activa de la citosina [22].

Por otra parte, la desmetilación pasiva se produce por la inhibición o ausencia de las ADN metiltransferasas de mantenimiento durante los procesos de replicación, lo que produce la dilución progresiva de citosinas metiladas.

## 1.2. Métodos de análisis de citosinas metiladas

### 1.2.1 Métodos analíticos tradicionales

Las células tumorales muestran normalmente patrones de metilación de ADN aberrantes, que se caracterizan generalmente por una hipometilación global del genoma junto con una hipermetilación local en promotores de genes supresores de tumores, como se indicó anteriormente <sup>[21,23]</sup>

Debido a su papel fundamental, la metilación del ADN ya se está monitorizando como biomarcador tumoral para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer, lo que conlleva una

continua investigación en busca de métodos analíticos rápidos, sencillos y precisos. A lo largo de los años se han utilizado diferentes métodos de análisis cuyo objetivo es la introducción de cambios en el ADN dependientes de la metilación <sup>[24]</sup>, siendo los principales aquellos basados en pretratamientos con bisulfito sódico, digestiones con endonucleasas de restricción o métodos de afinidad con anticuerpos o proteínas, con su posterior análisis mediante electroforesis en gel, secuenciación mediante PCR o análisis en array <sup>[23]</sup>.

El pretratamiento con bisulfito consiste en la transformación de las citosinas no metiladas en uracilos, mientras las citosinas metiladas permanecen sin cambios, lo que permite la diferenciación entre el ADN metilado y el no metilado. Este método es considerado de los mejores dada su alta resolución al combinarse con métodos de secuenciación <sup>[16,23]</sup>, ya que proporciona la identificación de todas las citosinas metiladas de una región concreta con alta precisión y además permite la cuantificación de moléculas individuales <sup>[25]</sup>. Pero este método también presenta algunas desventajas, ya que es bastante laborioso, consume tiempo y presenta bastante ruido <sup>[31]</sup>.

#### *1.2.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)*

El auge de la espectrometría de masas en las últimas décadas la ha convertido en una técnica atractiva para la determinación de modificaciones epigenéticas debido a las grandes ventajas que presenta, como son la alta precisión, la compatibilidad con técnicas cromatográficas y el poco volumen de muestra necesario, pero sobre todo por la alta sensibilidad que proporciona dados los bajos porcentajes de metilación que se pueden encontrar en células de mamíferos (hasta el 0,009% de las citosinas) <sup>[26]</sup>. El fundamento de la espectrometría de masas se puede explicar de forma muy simple: en una primera etapa se producen iones procedentes de la muestra en una fuente de ionización, posteriormente dichos iones son separados en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y por último son medidos en el detector según su abundancia y transformados en señales eléctricas.

El empleo de espectrómetros de masas no permite la medida directa de grandes moléculas de ADN debido a su dificultad para pasar a fase gas en un estado ionizado (aunque se podría conseguir con MALDI-TOF pero en concentraciones muy altas). Por ello, para conseguir una sensibilidad adecuada en el espectrómetro de masas, es necesaria una hidrólisis previa para fragmentar el ADN en nucleósidos. Una vez hidrolizado todo el ADN, se obtendrían los nucleósidos normales y los modificados, por lo que el uso de espectrometría de masas va generalmente acoplado a una separación cromatográfica que permita separar los nucleósidos modificados de los no modificados y del resto de componentes de la matriz evitando la posible supresión de iones en la fuente de ionización <sup>[27]</sup>.

### 1.2.3 Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)

Con el fin de mejorar la sensibilidad ofrecida por la espectrometría de masas, cada vez se están desarrollando más metodologías analíticas basadas en espectrometría de masas tándem [27-39]. La diferencia con respecto a la espectrometría de masas simple es la inclusión de una celda de colisión que permite la fragmentación de los iones aumentando la selectividad y sensibilidad del análisis, ofreciendo así diferentes modos de adquisición de datos en el análisis. Una celda de colisión, representada en la **Figura 4**, suele ser un hexapolo u octapolo presurizado con un gas inerte (normalmente N<sub>2</sub> o Ar) en el que, durante la colisión, la energía cinética de los iones precursores es convertida en energía interna que resulta en la rotura de enlaces y, por consiguiente, en la fragmentación en iones más pequeños, conocidos como iones producto.

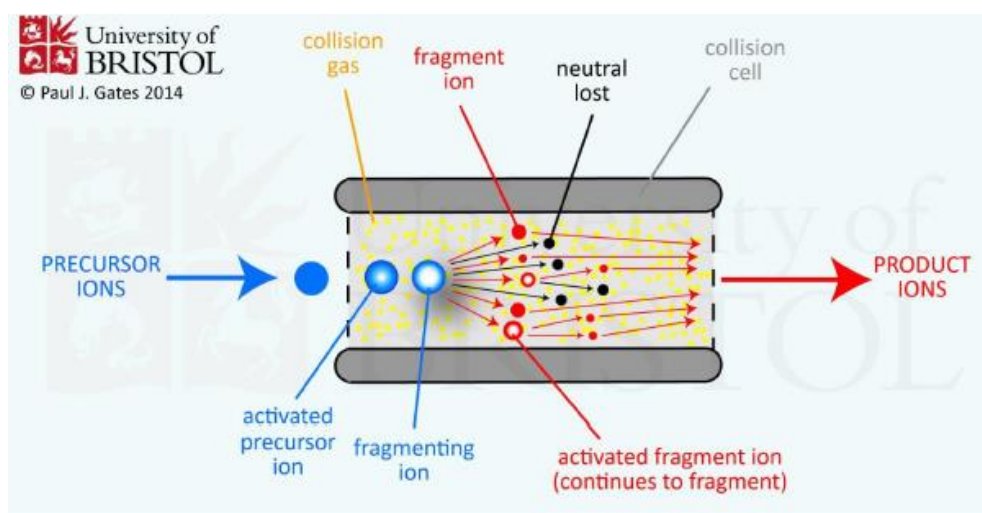


Figura 4: Funcionamiento de una celda de colisión [40].

Los equipos ESI-QqQ son uno de los más utilizados para la cuantificación de metilación de ADN, ya que, aunque otros analizadores como el TOF proporcionen mayor resolución, no proporcionan tanta sensibilidad.

En este trabajo se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas constituido por una fuente de ionización de electrospray “jet stream” (ESI) junto con un analizador de masas de triple cuadrupolo, como se puede ver en la **Figura 5**.



Figura 5: Equipo de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1290 acoplado a espectrometría de masas tándem con fuente de ionización ESI y analizador de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460.

Esta fuente produce, como su propio nombre indica, un aerosol al aplicar un potencial eléctrico fuerte (bajo presión atmosférica) a un líquido que pasa a través de un capilar a un flujo bajo, de forma que al final del capilar se produce una acumulación de cargas en la superficie del líquido que acaba fragmentándose en forma de pequeñas gotas cargadas (**Figura 6**). Estas gotas son dispersadas en un espacio muy limitado gracias a un gas nebulizador (normalmente  $N_2$ ) inyectado coaxialmente. El aerosol obtenido es dirigido hacia regiones con alto vacío para que se produzca la evaporación de las gotas hasta obtener partículas cargadas de tamaño molecular en fase gas.

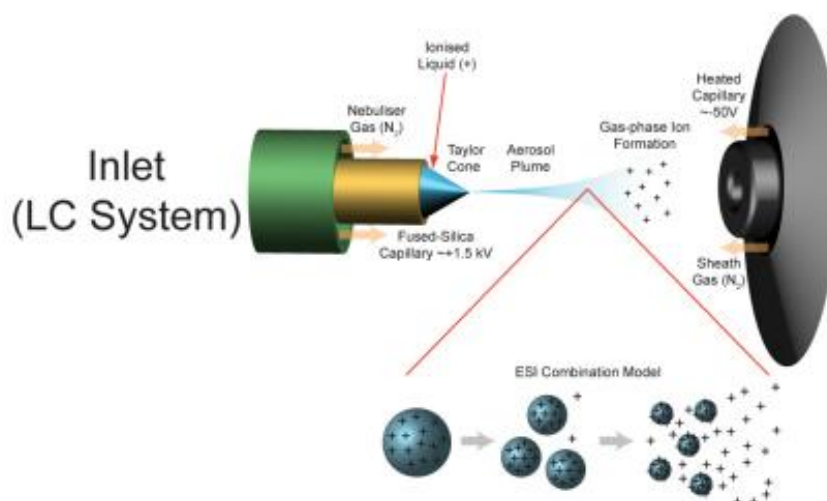


Figura 6: Funcionamiento de la fuente de ionización de electrospray (ESI) [41].

Esta fuente de ionización presenta ventajas como alta sensibilidad, requiere poco volumen de muestra, permite el análisis de compuestos térmicamente lábiles y es compatible con LC; pero no está exenta de algunas desventajas, ya que se ve bastante afectada por la presencia de sales y

detergentes, así como de efectos de matriz. Además, los analitos deben ser polares. Por otra parte, es una fuente bastante suave que produce una fragmentación escasa o nula.

Los iones producidos en la fuente de ionización son posteriormente dirigidos hacia el analizador de masas, que en este caso es un triple cuadrupolo. Aunque de forma general se nombre como triple cuadrupolo, actualmente están formados por un primer cuadrupolo, seguido de un octapolo que actúa como celda de colisión o guía de iones (según interese) y finalmente un segundo cuadrupolo. El cuadrupolo es el analizador más empleado en instrumentos comerciales y consiste en cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica perfectamente paralelas 2 a 2, como se muestra en la **Figura 7**. A dos de las barras se les aplica un potencial  $+(U + V\cos(\omega t))$  mientras que a las otras dos se les aplica un potencial de la misma magnitud pero inverso  $-(U + V\cos(\omega t))$ , de forma que los voltajes aplicados afectan a las trayectorias de los iones que penetran a través del cuadrupolo. Así, a determinados valores de  $U$  y  $V$  solamente algunos iones con  $m/z$  específicos tendrán trayectorias estables capaces de atravesar el cuadrupolo, mientras que el resto de iones serán desviados. A pesar de que el cuadrupolo es un analizador de masas de baja resolución, tiene una alta velocidad de escaneo, gran poder de transmisión y un amplio rango dinámico, lo que lo hace un analizador óptimo para análisis cuantitativos, además de ser un analizador de masas ligero y compacto.

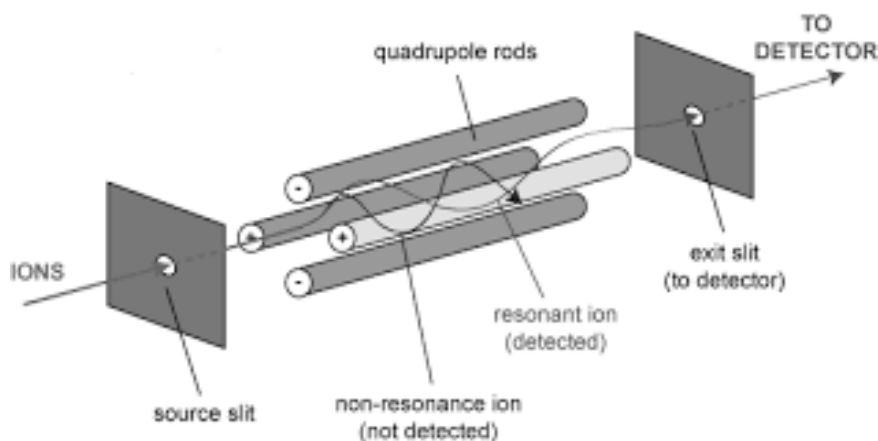


Figura 7: Funcionamiento de un cuadrupolo [42].

### 1.3. Cuantificación mediante Dilución Isotópica acoplada a Espectrometría de Masas (IDMS)

#### 1.3.1 Fundamento de la Dilución Isotópica

La dilución isotópica es un método de análisis basado en la modificación intencionada de la composición isotópica de un elemento o compuesto por la adición en la muestra a analizar de una forma isotópicamente enriquecida de dicho compuesto o elemento <sup>[43]</sup>.



De una forma más visual y sencilla, el análisis por dilución isotópica se podría representar con el ejemplo recogido en la **Figura 8**. En él, se pretende hacer un recuento de bolas negras en un recipiente, pero en vez de contarlas una a una, se añade un número conocido de bolas azules asumiendo que estas últimas son muy similares a las bolas negras diferenciándose únicamente en el color. En el momento en el que se consigue una mezcla homogénea entre los dos tipos de bolas, cualquier alícuota que se tome de la mezcla tendrá la misma relación entre los dos tipos de bolas, independientemente de la cantidad escogida y de cualquier pérdida de bolas que haya ocurrido después de homogeneizarse la mezcla. De esta forma, conocida la relación entre las bolas negras y las bolas azules y la cantidad de bolas azules añadidas, es posible conocer la cantidad de bolas negras que había inicialmente en el recipiente mediante la ecuación indicada en la **Figura 8**.

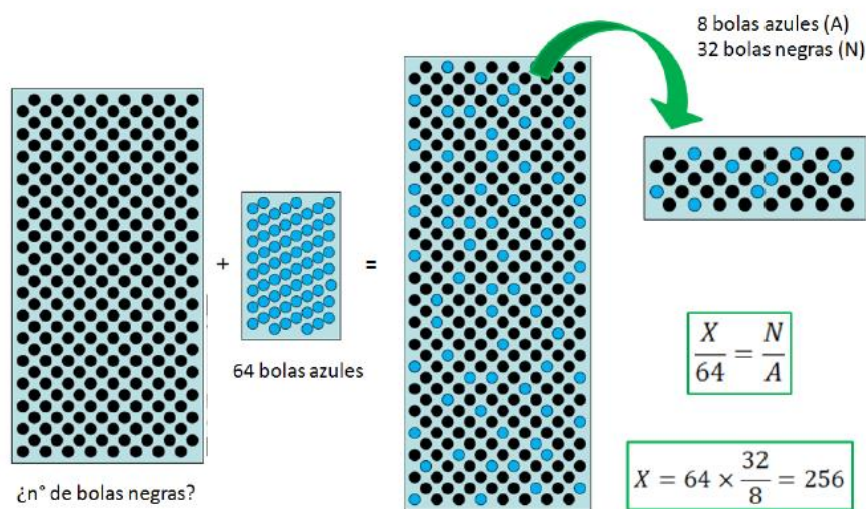


Figura 8: Ejemplo esquematizado de la dilución isotópica [43].

Estos experimentos eran conocidos como métodos captura-recaptura y comenzaron empleándose en estudios ecológicos en el año 1985 para la estimación de poblaciones en sistemas cerrados [43]. En los estudios iniciales se utilizaban isótopos radioactivos, así como técnicas de conteo radioquímicas, pero tras el paso de los años y, sobre todo con el auge de la espectrometría de masas, estos experimentos comenzaron a aplicarse en ámbitos químicos más que biológicos, haciendo uso de isótopos estables enriquecidos y empleando la espectrometría de masas para la medida de relaciones isotópicas.

De esta forma, el análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas se considera un método analítico primario y la técnica preferida para la certificación de materiales de referencia por los Institutos Nacionales de Metrología, ya que las medidas por IDMS son directamente trazables a las unidades del SI [43].

### 1.3.2 IDMS en análisis elemental y molecular

El análisis por IDMS se puede dividir en dos grupos: análisis elemental y análisis molecular. El primero se basa en la determinación de elementos y en el análisis de especiación mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas. Por otra parte, el análisis de moléculas orgánicas abarca un campo más amplio, incluyendo la determinación de moléculas de bajo peso molecular hasta la determinación de macromoléculas [44].

La IDMS elemental se basa en la adición en la muestra a analizar de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido de un elemento de la misma con el fin de modificar la abundancia isotópica de dicho elemento en la muestra. En la **Figura 9** se representa de forma esquemática la composición isotópica de una muestra, del trazador, y la composición final en la mezcla.

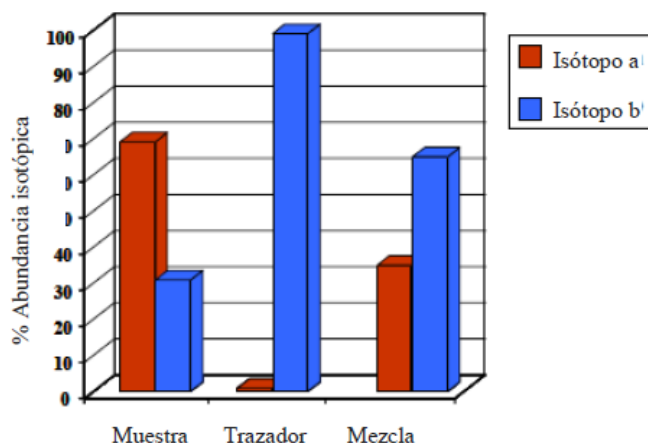


Figura 9: Representación gráfica de la abundancia de un isótopo "a" y un isótopo "b" en una muestra, en el trazador y en la mezcla de ambos.

Si denominamos  $N_s$  al número de moles de analito contenido en la muestra, entonces el número total de moles del elemento en la mezcla ( $N_m$ ) vendrá dado por la Ecuación 1, siendo  $N_t$  el número de moles del trazador en la muestra.

$$N_m = N_s + N_t \quad (\text{Ec.1})$$

Además, si conocemos las abundancias isotópicas ( $A$ ) para dos isótopos (a) y (b) tanto en la muestra como en el trazador, podemos expresar la Ecuación 1 en forma de un balance de masas para cada isótopo (Ecuación 2 y Ecuación 3).

$$N_m A_m^a = N_s A_s^a + N_t A_t^a \quad (\text{Ec.2})$$

$$N_m A_m^b = N_s A_s^b + N_t A_t^b \quad (\text{Ec.3})$$

Si se dividen las dos ecuaciones anteriores, se obtiene una ecuación final para la relación de abundancias isotópicas de los isótopos (a) y (b) en la mezcla ( $R_m$ ), recogida en la Ecuación 4.

$$R_m = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (\text{Ec. 4})$$

Y, despejando  $N_s$  en la ecuación anterior, podemos obtener la ecuación más básica de la dilución isotópica (Ecuación 5).

$$N_s = \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (\text{Ec. 5})$$

La IDMS para moléculas orgánicas es algo más compleja. Normalmente, las determinaciones de compuestos orgánicos conllevan etapas de extracción, preconcentración, derivatización, etc, por lo que se suele añadir un compuesto de concentración conocida que actúe como patrón interno compensando así en los cálculos las pérdidas de analito que pueden ocurrir en las etapas mencionadas anteriormente. Los mejores patrones internos son aquellos que tengan un comportamiento lo más similar posible al del analito. Por tanto, los análogos marcados isotópicamente son la mejor opción para estos análisis, pues son la mejor aproximación en cuanto a las propiedades físico-químicas del analito se refiere.

Para la IDMS en compuestos orgánicos no se puede aplicar la Ecuación 5 ya que la mayoría de los elementos que forman las moléculas orgánicas tienen más de un isótopo estable, por lo que sus espectros de masas consistirán en un clúster formado por las señales correspondientes a la masa monoisotópica (M) y las contribuciones de los isótopos menos abundantes en M+1, M+2, etc. Esto a su vez genera solapamientos espectrales al añadir un compuesto marcado isotópicamente a la muestra, por lo que se deben emplear estrategias que eviten de alguna manera los solapamientos espectrales entre el analito y el trazador <sup>[43]</sup>.

Si se divide la Ecuación 4 entre el número de moles del trazador, obtenemos la Ecuación 6, propuesta por Pickup y McPherson en 1976 como una gráfica de calibración.

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} A_s^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} A_s^b + A_t^b} \quad (\text{Ec. 6})$$

Esta ecuación adquiere una forma lineal cuando el trazador está marcado en varios átomos como para que no exista solapamiento de masas entre los análogos natural y marcado; sin embargo, si el trazador posee pocos átomos marcados, dicha ecuación complica los cálculos tomando una forma polinómica. Por otro lado, una diferencia grande de masa entre el compuesto natural y el

compuesto marcado se puede traducir en la presencia de efectos isotópicos, que se intensifican a medida que aumenta la diferencia de masa relativa entre los isótopos del elemento empleado para el marcaje, especialmente cuando el trazador está marcado en elementos ligeros como el deuterio. Esto puede dar lugar a análisis erróneos, sobre todo con espectrómetros de masas con fuente de ionización de electrospray, ya que la supresión de la ionización en la misma es muy variable con el tiempo y variaciones mínimas en los tiempos de retención podrían dar lugar a cuantificaciones erróneas. Por tanto, empleando un marcaje múltiple se podría aplicar una ecuación lineal de calibración, pero habría mayores probabilidades de presencia de efectos isotópicos; mientras que, utilizando un análogo mínimamente marcado, reduciríamos la posibilidad de efectos isotópicos pero el tratamiento de datos sería más complejo al tener que aplicar un ajuste polinomial.

### 1.3.3 Deconvolución de perfiles isotópicos

Con el objetivo de solucionar el problema de los solapamientos espectrales sin recurrir al marcaje múltiple, el Grupo de Investigación de Isotopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo desarrolló una estrategia denominada “Deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)” basada en el empleo de una regresión lineal múltiple que permite la cuantificación directa del analito, sin necesidad de calibrados metodológicos, reduciendo así el uso de reactivos y el tiempo de operación. Para poder emplear esta estrategia, es necesario que el trazador esté caracterizado con anterioridad, es decir, que su concentración y enriquecimiento isotópico sean perfectamente conocidos.

Esta metodología consiste en una herramienta matemática basada en la regresión lineal múltiple para calcular la contribución individual de perfiles isotópicos definidos a perfiles isotópicos experimentales de una mezcla medida por espectrometría de masas, como se puede ver de forma esquematizada en la **Figura 10**.

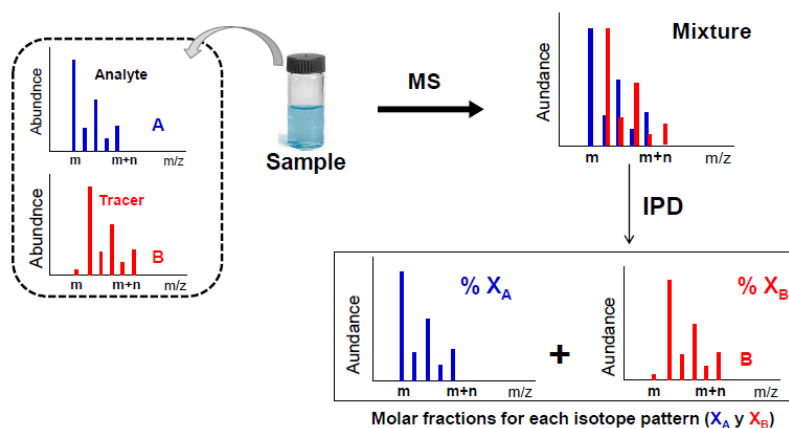


Figura 10: Esquema de la técnica de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).

Para la IDMS, el perfil isotópico experimental debe asumirse como una combinación lineal de dos perfiles isotópicos diferentes: uno procedente del compuesto natural y otro procedente de su análogo marcado, lo que daría lugar a la Ecuación 7, donde, como se puede ver, no se miden las relaciones isotópicas si no las abundancias isotópicas.

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \vdots \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{traz}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{traz}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{traz}^3 \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^n & A_{traz}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{traz} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix} \quad (Ec. 7)$$

Donde “A<sub>m</sub>” son las abundancias experimentales obtenidas en la mezcla, “A<sub>nat</sub>” son las abundancias isotópicas teóricas del compuesto natural, “A<sub>traz</sub>” son las abundancias isotópicas teóricas del trazador, “x<sub>nat</sub>” es la fracción molar del compuesto natural en la mezcla, “x<sub>traz</sub>” es la fracción molar del trazador en la mezcla y “e” son los residuales de la regresión lineal.

Una vez obtenidas las fracciones molares del compuesto natural y del trazador, y conociendo los moles añadidos del trazador al inicio de la mezcla, es posible obtener directamente los moles de compuesto natural en la mezcla a través de la siguiente relación (Ecuación 8).

$$\frac{N_{nat}}{N_{traz}} = \frac{x_{nat}}{x_{traz}} \quad (Ec. 8)$$

En general, la IDMS molecular ha sido utilizada para la cuantificación de analitos con alta exactitud y precisión en una gran variedad de matrices y se ha comenzado a aplicar también a la cuantificación de modificaciones epigenéticas en muestras biológicas dadas sus numerosas ventajas [29,31,34].

#### 1.3.4 Requisitos y ventajas

Para poder aplicar la dilución isotópica a un análisis determinado se deben cumplir una serie de requisitos que, en caso de no cumplirse, darían lugar a cuantificaciones erróneas.

- El compuesto marcado o trazador debe comportarse lo más similar posible al compuesto natural durante todo el proceso analítico. En el caso de los compuestos orgánicos, esto suele ocurrir cuando no existen efectos isotópicos.
- Cualquier pérdida de analito o trazador que ocurra antes de alcanzar el equilibrio isotópico dará lugar a importantes fuentes de error.
- El trazador debe estar completamente caracterizado en concentración y enriquecimiento isotópico y la cantidad del mismo añadida a la muestra debe estar dentro de un rango

determinado que dependerá de la concentración del analito en la muestra y de las abundancias isotópicas.

- La medida de las intensidades de los isotopos debe estar libre de interferencias espectrales y todos los parámetros que afecten a la precisión de las medidas deben estar bajo control.
- Se debe llevar un control exhaustivo de los blancos ya que cualquier tipo de contaminación afectará a valores erróneos de las abundancias.

Una vez asegurados los requisitos anteriores, los análisis por IDMS presentan grandes ventajas siendo las más importantes las siguientes:

- Cualquier variación en la sensibilidad debida a inestabilidades instrumentales no tendrá influencia sobre la concentración final del compuesto
- Una vez que se consigue el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de sustancia no afectará al resultado final
- Los únicos valores a determinar experimentalmente son (en el caso de compuestos orgánicos) las abundancias isotópicas, medidas con precisión mediante espectrometría de masas.
- Reducción de tiempo en comparación con otros métodos analíticos, ya que no se necesita calibración metodológica.

Como se puede observar, la IDMS presenta numerosas ventajas frente a otros métodos analíticos, además de ser un método muy preciso y exacto, aunque también cuenta con algunas desventajas como la no disponibilidad de análogos marcados isotópicamente de algunos compuestos o la dificultad para conseguir la homogeneidad de la mezcla entre la muestra y el trazador en algunos casos.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método de referencia rápido, sencillo y preciso para la cuantificación de citosinas metiladas en ADN que están fuertemente asociadas al desarrollo de enfermedades como el cáncer. Este método se basa en una hidrólisis previa para la conversión de ADN a nucleósidos, que posteriormente serán analizados mediante HPLC-MS/MS y cuantificados mediante dilución isotópica.

Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

- Extracción de ADN marcado isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  de algas *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Hidrólisis del ADN marcado isotópicamente y del ADN de diferentes tejidos de un patrón comercial de ratón.
- Optimización del análisis de dC y 5mdC mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas tándem.
- Caracterización de los nucleósidos marcados isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  en concentración y enriquecimiento.
- Cuantificación del porcentaje de metilación en ADN de diferentes tejidos de ratón mediante dilución isotópica.

El objetivo académico de este Trabajo de Fin de Máster consiste en la aplicación de los conocimientos obtenidos en el Máster Universitario en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas para resolver problemas, adquirir e interpretar datos y transmitir la información en el ámbito de la investigación en la rama de química analítica, así como adquirir experiencia en el manejo de equipos de cromatografía y espectrometría de masas.

### 3. Experimental

#### 3.1 Reactivos

Las muestras de *Chlamydomonas reinhardtii* (cepa CC503 cw92 mt+) fueron proporcionadas por el Chlamydomonas Resource Center de la Universidad de Minnesota, EEUU.

Los nucleósidos de ADN 2'-desoxicitidina, 2'-desoxiadenosina y 2'-desoxiguanosina fueron comprados en Alfa Aesar (EEUU), mientras que la timidina y la 5-metil-2'-desoxicitidina fueron adquiridas en Sigma (EEUU).

El set de ADN metilado de ratón Zymo D5019 se compró al distribuidor Comercial Hospitalaria Grupo 3 (Santiago de Compostela, España).

Para la extracción de ADN: la disolución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), TRIS, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol, alcohol isoamílico, cloroformo, acetato de sodio, etanol e isopropanol fueron comprados en Sigma.

Para la hidrólisis de ADN: la nucleasa P1 y la fosfatasa alcalina fueron adquiridas en Sigma, así como el sulfato de zinc y el HCl.

Para las fases móviles del LC-MS se utilizó metanol de grado OPTIMA LC-MS con una pureza superior al 99,9 % comprado en Fisher Scientific (Massachusetts, EEUU); ácido fórmico de pureza superior al 98 % adquirido en Sigma Aldrich; acetonitrilo de calidad LC-MS adquirido en Fisher Scientific (Massachusetts, EEUU); bicarbonato amónico ( $\geq 99,5$  %) obtenido de Sigma Aldrich (EEUU) y formiato amónico ( $\geq 99,0$  %) de Fluka (Alemania).

#### 3.2 Instrumentación

Para la extracción e hidrólisis de ADN se hizo uso de un termociclador UNO96 HPL (VWR) (Pensilvania, EEUU); un horno Hereaus de ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EEUU); un Nano espectrofotómetro VIS-UV de Nabi (Madrid, España); una centrífuga AccuSpin Micro 17 de Fisher Scientific (Madrid, España); un evaporador MiVac de Genevac de Fisher Scientific (Massachusetts, EEUU); un vortex de Fisher Scientific (Massachusetts, EEUU) modelo TopMix FB15024; un ultrasonicador UP200S de Hielscher Ultrasonics (Teltow, Alemania) y una balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204-S (Madrid, España).

La separación cromatográfica de los nucleósidos se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de Agilent series 1290 (California, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas (modelo Agilent 6460) con una fuente de ionización de electrospray ("jet-stream") y un analizador de masas de triple cuadrupolo. La columna cromatográfica utilizada fue



la columna Luna Omega Polar C18 de Phenomenex (California, EEUU) de dimensiones 100 x 2,1 mm x 1,6  $\mu\text{m}$  junto con una precolumna SecurityGuard™ UPLC C18-Peptide.

La columna utilizada para la prueba de cromatografía HILIC fue la columna Waters BEH Amide UPLC de Waters (Massachusetts, EEUU) de dimensiones 150 mm x 2,1 mm x 1,7  $\mu\text{m}$ .

El agua ultrapura empleada en las disoluciones y en las fases móviles se obtuvo a través de un sistema de destilación PureLab Flex 4 (Francia).

Para el pH de las fases móviles se utilizó un pH-metro Basic 20 de Crison (Barcelona, España)

Se utilizó también material convencional de laboratorio como:

- Viales de vidrio con inserto para HPLC de la casa Cromlab SL modelo 8004-HP-H/i3 $\mu$  (Barcelona, España).
- Tubos tipo Eppendorf graduados y con cierre de seguridad de la casa Astik's modelo PCR-015-500 de 1,5 mL (Barcelona, España).
- Viales de vidrio ámbar de 4 mL de ThermoFisher Scientific modelo C4015-2 (Massachusetts, EEUU).
- Tubos tipo Falcon de 50 mL de ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EEUU).

### 3.3 Procedimientos

#### 3.3.1 Extracción de ADN marcado isotópicamente en $^{15}\text{N}$

Para la obtención de ADN marcado isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  se llevó a cabo un protocolo adaptado de extracción con CTAB <sup>[45]</sup> en algas *Chlamydomonas reinhardtii*. Se parte de 22,5 mg (peso seco) de una muestra liofilizada de algas marcadas isotópicamente en  $^{15}\text{N}$ , se homogeniza y se añaden 800  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción a 60 °C y 7  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, mezclándose por inversión hasta disolución total. La mezcla se incuba durante 30 minutos a 60 °C y 800 rpm (después de 2 minutos es necesario abrir y cerrar los tubos para evitar sobrepresión) y una vez finalizada la incubación, se centrifuga durante 2 minutos a 20000 g y se añaden 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (7,2 mL del primero y 0,3 mL del segundo) agitando suavemente durante 2 o 3 minutos. La mezcla se lleva de nuevo a centrifugar durante 5 minutos a 20000 g y el sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo nuevo, al que se añaden 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío (-20 °C) y se incuba de nuevo durante 30 minutos a -20 °C. La mezcla es centrifugada de nuevo a 20000 g y 4 °C durante 5 minutos y esta vez se descarta el sobrenadante, mientras que el precipitado obtenido se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % frío y se repite el proceso de centrifugado esta vez 10 minutos para descartar posteriormente el sobrenadante. Se

deja evaporar el etanol del precipitado sin que se quede completamente seco y se redisuelve en 30  $\mu\text{L}$  de agua.

Para la eliminación del ARN de la muestra se añaden 5  $\mu\text{L}$  de RNAsa y la mezcla se incuba durante 1 h a 37 °C con el objetivo de fragmentar el ARN en trozos mucho más pequeños que los fragmentos de ADN. Una vez terminada la incubación, se añaden 0,5  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M a pH 5,2 y 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol puro y se centrifuga en frío durante 20 minutos a 4 °C y máxima velocidad para precipitar el ADN. El sobrenadante es desechado y el precipitado se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75 % para repetir la etapa de centrifugado durante 15 minutos y volver a desechar el sobrenadante. El precipitado se deja secar al aire durante más o menos 15 minutos y se reconstituye en 20  $\mu\text{L}$  de agua. Para cuantificar el ADN extraído se emplea el Nabi - Nano espectrofotómetro VIS-UV.

### *3.3.2 Hidrólisis de ácidos nucleicos para la obtención de nucleósidos marcados*

Para la obtención de nucleósidos marcados en  $^{15}\text{N}$  a partir de las muestras de ADN obtenidas se llevó a cabo un protocolo de hidrólisis empleando las enzimas NP1 y fosfatasa alcalina. En él, se parte de 8  $\mu\text{g}$  de muestra y se incuba a 99 °C durante 2 minutos para desnaturalizarla. Finalizada la incubación se colocan rápidamente los tubos Eppendorf en vasos de hielo con agua durante 5 minutos y se añaden 2,5  $\mu\text{L}$  de sulfato de Zn (cofactor) y 5  $\mu\text{L}$  de NP1. La mezcla se deja en el termociclador a 37 °C durante 16 h.

Ya terminada la primera hidrólisis se añaden 3,5  $\mu\text{L}$  de buffer TRIS 0,5 M a pH 8,3 y 2  $\mu\text{L}$  de la enzima fosfatasa alcalina, se mezclan suavemente y se incuban durante 2 h a 37 °C para obtener los nucleósidos. En la **Figura 11** se muestra un esquema ilustrativo de todo el proceso de hidrólisis llevado a cabo.

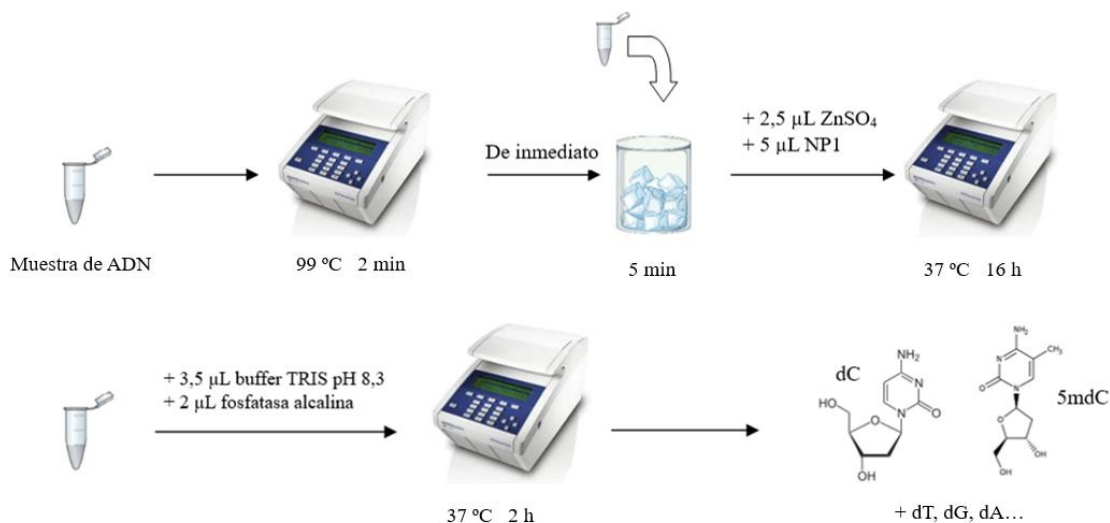


Figura 11: Esquema ilustrativo de la hidrólisis enzimática de ADN.

### 3.3.3 Análisis de nucleósidos por UPLC-MS/MS mediante dilución isotópica

Los nucleósidos son separados mediante una cromatografía líquida en fase reversa empleando como fase A agua ultrapura con bicarbonato sódico 1 mM, metanol puro como fase B, y el gradiente que se muestra en la Tabla 1. Los analitos separados son posteriormente analizados en el espectrómetro de masas en modo de ionización positiva y modo de detección MRM (Multiple Reaction Monitoring). Los parámetros empleados para la separación cromatográfica y para la detección por espectrometría de masas se encuentran recogidos en las tablas Tabla 1 y Tabla 2 respectivamente.

Tabla 1: Condiciones optimizadas para la separación cromatográfica de dC y 5mdC.

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Columna</b>                | Luna Omega Polar C18 (100 x 2,1 mm x 1,6 µm)   |
| <b>Precolumna</b>             | SecurityGuard™ UPLC C18-Peptide  |
| <b>Temperatura de columna</b> | 25 °C  |
| <b>Fase móvil A</b>           | H <sub>2</sub> O ultrapura + 1 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>   |
| <b>Fase móvil B</b>           | Metanol puro   |
| <b>Flujo</b>                  | 0,2 mL/min   |
| <b>Gradiente</b>              | 0 – 4 min 0 % de fase B<br>4 – 7 min 1,50 % de fase B<br>7 – 8 min 90 % de fase B<br>8 – 15 min 90 % de fase B<br>15– 16 min 0 % de fase B<br>16– 20 min 0 % de fase B |

Tabla 2: Condiciones optimizadas del espectrómetro de masas para el análisis de dC y 5mdC.

|  |           |
|--|-----------|
| <b><i>Modo de ionización</i></b>             | Positivo  |
| <b><i>Temperatura del gas</i></b>            | 350 °C    |
| <b><i>Temperatura del gas envolvente</i></b> | 400 °C    |
| <b><i>Flujo de gas envolvente</i></b>        | 12 mL/min |
| <b><i>Flujo de gas</i></b>                   | 7 mL/min  |
| <b><i>Potencial de entrada</i></b>           | 1500 V    |
| <b><i>Potencial del capilar</i></b>          | 2500 V    |
| <b><i>Presión del nebulizador</i></b>        | 35 psi    |

Los resultados son posteriormente adquiridos y tratados mediante el software Agilent MassHunter Workstation.

### 3.3.4 Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico de los nucleósidos marcados en $^{15}\text{N}$

Para llevar a cabo la caracterización del trazador, lo primero que se debe tener en cuenta es que los clústeres obtenidos para las diferentes moléculas en la fuente de ionización no son puros, debido a los diferentes mecanismos de fragmentación que ocurren simultáneamente en la fuente y también al número de iones fragmento que contienen diferente número de hidrógenos y que solapan en el espectro de masas. Por otra parte, la baja resolución del espectrómetro de masas empleado puede dar lugar a señales en la  $m/z$  correspondiente a  $M-1$  incluso con espectrómetros perfectamente calibrados; en concreto, con el cuadrupolo se pueden obtener perfiles con señales no simétricas adyacentes a la masa  $M$ . Tanto para la determinación de la pureza espectral como para el cálculo del enriquecimiento isotópico se empleó un procedimiento desarrollado por el Grupo de Investigación de Isótopos Estables de la Universidad de Oviedo <sup>[46]</sup>.

Para calcular los valores de dichas contribuciones se miden 5 veces las distribuciones isotópicas de los clústeres del dC y del 5mdC en un patrón natural en modo SIM. Las señales de área experimentales se normalizan obteniendo así las abundancias experimentales ( $A_{\text{exp}}$ ); mientras que las abundancias teóricas para los diferentes isotopólogos ( $A_{\text{teo}}$ ) se calculan con la fórmula molecular de cada clúster a través de un algoritmo conocido como Kubinyi <sup>[46]</sup>.

Conocidas las abundancias experimentales y teóricas, ambas se relacionan mediante otra regresión lineal múltiple (Ecuación 9).

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{M-1} \\ A_{exp}^M \\ A_{exp}^{M+1} \\ \vdots \\ A_{exp}^{M+4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & A_{teo}^M \\ A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+1} & A_{teo}^{M+2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{teo}^{M+4} & A_{teo}^{M+5} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_M \\ x_{M-1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix} \quad (Ec. 9)$$

Resolviendo la ecuación anterior se puede determinar el porcentaje de contribución de la señal M-1 al perfil isotópico (debida mayoritariamente a la falta de resolución del cuadrupolo), así como la semejanza entre las abundancias isotópicas teóricas y experimentales.

Una vez determinada la pureza espectral, se procede al cálculo del enriquecimiento isotópico del trazador. Para ello se miden 5 veces las distribuciones isotópicas de los clústeres de dC y 5mdC en un patrón marcado en modo SIM. Las señales experimentales se normalizan de nuevo para obtener las abundancias experimentales y estas abundancias, junto con los valores obtenidos para  $X_{M-1}$  (asumiendo que la pureza espectral es la misma en naturales y marcados) se introducen en un Excel que contiene un algoritmo para calcular el enriquecimiento isotópico. Esta herramienta establece dentro de un rango prefijado de posibles valores de enriquecimiento isotópico, 100 posibles enriquecimientos isotópicos, para los que calcula distintas distribuciones isotópicas teóricas empleando de nuevo el algoritmo de Kubinyi.

## 4. Resultados

### 4.1 Extracción de ADN de algas marcadas isotópicamente en $^{15}\text{N}$

Para la extracción de ADN marcado isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  se tomaron tres réplicas de una muestra de *Chlamydomonas reinhardtii* liofilizada a las que se les aplicó el procedimiento de extracción recogido en el apartado 3.3.1. Al protocolo mencionado se le añadió una etapa de fragmentación con una sonda de ultrasonidos ya que las células no se habían roto por completo en la homogeneización del primer paso del protocolo. Una vez extraído el ADN y tras la etapa de limpieza del ARN, se cuantificó en el Nabi -Nano espectrofotómetro VIS-UV obteniendo valores de 508,3, 252,2 y 430,6  $\mu\text{g/g}$  de ADN para las tres réplicas procesadas. Probablemente en el segundo caso se haya perdido una parte de ADN en alguna de las etapas de lavado.

### 4.2 Hidrólisis enzimática de ADN

El protocolo de hidrólisis enzimática de ADN recogido en la sección 3.3.2 se llevó a cabo tanto para el ADN marcado isotópicamente obtenido de las algas como para las muestras de ADN de tejido de ratón, a excepción de las cantidades, adaptadas en función de la concentración inicial de ADN de las muestras de ratón.

En el caso de las muestras de ADN de ratón, se escogieron dos muestras de ADN de diferentes órganos de ratón, una de ellas de tejido de cerebro y otra de tejido de riñón. Por separado se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se diluyeron con agua ultrapura hasta 10  $\mu\text{L}$ . Las muestras se incubaron a 99  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos para desnaturalizarlas y, una vez finalizada la incubación, se colocaron inmediatamente en hielo durante 5 minutos para evitar la re-naturalización. Manteniendo los tubos Eppendorf en hielo, se añadieron 1,25  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  y 2,5  $\mu\text{L}$  de NP1 y se dejó en el termociclador a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 18 h.

Una vez finalizada la primera hidrólisis, se procedió a la segunda hidrólisis con fosfatasa alcalina para la conversión a nucleósidos. Se añadieron entonces 1,25  $\mu\text{L}$  de buffer TRIS 0,5 M a pH 8,3 y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima fosfatasa alcalina y la mezcla se incubó durante 2 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  para obtener los nucleósidos.

Previo análisis de los nucleósidos marcados obtenidos de las algas, se probaron dos procedimientos de limpieza a diferentes viales con el fin de introducir la menor cantidad de sales y suciedad en el equipo de análisis.

- Limpieza A: se realizó una extracción en fase sólida en la que la disolución de nucleósidos obtenida se pipeteó varias veces a través de puntas ZipTip de micropipeta, que contienen un relleno C18, con el fin de retener los nucleósidos en la misma. Dicha columna se lavó un par de veces con agua para finalmente eluir los nucleósidos en metanol.
- Limpieza B: se añadieron 225  $\mu\text{L}$  de etanol a -20  $^{\circ}\text{C}$  sin agitar y la mezcla se dejó durante 1 h a dicha temperatura para la precipitación de las sales. Posteriormente se llevó a la centrifuga a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos a 14000 rpm y se tomó el sobrenadante.

En ambos casos la disolución fue evaporada bajo corriente de  $\text{N}_2$  y reconstituida en 100  $\mu\text{L}$  de agua para su análisis en el equipo de HPLC-MS/MS.

En el análisis obtenido para la disolución con la limpieza A apenas se observó señal para los compuestos de interés. Esto se debe probablemente a que los analitos son compuestos bastante polares que difícilmente se retienen con un relleno C18 convencional. Sin embargo, sí que se obtuvieron señales apreciables tanto para el residuo que quedó tras la limpieza A, como para la disolución tratada con la limpieza B. Mediante una inyección de la muestra en modo SCAN se pudieron ver los abundantes restos de reactivos usados para la extracción e hidrólisis del ADN, que generaban una elevada supresión de la ionización y además ensuciaban la columna, imposibilitando la observación de los compuestos de interés si las medidas no se realizaban en modo MRM.

### 4.3 Optimización del análisis de dC y 5mdC mediante UPLC-MS/MS

#### 4.3.1 Prueba de las condiciones iniciales

Inicialmente se probaron las condiciones de separación recogidas en la Tabla 3 y las condiciones de detección para el MS recogidas en la Tabla 4, empleadas para la separación de los 5 nucleósidos presentes en el ADN (dC, 5-mdC, dA, dT y dG), inyectando una mezcla de patrones de los cinco compuestos en agua a una concentración de 20 µg/g y posteriormente cada patrón individual a una concentración de 100 µg/g.

Tabla 3: Condiciones iniciales utilizadas en la separación cromatográfica de los nucleósidos.

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Temperatura de columna</b> | 25 °C  |
| <b>Fase móvil A</b>           | H <sub>2</sub> O ultrapura + ácido fórmico al 0,1 %  |
| <b>Fase móvil B</b>           | Metanol  |
| <b>Flujo</b>                  | 0,2 mL/min   |
| <b>Gradiente</b>              | 0 – 4 min 0 % de fase B<br>4 – 14 min 3 % de fase B<br>14 – 15 min 3 % de fase B<br>15 – 20 min 0 % de fase B<br>20 – 25 min 0 % de fase B |

Tabla 4: Condiciones iniciales utilizadas en el espectrómetro de masas para el análisis de los nucleósidos.

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>Modo de ionización</b>             | Positivo  |
| <b>Temperatura del gas envolvente</b> | 400 °C    |
| <b>Temperatura del gas</b>            | 300 °C    |
| <b>Flujo del gas envolvente</b>       | 12 mL/min |
| <b>Flujo del gas</b>                  | 7 mL/min  |
| <b>Potencial de entrada</b>           | 0 V       |
| <b>Potencial del capilar</b>          | 2000 V    |
| <b>Presión del nebulizador</b>        | 40 psi    |

Como se puede observar en la **Figura 12**, los compuestos dA y dC eluían en el mismo pico cromatográfico prácticamente al mismo tiempo de retención; además, los picos cromatográficos correspondientes a los nucleósidos dG y dT también se solapaban, aunque esto no sería un problema mientras no interfieran en la zona de los compuestos de interés. La detección en el MS

se programó para comenzar las medidas a partir del minuto 2 evitando así introducir en el espectrómetro de masas los compuestos no retenidos que eluían al principio.

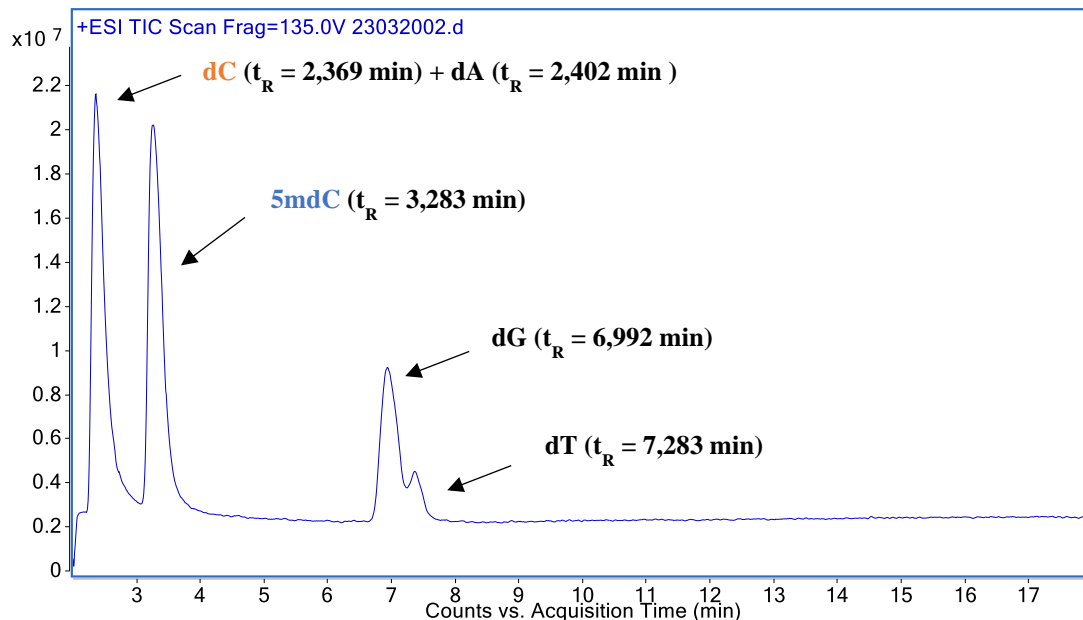


Figura 12: Cromatograma obtenido mediante UPLC-MS para una mezcla de patrones naturales de dC, dG, dA, dT y 5mdC a una concentración de 20 µg/g.

Por otra parte, analizando los espectros de masas de cada pico cromatográfico por separado, se puede apreciar la presencia de más de una señal para cada compuesto, como se muestra en la **Figura 13** y en la **Figura 14**, observando el mismo comportamiento tanto en la mezcla como en los patrones individuales. La señal esperada sería a la m/z correspondiente al peso molecular del nucleósido con 1H debido a la protonación en la fuente de ionización, indicada en las figuras en color azul. En cuanto a la m/z señalada en color verde, se pudo comprobar que aparecía en los espectros de todos los nucleósidos y se corresponde con una pérdida de 115 unidades con respecto al peso molecular del nucleósido, lo que indicaría la pérdida del azúcar desoxirribosa. A pesar de que la fuente ESI es una fuente de ionización bastante suave, en determinados casos puede ocurrir la rotura de los nucleósidos dando lugar a las bases nitrogenadas, como ya ha sido observado por otros autores <sup>[47,48]</sup>. En el caso de la señal obtenida a m/z mayores, aparece a una m/z justo el doble del peso molecular del nucleósido más 1H, por lo que podría ser un aducto.



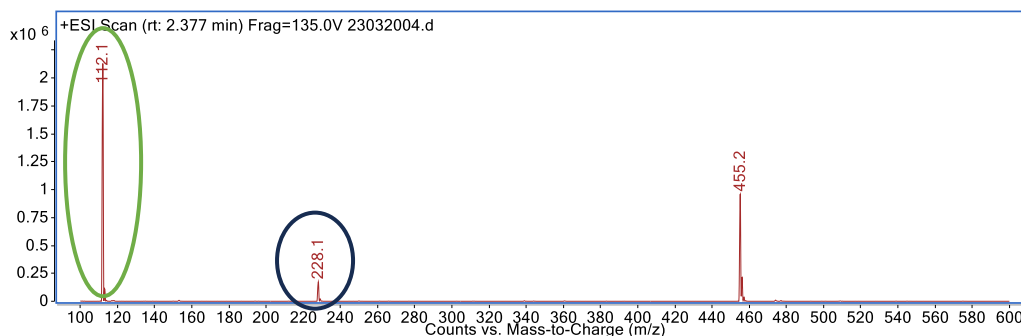


Figura 13: Espectro de masas obtenido para un patrón de 100 µg/g de dC en modo SCAN.

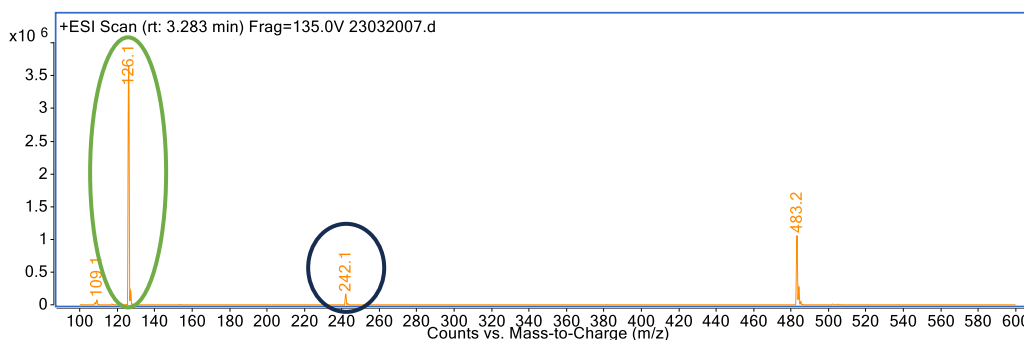


Figura 14: Espectro de masas obtenido para un patrón de 100 µg/g de 5mdC en modo SCAN.

#### 4.3.2 Prueba de diferentes tipos de sales en la fase móvil A

Con el objetivo de intentar aumentar las señales de los espectros de masas correspondientes a la m/z del nucleósido, se probaron diferentes tipos y concentraciones de sales en la fase móvil A, ya que en numerosos estudios las señales obtenidas por espectrometría de masas se veían afectadas por la presencia y concentración de sales [27,49].

Se comenzó probando la adición de bicarbonato amónico a dos concentraciones diferentes (2 y 1 mM) como sustituto del ácido fórmico empleado previamente. En este estudio, además de apreciarse pequeños aumentos en la sensibilidad de los dos compuestos, se observaron diferencias significativas en los tiempos de retención. De esta manera, el primer compuesto en eluir fue la dC, seguido de la 5mdC (ambos picos perfectamente resueltos) y posteriormente coeluyeron la dA, dG y dT, lo cual no sería un gran problema dado que están suficientemente separados de los analitos. Además, se observaron intensidades de pico mayores a concentración de 1 mM con respecto a 2 mM, evitando además introducir demasiada concentración de sales en el equipo.

Seguidamente, se realizó también una prueba con formiato de amonio 1 mM, pero la sensibilidad disminuyó de forma notable con respecto a las dos concentraciones probadas de bicarbonato de amonio, como se puede apreciar en la **Figura 15**. En ella también se puede observar la reducción

del tiempo de análisis ya que se acortó la cromatografía a 15 minutos, pues todos los compuestos estaban eluyendo antes de los 10 minutos.

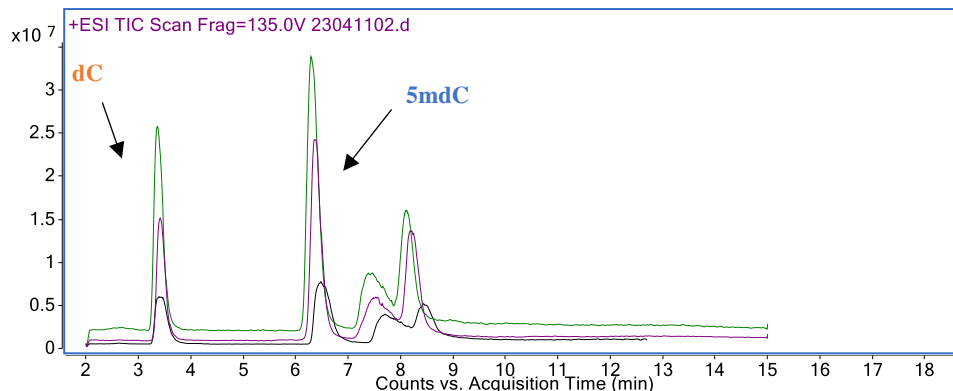


Figura 15: Cromatogramas obtenidos para un mismo patrón de los 5 nucleósidos con diferentes sales en la fase móvil A: formiato de amonio 1 mM (negro), bicarbonato amónico 2 mM (granate) y bicarbonato amónico 1 mM (verde).

En las diferentes pruebas realizadas se continuó observando el mismo patrón de señales del espectro de masas de cada compuesto, con señales a las m/z correspondientes al nucleósido, la base nitrogenada y a un posible aducto.

#### 4.3.3 Prueba de columna HILIC

Con el fin de intentar separar los 5 nucleósidos y de aumentar un poco los tiempos de retención de los primeros, se llevó a cabo una pequeña prueba con una columna HILIC, ya que los analitos son bastantes polares y en una fase estacionaria polar se deberían quedar más retenidos. Previo al análisis se llevó a cabo una limpieza de la columna manteniéndola durante unas horas con 60 % de fase móvil A (ACN) y 40 % de fase móvil B (agua), a un flujo de 0,2 mL/min. Las condiciones de separación cromatográfica se recogen en la Tabla 5 mientras que las condiciones de detección del MS se mantuvieron como anteriormente (Tabla 4).

Tabla 5: Parámetros de la separación cromatográfica para el análisis con la columna HILIC

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Temperatura de columna</b> | 25 °C  |
| <b>Fase móvil A</b>           | H <sub>2</sub> O ultrapura + 2,5 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>   |
| <b>Fase móvil B</b>           | ACN puro   |
| <b>Flujo</b>                  | 0,2 mL/min   |
| <b>Gradiente</b>              | 0 – 1,5 min 95 % de fase B<br>1,5 – 3,7 min 50 % de fase B<br>3,7– 8,6 min 50 % de fase B<br>8,6 – 8,7 min 95 % de fase B<br>8,7 – 14 min 95 % de fase B |

El cromatograma obtenido se representa en la **Figura 16**, donde se puede observar bastante inestabilidad, reflejada en altos fondos, además de solamente 2 picos cromatográficos entre los cuales coeluyeron los 5 compuestos.

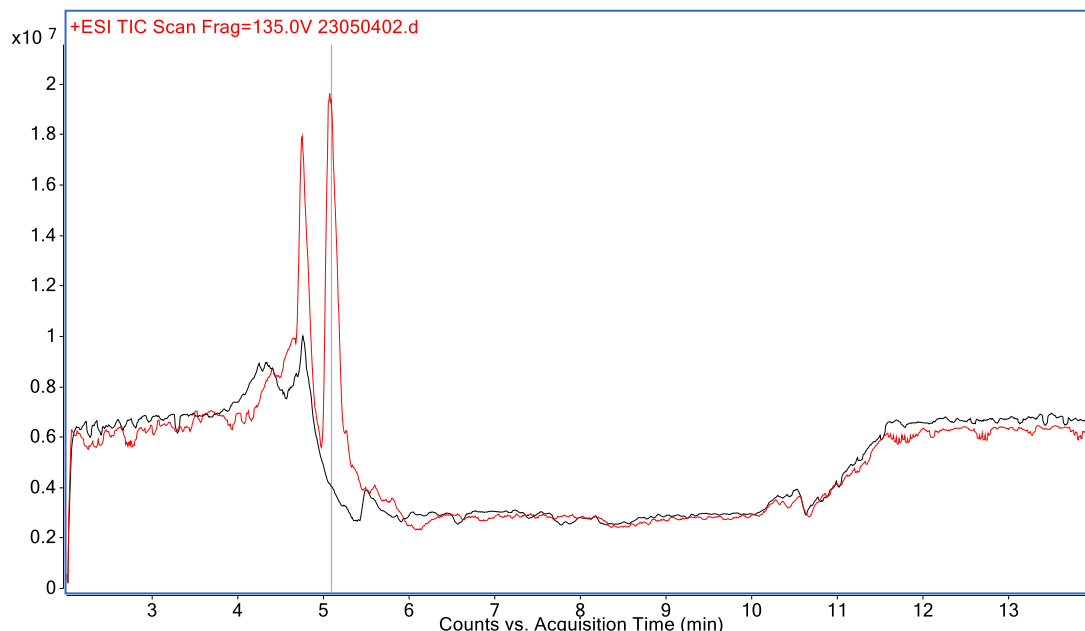


Figura 16: Cromatograma obtenido en modo SCAN para una mezcla de patrones de dG, dA, dC, 5mdC y dT a una concentración de 20  $\mu\text{g/g}$  con la columna cromatográfica HILIC. Negro: fondo (agua ultrapura); Rojo: mezcla de patrones de los 5 nucleósidos.

En el espectro de masas correspondiente al pico 1 solo se distingue la señal correspondiente a la base nitrogenada de la dA, como se indica en la **Figura 17**; mientras que en el espectro de masas del 2º pico cromatográfico (**Figura 18**) se observan todas las señales del dC y del 5mdC por lo que se puede confirmar la coelución de ambos compuestos en el segundo pico. Por otra parte, no aparecen señales correspondientes a la dG y la dT por lo que probablemente sus señales estén ocultas bajo los fondos, lo que podría confirmarse extrayendo las m/z correspondientes del cromatograma o realizando un análisis en modo MRM.

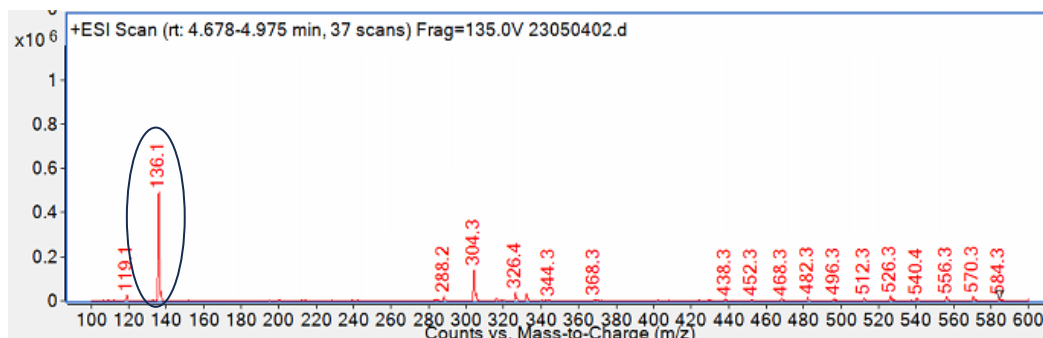


Figura 17: Espectro de masas obtenido para el 1er pico cromatográfico de la Figura 15.

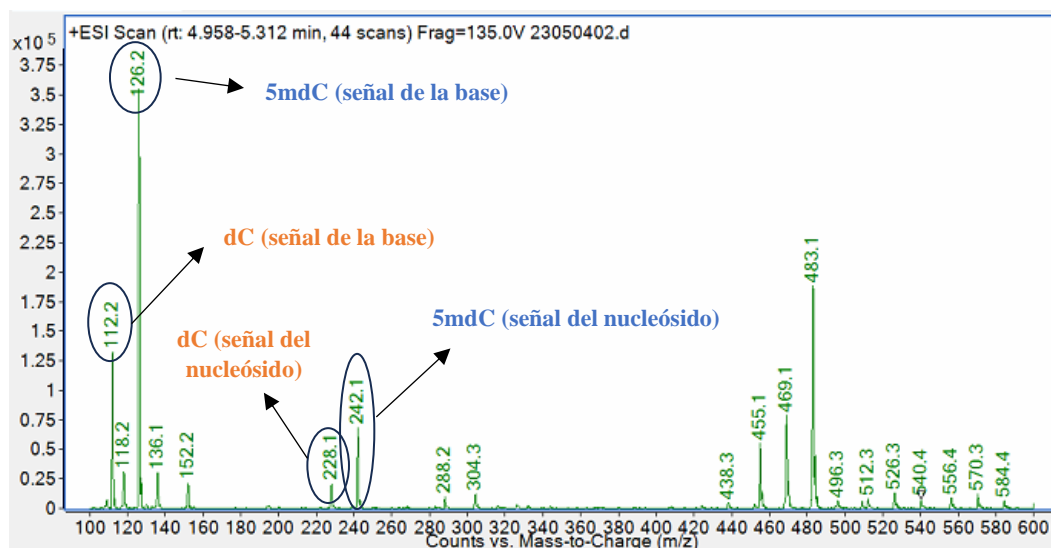


Figura 18: Espectro de masas obtenido para el 2º pico cromatográfico de la Figura 15.

Finalmente se decidió no continuar con la cromatografía HILIC puesto que la columna cromatográfica estaba bastante usada, no presentaba mucha reproducibilidad y los compuestos de interés coeluían, mientras que en fase reversa ambos compuestos estaban completamente separados y los análisis resultaban más reproducibles.

#### 4.3.4 Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas

Una vez optimizada la cromatografía y los parámetros asociados con la misma, se procedió a optimizar los parámetros asociados a la fuente de ionización y a la celda de colisión para obtener las mayores señales analíticas posibles.

Para la optimización de la fuente de ionización, se llevaron a cabo inyecciones de patrones de dC y 5mdC en modo FIA y SIM y se intentó encontrar un compromiso entre la señal de la base nitrogenada y la señal del nucleósido con el fin de elegir más adelante cuál de las dos sería más conveniente monitorizar.

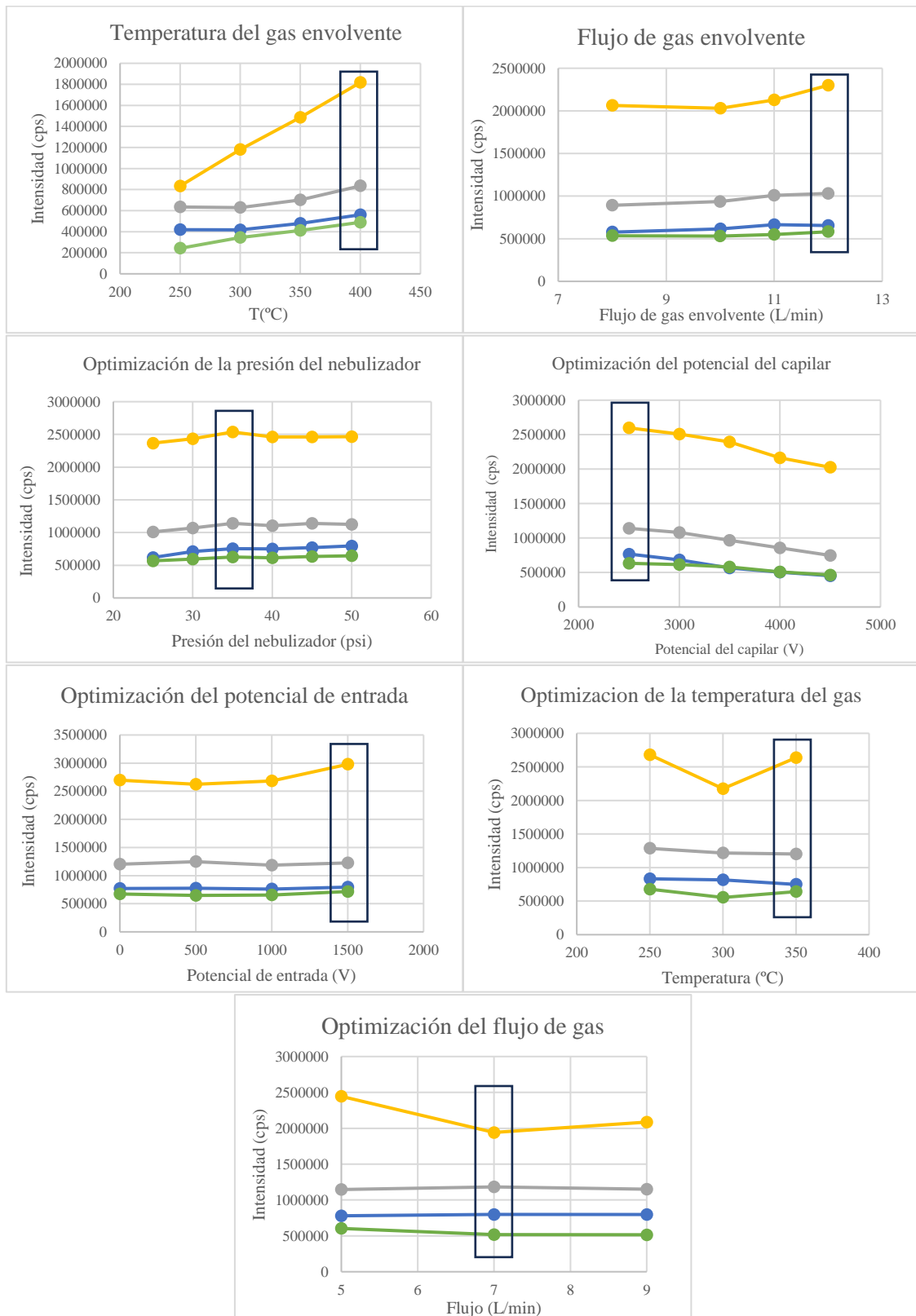


Figura 19: Gráficas de los parámetros optimizados en la fuente de ionización para el dC y el 5mC. Amarillo: señal del nucleósido de la 5mC; Gris: señal de la base nitrogenada de la 5mC; Azul: señal de la base nitrogenada de la dC; Verde: señal del nucleósido de la dC.

En la **Figura 19** se muestran las gráficas correspondientes a la optimización de cada parámetro de la fuente de ionización ESI, en las que se observa una mayor sensibilidad para el compuesto 5mdC que para el dC. Para todos los parámetros se escogieron los valores que mayor señal analítica proporcionaron, excepto en el flujo de gas, que se estableció en 7 mL/min ya que el sistema instrumental presentaba mayor estabilidad a dicho flujo que a 9 mL/min. Las condiciones optimizadas son las recogidas en la Tabla 2 de la sección 3.3.3.

Una vez optimizados todos los parámetros de la fuente de ionización, se optimizaron también los parámetros de la celda de colisión, que se recogen en la Tabla 6. Los análisis se llevaron a cabo en modo MRM tras haber realizado varios análisis previos en modalidad de *Product Ion* con el fin de conocer el perfil de fragmentación de cada compuesto y escoger los iones producto con mayor señal. Para las transiciones de las bases nitrogenadas como ión precursor, se escogieron como iones producto las bases nitrogenadas con la pérdida de un grupo amino  $[M-NH_3]^+$ , mientras que para las transiciones de los nucleósidos, se escogieron las bases nitrogenadas como ión producto.

Tabla 6: Parámetros de la celda de colisión optimizados para los compuestos dC y 5mdC.

| Transiciones     | Fragmentor | Energía de colisión (eV) | Potencial de aceleración de celda (V) |
|------------------|------------|--------------------------|---------------------------------------|
| 112 → 95 (dC)    | 150        | 19                       | 7                                     |
| 228 → 112 (dC)   | 150        | 6                        | 6                                     |
| 126 → 109 (5mdC) | 150        | 18                       | 6                                     |
| 242 → 126 (5mdC) | 150        | 9                        | 5                                     |

#### 4.3.5 Estudio de la variación de las señales con la concentración inyectada

Con el fin de determinar si se producía variación en el perfil de fragmentación del nucleósido en función de la concentración, se llevó también a cabo un estudio de la variación de las señales correspondientes a la base nitrogenada, al nucleósido y al aducto con la concentración del patrón, inyectando diferentes volúmenes de inyección de una misma disolución patrón de 5mdC de 0,1 µg/g en modo MRM.

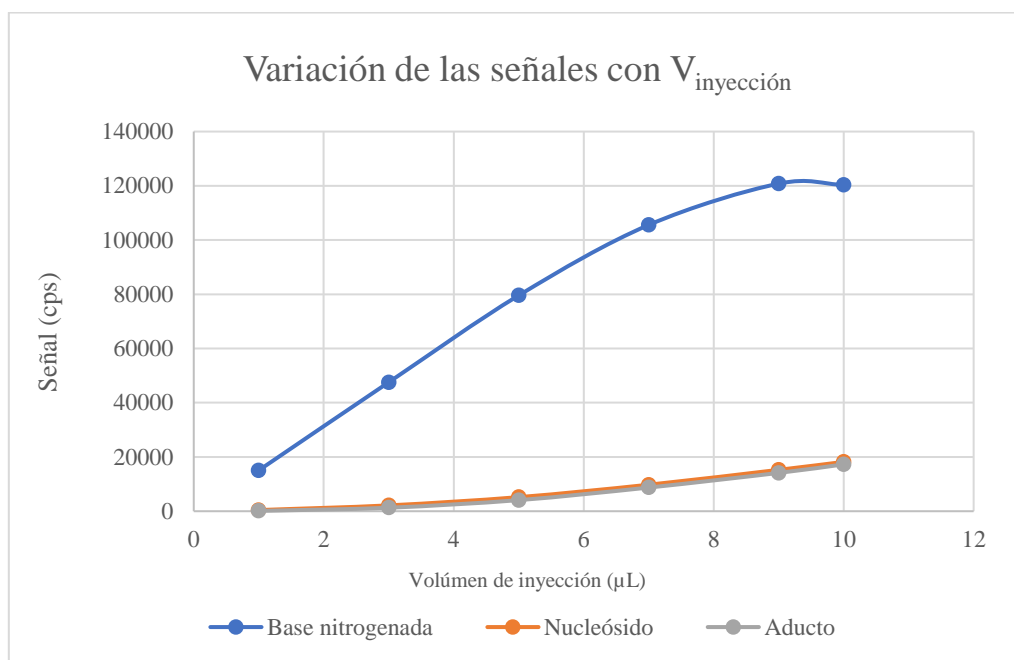


Figura 20: Gráfica comparativa de la variación de las señales correspondientes a las transiciones en MRM de la base nitrogenada, el nucleósido y un posible aducto del compuesto 5mdC con distintos volúmenes de inyección de un patrón de concentración 0,1  $\mu\text{g/g}$ .

En la **Figura 20** se puede ver un comportamiento muy similar para la señal del nucleósido protonado y para el supuesto aducto, aumentando suavemente con la cantidad de volumen inyectado. Sin embargo, la señal de la base nitrogenada aumentaba de forma considerable hasta alcanzar una meseta a un volumen de inyección de 9-10  $\mu\text{L}$ .

En todos los espectros obtenidos hasta el momento la señal correspondiente a la base nitrogenada fue bastante superior a la del nucleósido, que era bastante escasa en algunos casos. Además, dado que la señal correspondiente a la base nitrogenada aparece en el mismo tiempo de retención que el nucleósido, se puede concluir que la fragmentación del nucleósido se produce en la fuente de ionización, como se había predicho anteriormente. Por ello, para continuar con el trabajo se decidió monitorizar la  $m/z$  de la base nitrogenada para obtener una mayor sensibilidad.

Dado que las señales de las bases nitrogenadas aparecen en zonas del espectro a  $m/z$  más bajas donde suele aparecer más suciedad, se realizó un calibrado por patrones externos tanto para la dC como para la 5mdC para estimar los límites de detección, puesto que, en futuras aplicaciones a muestras biológicas, estos compuestos estarán presentes en una matriz con más componentes. Los valores encontrados fueron de 1,97 y 6,57  $\text{ng/g}$  para los límites de detección y de cuantificación de la dC, respectivamente; y 1,80 y 6,02  $\text{ng/g}$  para los límites de detección y de cuantificación de la 5mdC, respectivamente; mientras que en el caso de los nucleósidos, se encontraron 5,60 y 18,66

ng/g para los LODs y LOQs de la dC respectivamente y 2,78 y 9,25 ng/g para los LODs y los LOQs de la 5mdC, respectivamente.

#### 4.4 Determinación de la pureza espectral y el enriquecimiento isotópico de los nucleósidos marcados en $^{15}\text{N}$

Los nucleósidos marcados isotópicamente en  $^{15}\text{N}$  se obtuvieron de las algas *Chlamydomonas reinhardtii*, con todos los nitrógenos marcados isotópicamente, tras la extracción e hidrólisis de ADN de las mismas. Debido a que no son patrones comerciales y a que tampoco se realizó una etapa de purificación por falta de tiempo, se modificó el gradiente cromatográfico de forma que al eluir el segundo compuesto, se realizara en cada inyección una limpieza exhaustiva con un alto porcentaje de metanol al final del gradiente. El gradiente cromatográfico se recoge en la Tabla 7.

Tabla 7: Gradiente cromatográfico utilizado para la medida de compuestos marcados sin purificar y muestras.

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Flujo</b>     | 0,2 mL/min   |
| <b>Gradiente</b> | 0 – 4 min 0 % de fase B<br>4 – 7 min 1,50 % de fase B<br>7 – 8 min 90 % de fase B<br>8 – 15 min 90 % de fase B<br>15– 16 min 0 % de fase B<br>16– 20 min 0 % de fase B |

Una vez obtenidos los nucleósidos marcados, se llevó a cabo un análisis en modo PI con el fin de comprobar que el perfil de fragmentación era el mismo que para sus análogos naturales. En este proceso, la base nitrogenada pierde una de las tres marcas, ya que durante la transición de la misma como ión precursor se pierde un grupo amino.

Para el cálculo de la pureza espectral, se realizaron cinco inyecciones de una disolución patrón mezcla de los compuestos naturales de dC y 5mdC a una concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  en modo SIM y las áreas obtenidas se normalizaron para calcular las abundancias. Estas abundancias experimentales junto con las abundancias teóricas se introdujeron en la Ecuación 9 para calcular la contribución del M-1 al perfil isotópico.



Tabla 8: Valores obtenidos para las contribuciones del M-1 al perfil isotópico para el dC y el 5mdC, junto con el clúster medido, el tiempo de retención y la fórmula del compuesto.

| Nucleósido | t <sub>R</sub> (min) | Fórmula  | Clúster (m/z) | X <sub>M-1</sub> (%) |
|------------|----------------------|--|---------------|----------------------|
| dC         | 3,03                 | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O | 111-116       | 1,76 ± 0,08          |
| 5mdC       | 5,50                 | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O | 125-130       | 2,02 ± 0,07          |

En la Tabla 8 se recogen los valores obtenidos para las contribuciones del valor M-1 al perfil isotópico de cada compuesto.

Para la determinación del enriquecimiento isotópico, se midió de nuevo 5 veces una disolución mezcla de dC y 5mdC marcados en modo SIM y las áreas obtenidas se normalizaron para calcular las abundancias. Mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 se calcularon los enriquecimientos isotópicos de cada compuesto, que se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9: Enriquecimientos isotópicos encontrados para los patrones marcados de dC y 5mdC, junto con el clúster medido, el tiempo de retención y la fórmula del compuesto.

| Nucleósido                         | t <sub>R</sub> (min) | Fórmula  | Clúster (m/z) | Enriquecimiento isotópico (%) |
|------------------------------------|----------------------|--|---------------|-------------------------------|
| <sup>15</sup> N <sub>3</sub> -dC   | 3,03                 | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> <sup>15</sup> N <sub>3</sub> O | 111-116       | 98,36 ± 0,56                  |
| <sup>15</sup> N <sub>3</sub> -5mdC | 5,50                 | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> <sup>15</sup> N <sub>3</sub> O | 125-130       | 98,93 ± 0,47                  |

#### 4.5 Validación del método de medida en MRM

Una vez determinado el enriquecimiento isotópico de los dos compuestos y realizado el barrido de los iones producto para escoger las transiciones en MRM, se compararon las abundancias experimentales obtenidas tanto para los compuestos naturales como para sus análogos marcados con las abundancias teóricas proporcionadas por el software *Isopattern*, el cual, al proporcionarle las fórmulas de los iones precursores e iones producto, así como el enriquecimiento isotópico, proporciona las abundancias teóricas correspondientes. Los valores del *fragmentor*, la energía de colisión y el potencial de celda empleados fueron aquellos optimizados para sus análogos naturales. Las transiciones medidas se indican en la Tabla 10.

Tabla 10: Transiciones medidas en MRM para los compuestos naturales y marcados.

| Nucleósido                       | Transiciones medidas en MRM |
|----------------------------------|-----------------------------|
| dC                               | 112 → 95                    |
|                                  | 113 → 96                    |
| <sup>15</sup> N <sub>3</sub> -dC | 115 → 97                    |
|                                  | 116 → 98                    |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 5mdC                               | 126 → 109 |
|                                    | 127 → 110 |
| <sup>15</sup> N <sub>3</sub> -5mdC | 129 → 111 |
|                                    | 130 → 112 |

De una forma más visual, las abundancias experimentales se compararon con las teóricas mediante diagramas de barras tanto para el compuesto natural como para el compuesto marcado en la **Figura 21**.

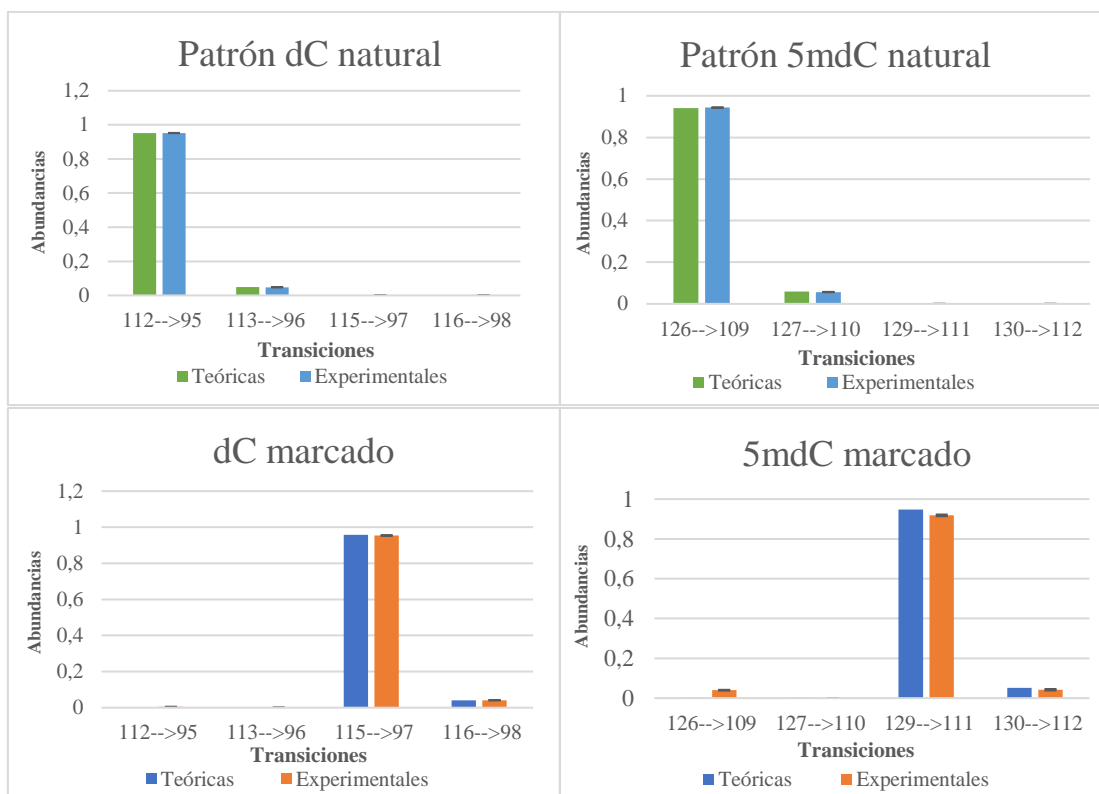


Figura 21: Gráficas comparativas de las abundancias teóricas y experimentales para las transiciones de MRM de los compuestos dC y 5mdC con patrones naturales y marcados.

Para los patrones naturales de ambos compuestos se obtuvieron abundancias experimentales concordantes con las abundancias teóricas. Sin embargo, para el 5mdC marcado, se encontró una abundancia bastante alta en la transición 126 → 109, correspondiente al compuesto natural. En esta transición deberíamos encontrar una abundancia mínima debida a que el enriquecimiento es del 98,9 %, sin embargo, la abundancia encontrada es mayor, lo que podría deberse a una eventual contaminación de la muestra con el compuesto natural. De hecho, esto también ocurre para el dC marcado, aunque en menor medida.

Una vez validadas las medidas por MRM, se inyectó una mezcla de los dos compuestos naturales y marcados y se calcularon las concentraciones de los patrones marcados mediante dilución isotópica inversa, obteniendo concentraciones de  $0,785 \pm 0,016 \mu\text{g/g}$  para el dC y  $0,0096 \pm 0,0011 \mu\text{g/g}$  para el 5mdC en el trazador.

#### 4.6 Determinación del porcentaje de citosinas metiladas en ADN mediante análisis por dilución isotópica

Finalmente, para aplicar el método desarrollado a muestras biológicas reales, se realizó un estudio de cuantificación del porcentaje de metilación de ADN en patrones comerciales de ADN de diferentes órganos de ratón. Para ello, se inyectaron en el equipo de medida 3 réplicas, cada una de ellas compuestas por 50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de la muestra hidrolizada de ADN de tejido de cerebro de los patrones comerciales de ratón y 50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:2 del patrón marcado caracterizado. Se realizó el mismo procedimiento con 3 réplicas de tejido de riñón de los patrones comerciales de ratón.

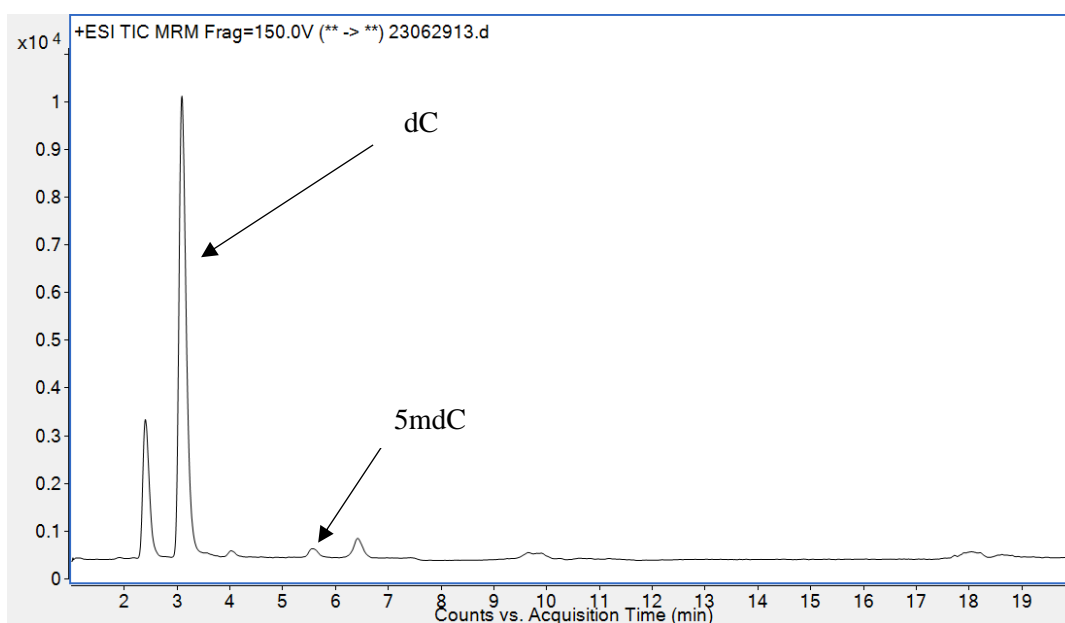


Figura 22: Cromatograma obtenido en MRM para la mezcla de trazador con la muestra de ADN de cerebro de los patrones comerciales de ratón.

En la **Figura 22** se muestra el cromatograma obtenido para la muestra de cerebro de ratón tras la adición del trazador para la cuantificación mediante dilución isotópica. A la izquierda del pico cromatográfico del compuesto dC se puede apreciar otro pico con bastante señal, el cual se debe probablemente a la presencia de base nitrogenada de dC (citosina) en la muestra, ya que se corresponde con las transiciones de MRM de la misma.

El porcentaje de metilación obtenido se calculó como la cantidad de 5mdC en la muestra dividido entre la cantidad de citosinas totales dC + 5mdC en la misma, todo ello multiplicado por 100. El porcentaje encontrado para el tejido de cerebro fue de un  $2,68 \pm 0,17$  % calculado a partir de las tres inyecciones de las tres réplicas procedentes de la misma muestra; mientras que los valores encontrados por la casa comercial fueron de 0,548%. Para la muestra de tejido de riñón se encontró un porcentaje de metilación de  $2,62 \pm 0,13$  %; mientras que los valores proporcionados por la casa comercial fueron de 0,225%, es decir, la mitad que el anterior.

También se observó que, mientras las fracciones molares de la 5mdC de la muestra y del trazador eran muy similares, las obtenidas para la dC eran bastante superiores en el trazador que en la muestra, lo que quiere decir que la proporción entre dC y 5mdC en el trazador era diferente a la proporción de los mismos en la muestra. Como solución, en futuros experimentos sería conveniente llevar a cabo una cromatografía semipreparativa para aislar las fracciones de dC y 5mdC marcadas isotópicamente, obteniendo así dos disoluciones patrón independientes que se puedan añadir a las muestras en las proporciones más adecuadas para cada compuesto.

Dadas todas las fuentes de error posibles que pudieron dar lugar a una cuantificación errónea, se decidió realizar un estudio de recuperaciones con el fin de comprobar si el fallo tenía su origen en el propio método de cuantificación o en las etapas previas de preparación de la muestra. Para ello, se prepararon tres muestras de 20  $\mu$ L de extracto de ADN hidrolizado de tejido de cerebro del patrón de ratón a las que se añadieron diferentes niveles de concentración de un patrón natural mezcla de dC y 5mdC:

Nivel 0  $\rightarrow$  no se añadió patrón natural

Nivel 1  $\rightarrow$  se añadieron 50  $\mu$ L de una disolución de 300 ng/g de dC y 8 ng/g de 5mdC.

Nivel 2  $\rightarrow$  se añadieron 50  $\mu$ L de una disolución de 600 ng/g de dC y 16 ng/g de 5mdC

Las tres disoluciones se llevaron con agua a un volumen final de 200  $\mu$ L. De cada una de las disoluciones anteriores se tomaron 50  $\mu$ L y se mezclaron con 50  $\mu$ L de una dilución 1:2 de la disolución del trazador para ser inyectadas en el equipo de medida. El procedimiento seguido se llevó a cabo de la misma manera para 3 muestras del extracto de ADN hidrolizado de riñón de ratón.

Los resultados obtenidos para las recuperaciones a los dos niveles de concentración para cada nucleósido se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11: Recuperaciones encontradas en las muestras de ADN hidrolizado de dos tejidos diferentes de ratón para la dC y la 5mdC a dos niveles de concentración.

| Tejido  | Nucleósido | % Rec. (Nivel 1) | % Rec. (Nivel 2) |
|---------|------------|------------------|------------------|
| Cerebro | dC         | 104,3            | 90,7             |
|         | 5mdC       | 78,3             | 101,5            |
| Riñón   | dC         | 91,7             | 92,7             |
|         | 5mdC       | 90,5             | 89,9             |

Como se puede comprobar, se obtuvieron recuperaciones entre 90,5 y 104,5% para el compuesto dC en ambos tejidos, bastante aceptables teniendo en cuenta que se estaba trabajando con cantidades en torno a 0,03 nanomoles. Para la 5mdC las recuperaciones encontradas fueron más variables (78-102%) probablemente debido a que las señales son muy bajas y se están cuantificando concentraciones próximas a los límites de cuantificación calculados anteriormente; en este caso se estaba trabajando con cantidades en torno a 0,001 nanomoles.

Los estudios de recuperación realizados apuntan a que los errores en la determinación del porcentaje de metilación no parecen estar relacionados con el método de cuantificación, si no que más bien podrían deberse a motivos relacionados con el proceso de hidrólisis, ya que no fue optimizado por falta de tiempo, por lo que podría darse el caso de que la eficacia de hidrólisis no fuese la misma para los dos compuestos.

## 5. Conclusiones

A lo largo del presente trabajo se ha conseguido obtener un patrón de dC y 5mdC enriquecidos isotópicamente en los nitrógenos de la base nitrogenada a partir de la extracción e hidrólisis de ADN procedente de *Chlamydomonas reinhardtii*, que habían sido cultivadas en un medio enriquecido en  $^{15}\text{N}$ . El patrón obtenido se caracterizó en términos de enriquecimiento isotópico (>98 %) y concentración.

Por otro lado, se ha puesto a punto un método de separación cromatográfica y detección mediante MS/MS en modo MRM de los dos compuestos.

En cuanto a la separación cromatográfica, la cromatografía en fase reversa C18 funcionalizada con grupos polares ha presentado mejores perfiles cromatográficos que la cromatografía HILIC. Además, se ha comprobado que la presencia de bicarbonato amónico en la fase móvil no solo mejoró la sensibilidad, probablemente al mejorar la eficacia en el proceso de electronebulización, si no que también permitió la separación completa de los dos compuestos de interés.

En cuanto a la detección, se ha observado que, a pesar de utilizar una fuente de ionización débil como es ESI, en el caso de los nucleósidos se produce la ruptura de la molécula a través del enlace que une el azúcar con la base nitrogenada, resultando en todos los casos mayor la señal correspondiente a la base nitrogenada que al nucleósido intacto.

Por otra parte, se han podido evaluar las medidas MRM al obtener abundancias experimentales para las diferentes transiciones similares a las teóricas, si bien para los compuestos marcados isotópicamente se obtuvieron abundancias experimentales ligeramente más altas de las esperadas para la transición correspondiente al compuesto natural, lo que puede indicar una eventual contaminación con el compuesto natural.

Desafortunadamente no se ha podido validar el método en términos de exactitud dado que los valores de porcentaje de metilación encontrados en patrones de ADN de cerebro y riñón de ratón eran bastante superiores a los aportados por la empresa que los comercializa. Los ensayos de recuperación añadiendo los patrones naturales de dC y 5mdC a los extractos de hidrólisis de estos patrones sugieren que el problema pueda radicar en la etapa de hidrólisis, que no fue optimizada por falta de tiempo.

## 6. Próximos enfoques

Dada la importancia de la cuantificación de la metilación de ADN en muestras biológicas para su monitorización como biomarcador tumoral y para su posible estudio para el desarrollo de terapias personalizadas, sería interesante continuar en este campo tan prometedor, por lo que teniendo en cuenta las conclusiones de este trabajo, propongo los siguientes trabajos futuros:

- Estudio y optimización de la hidrólisis de ADN.
- Etapas de purificación de los compuestos marcados para evitar introducir suciedad en el equipo cromatográfico y minimizar la presencia de posibles interferentes.
- Estudio exhaustivo de la fragmentación en la fuente de ionización de los nucleósidos, así como de la estabilidad de las bases nitrogenadas que se originan en la misma.
- Análisis de los productos de la oxidación de 5mdC, es decir, de 5hmC, 5caC y 5fC, que también intervienen en el ciclo de metilación-desmetilación, así como de la 6mA, que también se está estudiando como biomarcador tumoral <sup>[50,51]</sup>.
- Aplicación de la cromatografía de líquidos bidimensional a la separación de los extractos de las muestras con el fin de descartar todos los componentes de las muestras biológicas que pueden interferir o enmascarar la señal de los analitos.

## 7. Bibliografía

- [1] Michin S., Lodge J., (2019), Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids, *Essays in Biochemistry*, 63, 433-456
- [2] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002), The structure and function of DNA, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 4th Edition
- [3] National Human Genome Research Institute, [https://www.genome.gov/genetics-glossary/DeoxyribonucleicAcid#:~:text=DNA%20is%20made%20of%20two,\)%20or%20thymine%20\(T\)](https://www.genome.gov/genetics-glossary/DeoxyribonucleicAcid#:~:text=DNA%20is%20made%20of%20two,)%20or%20thymine%20(T)) (último acceso 02/06/23)
- [4] Pray L., (2008), Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick, *Nature Education*, 1, 100
- [5] Martínez Frías M.L., (2010), Estructura y función del ADN y de los genes. I tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones, *Semergen*, 36 (5), 273-277
- [6] Arizona State University, <https://askabiologist.asu.edu/estructura-forma-ADN> (último acceso 08/06/23)
- [7] Universidad Internacional de Valencia; Ciencias de la Salud, <https://universidadviu.com/es/actualidad/nuestros-expertos/adn-y-arn-concepto-diferencias-y-funciones> (último acceso 08/06/23)
- [8] Jaenisch R., Bird Adrian., (2003), Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics*, 33, 245-254
- [9] Jouve de la Barreda N., (2020), La epigenética. Sus mecanismos y significado en la regulación génica., *Cuadernos de Bioética*, 31, 405-419
- [10] Yuanjun Lu, Yau-Tuen Chan, Hor-Yue Tan, Sha Li, Ning Wang, Yibin Feng, (2020), Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy, *Molecular Cancer*, 19
- [11] Balaguer F., Moreira L., (2010), Epigenómica, *Nuevos métodos de diagnóstico molecular*, Vol. 9
- [12] Wu H., Zhang Yi., (2014), Reversing DNA Methylation: mechanisms, genomics and biological functions, *Cell*, 156, 45-68

- [13] Hakimul Haque Md., Gopalan V., Nazmul Islam Md., Kamal Masud M., Bhattacharjee R., Shahriar Al Hossain Md., Nguyen N., Lam A.K., Shiddiky M.J.A., (2017), Quantification of gene-specific DNA methylation in oesophageal cancer via electrochemistry, *Analytica Chimica Acta*, 976, 84-93
- [14] Li S., Tollefsbol T.O., (2021), DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses, *Methods* 187, 28-43
- [15] Mazloumi Z., Farahzadi R., Rafat A., Dizaji Asl K., Karimipour M., Montazer M., Akbar Movassaghpour A., Dehnad A., Nozad Charoudeh H., (2022), Effect of aberrant DNA methylation on cancer stem cell properties, *Experimental and Molecular Pathology*, 125, 47-57
- [16] Pajares M.J., Palanca-Ballester C., Urtasun R., Alemany-Cosme E., Lahoz A., Sandoval J., (2021), Methods for analysis of specific DNA methylation status, *Methods*, 187, 3-12
- [17] Luque J., Herraez A., (2001), *Biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*, Elsevier España
- [18] Mayo de Andrés S., (2015), *Búsqueda e identificación de nuevas causas genéticas o epigenéticas de trastornos del neurodesarrollo*, [Tesis doctoral, Universitat de València, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular]
- [19] Ashour Fernández N., *Identificación y caracterización funcional de nuevos genes metilados en cáncer de próstata*, (2017) [Tesis doctoral, Universidad de Alcalá, Biología de Sistemas]
- [20] Chang J., Lin Z., Liu Y., Yang S., Zhang Y., Yu X., (2021), Ultra performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of RNA and DNA methylation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197, 113969
- [21] Devesa Guerra I., *Reactivación de genes mediante desmetilación dirigida del ADN*, (2019) [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Genética]
- [22] What is epigenetics, <https://www.whatisepigenetics.com/dna-methylation/#fn-23-1> (último acceso 20/06/23)
- [23] Balaguer F., Moreira L., (2010), Epigenómica, *Nuevos métodos de diagnóstico molecular*, 9
- [24] Stephens K.E., Miasowski C.A., Levine J.D., Pullinger C.R., Aouizerat B.E., (2013), Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes, *Biological Research for Nursing*, 15, 373-381



- [25] Redshaw N., Huggett J.F., Taylor M.S., Foy C.A., Devonshire A.S, (2014), Quantification of epigenetic biomarkers: an evaluation of established and emerging methods for DNA methylation analysis, *BMC Genomics*, 15, 1174
- [26] Chen M., Shen F., Huang W., Qi J., Wang Y., Feng Y., Liu S., Yuan B., (2013), Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry, *Clinical Chemistry*, 59, 824-832
- [27] Lai W., Mo J., Yin J., Lyu C., Wang H., (2019), Profiling of epigenetic DNA modifications by advanced liquid chromatography-mass spectrometry technologies, *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 173-182
- [28] Zhang L., Zhang L., Zhou K., Ye X., Zhang J., Xie A., Chen L., Kang J.X., Cai C., (2012), Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Biomolecular Screening*, 17, 877-844
- [29] Yin R., Mo J., Lu M., Wang H., (2015), Detection of human urinary 5-hydroxymethylcytosine by stable isotope dilution HPLC-MS/MS analysis, *Analytical Chemistry*, 87, 1846-1852
- [30] Lai W., Lyu C., Wang H., (2018), Vertical ultrafiltration-facilitated DNA digestion for rapid and sensitive UHPLC-MS/MS detection of DNA modifications, *Analytical Chemistry*, 90, 6859-6866
- [31] Ye X., Zhang L., Chen B., Li J., Yang Q., Huang Q., Zhang J., Gao Y., Li Z., Cai C., (2017), A quantitative method for detecting DNA methylation over targeted genomic regions using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta*, 169, 136-140
- [32] Le T., Kim K., Fan G., Faull K.F., (2011), A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples, *Analytical Biochemistry*, 412, 203-209
- [33] Zhang J., Zhang L., Zhou K., Ye X., Liu C., Zhang L., Kang J., Cai C., (2011), Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 413, 164-170

- [34] Hu C., Chen J., Hsu Y., Yen C., Chao M., (2015), Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*, *Biochem J.*, 465, 39-47
- [35] Fernandez A., Valledor L., Vallejo F., Cañal MJ., Fraga M., (2018), Quantification of global DNA methylation levels by mass spectrometry, DNA methylation protocols, *Methods in Molecular Biology*, 1708, 49-58
- [36] Guo C., Xie C., Chen Q., Cao X., Guo M., Zheng S., Wang Y., (2018), A novel malic acid-enhanced method for the analysis of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine, 5-methylcytidine and 5-hydroxymethylcytidine in human urine using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 1034, 110-118
- [37] Cao X., Lintelmann J., Padoan S., Bauer S., Huber A., Mudan A., Oeder S., Adam T., Di Bucchianico S., Zimmermann R., (2021), Adenine derivatization for LC-MS/MS epigenetic DNA modifications studies on monocytic THP-1 cells exposed to reference particulate matter, *Analytical Biochemistry*, 618, 114-127
- [38] Tang Y., Zheng S., Qi C., Feng Y., Yuan B., (2015), Sensitive and simultaneous determination of 5-methylcytosine and its oxidation products in genomic DNA by chemical derivatization coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *Analytical Chemistry*, 87, 3445-3452
- [39] Chang J., Lin Z., Liu Y., Yang S., Zhang Y., Yu X., (2021), Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of RNA and DNA methylation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197, 113969
- [40] University of Bristol; School of Chemistry, <https://www.chm.bris.ac.uk/ms/cid.xhtml> (último acceso 26/06/23)
- [41] Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, <https://www.cbm.uam.es/images/servicios/proteomica/documentos/espectrometria-de-masas-ESI-MSMS.pdf> (último acceso 28/06/23)
- [42] Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, <https://www.seqc.es/download/tema/6/2963/932076606/998102/cms/tema-02-fundamento-de-la-espectrometria-de-masas-en-tandem.pdf/> (último acceso 29/06/23)

- [43] García Alonso J.I., Rodríguez González P., (2013), Isotope Dilution Mass Spectrometry, RSC Publishing
- [44] Brun. V., Masselon. C., Garin. J., Dupuis. A., Isotope Dilution Strategies for Absolute Quantitative Proteomics, *Journal of Proteomics*, 72, 740-749
- [45] Valledor L., Hasbún R., Rodríguez R., Cañal M.J., (2009), RNA-free DNA extraction protocol from pinus tissues for molecular biology or HPCE-HPLC analyses, *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, vol 18 (2), 229-232
- [46] González-Antuña A., Rodríguez-González P., García Alonso J.I., (2014), Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 681-691
- [47] Neubauer S., Rugova A., Binh Chu D., Drexler H., Ganner A., Sauer M., Mattanovich D., Hann S., Kiellensperger G., (2012), Mass spectrometry-based analysis of nucleotides, nucleosides and nucleobases-application to feed supplements, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 799-808
- [48] Dudley E., Bond L., (2013), Mass Spectrometry analysis of nucleosides and nucleotides, *Mass Spectrometry Reviews*, 33, 302-331
- [49] Yin R., Liu S., Zhao C., Lu M., Tang M., Wang H., (2013), An ammonium bicarbonate-enhanced stable isotope dilution UHPLC-MS/MS method for sensitive and accurate quantification of acrolein-DNA adducts in human leukocytes, *Analytical Chemistry*, 85, 3190-3197
- [50] Sheng X., Wang J., Guo Y., Zhang J., Luo J., (2020), DNA N6-Methyladenine (6mA) modification regulates drug resistance in triple negative breast cancer, *Frontiers in Oncology*, 10, 616098
- [51] Cui H., Rong W., Ma J., Jiang B., Zhang L., Li C., Zhuo Z., Chen M., (2022), DNA N6-Adenine methylation in HBV-related hepatocellular carcinoma, *Gene*, 822, 146353