

NOTA TÉCNICA

Evaluación de la metilación del DNA en tejidos de cáncer colorrectal fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE)

Evaluation of DNA methylation in formalin-fixed, paraffin embedded colorectal cancer tissues (FFPE)

Jehison A. Herrera^{a,b}, Yenifer Y. Segura^a, Wendy J. Montero^a, Vilma Medina^c, Pablo Moreno-Acosta^{a,d}, Alfredo E. Romero^e, Martha L. Serrano^{a,f}

Fecha de sometimiento: 23/06/2020, fecha de aceptación: 03/08/2020
Disponible en internet: 04/12/202

<https://doi.org/10.35509/01239015.704>

Abstract

Alterations in the methylation of CpG dinucleotides in promoter regions is one of the epigenetic mechanisms involved in cancer that has potential use as a biomarker. Its evaluation from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues represents a great challenge given the partial degradation, crosslinking, and low amounts of the obtained DNA. In this technical note we describe a protocol for the study of the methylation status of the distal promoter of the K-RAS proto-oncogene from several samples obtained from two 11-years old FFPE tissues of colorectal cancer. An alternative bisulfite conversion protocol to the usual one was used; a modified DNA polymerase and a nested PCR were used and the direct sequencing of the converted DNA with bisulfite was optimized. This protocol could be applied to determine methylation states in other genes and types of cancer.

Keywords: DNA Methylation; 5-Methylcytosine; Genes ras; Colorectal Neoplasms; Paraffin-embedded tissue.

Resumen

Las alteraciones en la metilación de dinucleótidos CpG en regiones promotoras es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en cáncer que tiene uso potencial como biomarcador. Su evaluación, a partir de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE), representa un gran desafío dadas la degradación parcial, el entrecruzamiento y las bajas cantidades del DNA obtenido. En esta nota técnica, describimos un protocolo para el estudio del estado de metilación del promotor distal del proto-oncogén K-RAS, a partir de varias muestras obtenidas de dos tejidos FFPE de cáncer colorrectal con antigüedad de 11 años. Se empleó un protocolo de conversión con bisulfito alternativo al usual; se usó una DNA polimerasa modificada y una PCR anidada y se optimizó la secuenciación directa del DNA convertido con bisulfito. Este protocolo podría ser aplicado para determinar estados de metilación en otros genes y tipos de cáncer en tejidos FFPE.

Palabras clave: Metilación del DNA, 5-metilcitosina; Genes ras; Neoplasias Colorrectales; Adhesión en parafina.

Introducción

El estudio del estado de metilación del DNA ha permitido una mejor comprensión de la carcinogénesis (1,2) y se ha propuesto su uso como biomarcador en algunos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal (CCR) (3-5). El conocimiento del estado de metilación en genes como *K-RAS* y su relación con la carcinogénesis es de gran importancia, puesto que dicha información podría constituirse como un indicador del pronóstico de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con determinados antineoplásicos (6).

^a Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 # 9-85, Bogotá, Colombia.

^b Maestría en Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Edificio: 426 - Piso: 1 - Oficina: 101. Bogotá, Colombia.

^c Laboratorio de Genética, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 # 9-85, Bogotá, Colombia.

^d Grupo de Investigación en Radiobiología Clínica, Molecular y Celular, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 # 9-85, Bogotá, Colombia.

^e Grupo de Patología Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 # 9-85, Bogotá, Colombia.

^f Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, edificio 451, oficina 326. Bogotá, Colombia.

Los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) representan un gran desafío puesto que, en la mayoría de los casos, los ácidos nucleicos extraídos presentan degradación parcial y entrecruzamiento, lo cual dificulta su uso (7-10).

En este trabajo, se describe la optimización de un protocolo para el estudio del estado de metilación de cuatro islas CpG en el promotor distal del gen *K-RAS*, mediante secuenciación directa del DNA tratado con bisulfito y amplificado por PCR.

Extracción de DNA

Inicialmente, el protocolo fue optimizado a partir de DNA extraído de sangre periférica mediante el kit gDNA Mini Prep (Zymo Research, Irvine, USA); los resultados obtenidos se tomaron como referencia para el desarrollo de la técnica con DNA extraído de cortes de 10 µm y punch de 2 mm de diámetro de dos tejidos FFPE con 11 años de diferencia (2009 y 2020) y de dos pacientes con diagnóstico de CCR del archivo de patología del Instituto Nacional de Cancerología, mediante el kit AllPrep DNA/RNA FFPE (Qiagen, Hilden, Germany). El DNA extraído fue cuantificado mediante fluorómetro Qubit® 2.0 y kit Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). En la tabla 1 se describen las muestras analizadas con sus respectivas concentraciones de DNA obtenido luego de la extracción y post-conversión con bisulfito. Se evidenciaron mayores concentraciones de DNA post-extracción en las muestras obtenidas a partir del tejido FFPE de 2020, en aproximadamente un orden de magnitud, en comparación con las concentraciones obtenidas a partir del tejido FFPE de 2009.

Conversión con bisulfito de sodio

La conversión con bisulfito se realizó con el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, Irvine, USA), siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante. Se emplearon entre 0,107 y 2µg de DNA, de acuerdo con las concentraciones obtenidas para cada muestra. Se compararon tres protocolos sugeridos por el fabricante, los cuales tienen variaciones en las temperaturas y los ciclos para llevar a cabo los pasos de sulfonación y deaminación: la mejor señal de amplificación se obtuvo con el protocolo alternativo 1. En comparación con los demás protocolos sugeridos por el fabricante, este protocolo emplea un mayor tiempo de exposición del DNA al bisulfito de sodio a través de dos temperaturas

diferentes: 53°C por 30 minutos y posteriormente 8 ciclos de 53°C por 6 minutos y 37°C por 30 minutos, lo que posiblemente conducirá a una conversión completa de todas las citosinas a uracilos. Lo anterior representa una ventaja frente a los demás protocolos, pues permite tener resultados de secuencia óptimos y confiables. No obstante, la desventaja de este protocolo es que a mayor tiempo de incubación se presenta una mayor degradación del DNA y, en aquellas muestras que una vez hayan tenido una conversión completa, la sobreexposición con bisulfito podría causar errores que terminan generando secuencias erróneas (11). Posteriormente a la conversión con bisulfito se realizó cuantificación del DNA debido a que este proceso causa degradación del DNA (Tabla 1), encontrando que, en general, la concentración de DNA obtenido luego de la conversión con bisulfito es mayor en el DNA obtenido a partir del FFPE 2020 comparado con 2009.

Tabla 1. Concentraciones obtenidas de DNA empleando sangre periférica y tejidos FFPE.

Material empleado		Concentración de DNA (ng/µl)	
Sangre	Leucocitos	Post-extracción	Post-conversión
		463	17,03
	1 punch	12,26	1,84
	2 punch	13,73	1,79
	1 corte	5,38	2,99
	2 cortes	8,41	< 0,2
	3 cortes	19,5	5,87
	4 cortes	19,16	3,17
Tejidos FFPE	1 punch	145	25,36
	2 punch	417	24,3
	1 corte	65,5	21,36
	2 cortes	77,4	22,3
	3 cortes	228,3	23,7
	4 cortes	169,3	23,9

Amplificación por PCR del segmento del promotor distal del gen K-RAS

Posteriormente a la conversión, se realizó la amplificación del segmento de interés del promotor distal del gen *KRAS*, a partir de 4 µl del DNA convertido con bisulfito. Para la obtención del amplímero se debió realizar una PCR anidada, ya que con la PCR convencional no se obtuvo amplímero. La PCR inicial se hizo empleando una Phusion U Hot Start DNA polimerasa (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), de acuerdo con las indicaciones dadas por el fabricante. Se agregó 1mM adicional de MgCl₂. Esta polimerasa lee de manera más eficiente el uracilo presente en las plantillas del DNA convertido. Se emplearon iniciadores comerciales Hs_KRAS_01_PM PyroMark CpG assay (Qiagen, Hilden, Germany) que amplifican un fragmento de 172 pb del promotor distal del gen *KRAS*. La casa comercial no brinda información de la secuencia de los primers. Con los amplímeros obtenidos se realizó una PCR anidada, para amplificar un fragmento de 150 pb, empleando iniciadores diseñados mediante el software libre Bi-Search V.2,64 (en URL: <http://bisearch.enzim.hu/>): F: 5'-TAGTTTAAGTGTGAGGTT-3'

y R: 5'-TTTACTATCATTAACACTACATAT-3' (Figura 1). Los amplímeros obtenidos fueron purificados a partir de geles de agarosa con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA).

Secuenciación del DNA

Para la secuenciación directa de los productos convertidos con bisulfito se empleó el kit BigDye™ Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones a saber: se realizaron 40 ciclos en lugar de 25 y se incrementó en un 50% la cantidad del iniciador con respecto a lo sugerido por el protocolo. Los productos de secuencia fueron purificados mediante el kit BigDye™ X Terminator (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) y se montaron en el analizador genético ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Se obtuvieron secuencias de buena calidad en la mayoría del material extraído del tejido FFPE de 2009 y 2020 (Figura 1). No se obtuvo resultado de secuenciación para las muestras de DNA obtenidas a partir de 2 cortes del tejido FFPE de 2009, a pesar de haber sido tomadas del mismo bloque.

Región analizada chr 12:25.251.457 – 25.251.606

CCAGCCCAAGTGCTGAGGCTGATAATAATCGGGGCGGCGATCAGACAGCCC CGGTGTGGGAAATCGTCCGCCCGGT
CTCCCTAAGTCCCCGAAGTCGCCTCCCACTTTGGTGACTGCTTGTTTATTTACATGCAGTCAATGATAGTAAA

Amplímero esperado, una vez se ha convertido con bisulfito:

TJAGTIIAAGTIGIIGAGGII GATAATAATGGGGTGGTGATTAGATAGTTTGGIGTGGGAAATTGTTTGTTTGTTT
TTTTAAGTTTTGAAGTTGTTTTTATTTTTGGTGATTGTTTGTTTATTTATAGTAGIIAATGATAGTAAA

Figura 1. Promotor distal del gen *K-RAS*. Secuencia de DNA sin convertir (arriba) y convertida con bisulfito (abajo) indicando islas CpG de interés (resaltadas), región donde se unen proteínas Sp1 (subrayado línea continua) y lugar donde anillan iniciadores diseñados en Bi-Search (líneas punteadas).

La secuencia obtenida para las muestras de DNA extraídas a partir de 1 punch y 4 cortes del tejido FFPE de 2020, no correspondió con la secuencia esperada, pero fue igual entre ellas. Estos amplímeros no mostraron señal de amplificación y podrían corresponder a una amplificación inespecífica presente en muestras con insuficiente cantidad de DNA luego de la PCR. No fue posible determinar mediante BLAST la región del genoma amplificado, dado que no existen a la fecha algoritmos para DNA convertido con bisulfito que permitan realizar esta verificación; sin embargo, es muy importante resaltar que en las otras muestras

del mismo bloque sí se obtuvo la secuencia esperada, lo que resalta la dificultad de obtención de los resultados.

Metilación del promotor distal del gen *KRAS*

El análisis de metilación de cuatro islas CpG en una región del promotor distal del gen *KRAS* se hizo con los resultados de la secuencia posterior a la conversión con bisulfito. Tanto en las muestras de sangre periférica como en los tejidos FFPE no se observó metilación en las islas CpG analizadas (fig. 2).

A. ATCGGGGCGGCGATCAGACAGCCCGG
ATTGGGGTGGTGA TTAGATAG TTT TGG

E.

Secuencia esperada	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
Sangre periférica	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
1 corte FFPE 2009	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
1 corte FFPE 2020	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
1 punch FFPE 2009	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
2 cortes FFPE 2020	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
2 punch FFPE 2020	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
2 punch FFPE 2009	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
3 cortes FFPE 2020	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
3 cortes FFPE 2009	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
4 cortes FFPE 2009	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
Consensus	AA	TTGGGGTGGT	GATTAGATAG	TTTTGGSTG
Conservation	100%	100%	100%	100%

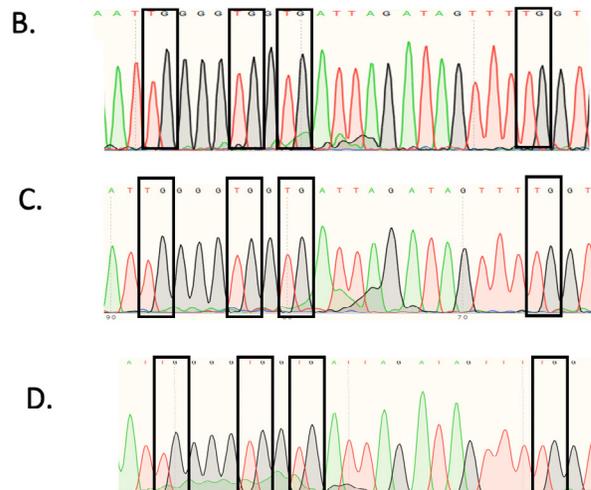


Figura 2. Análisis de metilación de cuatro islas CpG del promotor distal de KRAS. A. Esquema de secuencias esperadas con metilación (arriba) y sin metilación (abajo). B. Secuencia obtenida a partir de DNA de sangre periférica. C. Secuencia obtenida a partir de un corte de 2009. D. Secuencia obtenida a partir de un corte de 2020. E. Alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia esperada. Sólo se muestra la región de interés. Los recuadros indican las islas CpG analizadas.

Conclusiones

En los análisis de metilación de tejidos FFPE, la degradación previa de estos tejidos en la fase preanalítica se suma a la degradación del DNA provocada por el tratamiento con bisulfito. En este estudio, luego de varios ensayos en muestras de tejido FFPE, solo se obtuvieron resultados con el protocolo alternativo 1 para la conversión con bisulfito. Adicionalmente, se requirió el uso de una DNA polimerasa modificada que permite la lectura de uracilos; la estandarización de una PCR anidada; la modificación del número de ciclos y concentración de iniciadores en reacción de secuencia para poder realizar el análisis de la metilación. Este protocolo permitió la obtención de información del estado de metilación de una región promotora del gen K-RAS en tejidos recientes, del año 2020, pero también en bloques con más de 11 años de antigüedad, del año 2009, a pesar de que el DNA obtenido fue escaso.

No se evidenció metilación en las islas CpG del segmento estudiado en los tejidos FFPE analizados; sin embargo, la aplicación posterior de este protocolo en 57 muestras de CCR evidenció la metilación parcial en dos casos (datos no mostrados). Algunos de los métodos descritos podrían ser aplicados para determinar estados de metilación en otros genes o tipos de cáncer en tejidos FFPE. Aunque los tejidos FFPE presentan desafíos metodológicos para los análisis moleculares, toda la información asociada a ellos y la posibilidad de

realizar análisis retrospectivos los hace muy atractivos como muestras en investigación.

Bibliografía

1. Teschendorff AE, Liu X, Caren H, Pollard SM, Beck S, Widschwendter M, et al. The Dynamics of DNA Methylation Covariation Patterns in Carcinogenesis. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(7).
2. Zhang C, Zhao H, Li J, Liu H, Wang F, Wei Y, et al. The identification of specific methylation patterns across different cancers. *PLoS One.* 2015;10(3):1-16.
3. Fouad MA, Salem SE, Hussein MM, Zekri ARN, Hafez HF, El Desouky ED, et al. Impact of global DNA methylation in treatment outcome of colorectal cancer patients. *Front Pharmacol.* 2018;9(OCT):1-14.
4. Parizadeh SM, Jafarzadeh-Esfehani R, Ghandehari M, Seifi S, Parizadeh SMR, Moetamani-Ahmadi M, et al. Epigenetic Drug Therapy in the Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(23):2701-9.
5. Baretta M, Azad NS. The role of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer [Internet].* 2018;42(6):530-47.
6. Afanador CH, Peña CMM. Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2018;(11):1-16.
7. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-71.

8. Patricia García M.1 2, Felipe Benavente M.1 2, A.1 AM, Iván Roa E.1 3, S.1 JCR. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Rev Esp Patol [Internet]*. 2006;39(3):175-9.
9. Klopffleisch R, Deetzen M von, Weiss AT, Weigner J, Weigner F, Plendl J, et al. Weigners Fixative-An Alternative to Formalin Fixation for Histology With Improved Preservation of Nucleic Acids. *Vet Pathol*. 2013;50(1):191-9.
10. Kim S, Park C, Ji Y, Kim DG, Bae H, van Vrancken M, et al. Deamination Effects in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples in the Era of Precision Medicine. *J Mol Diagnostics*. 2017;19(1):137-46.
11. Genereux DP, Johnson WC, Burden AF, Stöger R, Laird CD. Errors in the bisulfite conversion of DNA: Modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(22):1-19.