TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario en Biotecnología Clínica

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE FIRMAS DE METILACIÓN ESPECÍFICAS PARA LA MONITORIZACIÓN, EL PRONÓSTICO Y EL SEGUIMIENTO EN LINFOMAS DE CÉLULAS B

Autor: Nazaret Hernández Cuesta.

Tutor: Santiago Barrio García.

Villaviciosa de Odón, **(06/07/2026)**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 9
3. METODOLOGÍA DEL TRABAJO 10
   3.1. Análisis *in silico* de perfiles de metilación del ADN 10
   3.2. Población de estudio y obtención de las muestras 10
   3.3. Extracción y purificación de ADNg en muestras FFPE de LF y LBDCG 11
   3.4. Reparación del ADNg 11
   3.5. Control de calidad y cuantificación del ADNg 12
   3.6. Preparación de librerías de metilación de ADNg 13
      3.6.1. Preparación de la muestra y digestión con MspI 13
      3.6.2. Reparación de extremos y ligación de adaptadores 14
      3.6.3. Conversión con bisulfito 14
      3.6.4. Amplificación de la librería 15
      3.6.5. Secuenciación y análisis del ADNg 16
4. RESULTADOS 17
   4.1. Identificación y validación *in silico* de regiones diferencialmente metiladas en LB (LF y LBDCG) 17
   4.2. Validación experimental de firmas de metilación específicas en muestras de LB (LF y LBDCG) 19
      4.2.1. Cuantificación y preparación de muestras de ADNg 19
      4.2.2. Optimización experimental para muestras de ADNg de controles sanos 20
      4.2.3. Análisis de librerías mediante *TapeStation* 21
      4.2.4. Secuenciación masiva y control de calidad 22
      4.2.5. Alineación con el genoma de referencia 24
      4.2.6. Identificación de las citosinas metiladas 25
      4.2.7. Análisis de identificación de metilación diferencial 25
5. DISCUSIÓN 27
   5.1. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras 28
   5.2. Impacto traslacional, social y de sostenibilidad 29
6. CONCLUSIONES 30
7. BIBLIOGRAFÍA 31
8. ANEXOS 35

RESUMEN

Los linfomas de células B constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas en las que las alteraciones epigenéticas, especialmente los cambios en la metilación del ADN desempeñan un papel fundamental en su desarrollo y progresión. El objetivo de este trabajo fue identificar y validar firmas de metilación específicas en el linfoma B difuso de células grandes (LBDCG) y el linfoma folicular (LF), así como optimizar un protocolo experimental para su análisis mediante secuenciación con bisulfito de representación reducida (RRBS).

En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* utilizando datos públicos de *microarrays* de metilación y conjuntos independientes de datos RRBS. Este análisis permitió identificar regiones diferencialmente metiladas capaces de discriminar entre muestras de LBDCG y células B del centro germinal sanas utilizadas como controles. La selección de regiones con múltiples sitios CpG consecutivos incrementó la especificidad y robustez de los potenciales biomarcadores.

Posteriormente, se generaron librerías RRBS a partir de ADN genómico (ADNg) procedente de muestras FFPE de pacientes con LF y LBDCG. La optimización experimental puso de manifiesto que la calidad del ADN de partida influye significativamente en la eficiencia de la preparación de las librerías, siendo necesario ajustar la cantidad de ADN, la concentración de la enzima *MspI* y los tiempos de incubación. Las librerías obtenidas presentaron perfiles compatibles con los estándares de calidad requeridos para la secuenciación.

Finalmente, la validación experimental confirmó la presencia de bloques de sitios CpG consecutivos metilados en las regiones identificadas *in silico,* respaldando el potencial de estas firmas epigenéticas como biomarcadores en los linfomas B, especialmente en el LBDCG y el LF. En conjunto, los resultados establecen una base metodológica sólida para la futura validación de estas firmas epigenéticas y su posible aplicación en estrategias de biopsia líquida y medicina de precisión.

PALABRAS CLAVE: Biomarcadores epigenéticos, Linfoma B, Linfoma B Difuso de Células Grandes, Linfoma Folicular, metilación.

ABSTRACT

B-cell lymphomas constitute a heterogeneous group of hematologic neoplasms in which epigenetic alterations, particularly changes in DNA methylation play a key role in their development and progression. The objective of this study was to identify and validate specific methylation signatures in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL), as well as to optimize an experimental protocol for their analysis using reduced-range bisulfite sequencing (RRBS).

First, an in silico analysis was performed using publicly available methylation microarray data and independent RRBS datasets. This analysis identified differentially methylated regions capable of distinguishing between DLBCL samples and healthy germinal center B cells used as controls. The selection of regions with multiple consecutive CpG sites increased the specificity and robustness of the potential biomarkers.

Subsequently, RRBS libraries were generated from genomic DNA (gDNA) derived from FFPE samples from patients with LF and LBDCG. Experimental optimization revealed that the quality of the starting DNA significantly influences the efficiency of library preparation, requiring adjustments to the amount of DNA, the concentration of the MspI enzyme, and the incubation times. The resulting libraries exhibited profiles consistent with the quality standards required for sequencing.

Finally, experimental validation confirmed the presence of blocks of consecutive methylated CpG sites in the regions identified in silico, supporting the potential of these epigenetic signatures as biomarkers in B-cell lymphomas, particularly in LBDCG and LF. Taken together, the results establish a solid methodological foundation for the future validation of these epigenetic signatures and their potential application in liquid biopsy strategies and precision medicine.

KEY WORDS: *Epigenetic biomarkers, B-cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma, methylation.*

1. INTRODUCCIÓN

El término linfoma engloba un grupo heterogéneo de neoplasias malignas del sistema linfático, caracterizadas por la proliferación clonal de linfocitos en diferentes estadios de diferenciación[1]. Estas patologías se clasifican principalmente en dos grandes grupos: Linfoma de Hodgkin (LH) y Linfoma no Hodgkin (LNH), los cuales presentan características biológicas, clínicas y moleculares diferenciadas. En conjunto, los linfomas constituyen una de las neoplasias hematológicas con mayor incidencia global en el ámbito de la oncohematología. Dada la complejidad diagnóstica derivada de su heterogeneidad biológica, es necesario profundizar en su estudio desde el punto de vista diagnóstico, pronóstico y terapéutico, puesto que una correcta caracterización molecular es fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas que mejoren el pronóstico y calidad de vida de los pacientes[2].

Dentro de los LNH de células B (LB), el Linfoma Difuso de Células B Grandes (LBDCG) constituye el subtipo más prevalente en adultos a nivel mundial[3,4]. Esta neoplasia se caracteriza por una marcada heterogeneidad clínica, morfológica y molecular[5], y sus células tumorales suelen mostrar características similares a las células B del centro germinal. Por lo general, presenta un curso clínico agresivo, aunque potencialmente curable. La incorporación de *rituximab,* un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, al tratamiento de primera línea basado en el esquema R-CHOP (*rituximab, ciclofosfamida*, *doxorrubicina*, *vincristina* y *prednisona*),ha mejorado significativamente la supervivencia global y la tasa de respuesta. No obstante, aproximadamente un tercio de los pacientes presenta refractariedad primaria o recae en un plazo de cinco años desde el tratamiento inicial, poniendo de manifiesto que el manejo de los LB sigue enfrentando desafíos significativos[5].

Por otro lado, el linfoma folicular (LF) es el segundo subtipo más frecuente de LNH en países desarrollados[5,6]. Se origina en las células B del centro germinal y se caracteriza por un curso clínico generalmente indolente, con un patrón remitente-recidivante y un pronóstico relativamente favorable. No obstante, presenta un acortamiento progresivo en la duración de la respuesta tras sucesivas líneas de tratamiento[6,7]. A nivel molecular, su patogénesis se caracteriza por una translocación recíproca t(14;18)(q32;q21) presente en la mayoría de los casos, que da lugar a la sobreexpresión constitutiva de *BCL2*, una proteína con función antiapoptótica[5–7]. Aproximadamente un 30% de los pacientes experimenta una transformación histológica

a linfomas más agresivos, normalmente a LBDCG[6], con una incidencia aproximada del 3% anual (Figura 1).

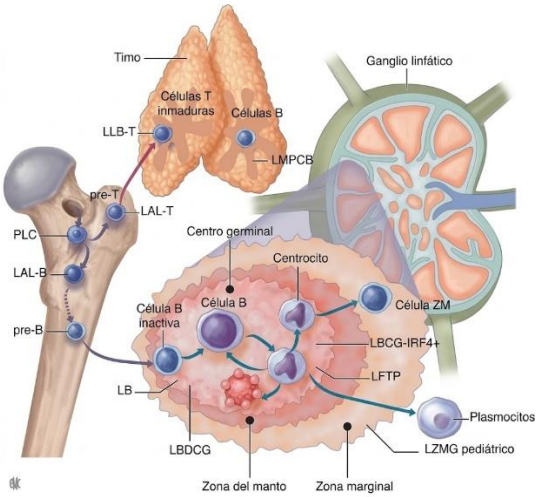


Figura 1: *Esquema del desarrollo de células B y su diferenciación en el centro germinal, se observa el origen del linfoma folicular y su potencial transformación histológica a LBDCG* [8].

Pese a que los tratamientos actuales suelen lograr remisiones prolongadas, con tasas de supervivencia media cercanas a los 20 años, entre un 15 y un 20% de los pacientes con LF presenta progresión de la enfermedad en los dos primeros años tras el tratamiento de primera línea. Esto se asocia a un peor pronóstico, reduciendo las tasas de supervivencia global a 5 años hasta un 38%-50%[3,7]. Por tanto, continúa siendo una neoplasia en la que los pacientes con enfermedad quimiorresistente o transformada continúan representando un desafío terapéutico de primer orden, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento[6,7].

Por esta razón, la investigación actual se centra en identificar precozmente a aquellos pacientes con alto riesgo de progresión o transformación, con el objetivo de optimizar la duración de la respuesta terapéutica y reducir la morbilidad asociada. En relación a esto, aunque en los últimos años se han descrito numerosos biomarcadores moleculares y patológicos que permiten estratificar el riesgo en el momento del diagnóstico, muchas de estas herramientas presentan limitaciones en su implementación rutinaria en la práctica clínica, haciendo necesaria la búsqueda de aproximaciones más precisas, dinámicas y aplicables[5,6].

En este contexto, la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) ha demostrado una notable utilidad pronóstica a nivel molecular, especialmente mediante la detección de reordenamientos de *BCL2*/IgH cuantificados por PCR. Asimismo, el análisis

de los fragmentos de ADN libre circulante (cfADN) muestra un elevado valor predictivo en la evolución de la enfermedad[5]. En los últimos años, la biopsia líquida ha emergido como una herramienta altamente prometedora para el análisis no invasivo de biomarcadores tumorales, ya que permite la detección de material tumoral en fluidos biológicos, ofreciendo una alternativa dinámica frente a procedimientos invasivos como las biopsias tisulares convencionales[9,10]. Por tanto, en el caso de los linfomas facilitaría su monitorización, la detección de EMR y la identificación precoz de recurrencias[11,12].

Paralelamente, los LB presentan con frecuencia alteraciones profundas en la regulación epigenética. Entre ellas destaca la metilación aberrante del ADN (ADNm), que constituye un rasgo característico del cáncer. Este proceso biológico consiste en la adición covalente de grupos metilo al carbono 5 de las citosinas ubicadas en dinucleótidos CpG (Figura 2). La presencia de estos grupos en regiones promotoras se asocia inversamente con la transcripción génica; de modo que la hipermetilación o hipometilación de secuencias reguladoras puede conducir al silenciamiento de genes supresores de tumores o activación de oncogenes, respectivamente[6,13,14,15].

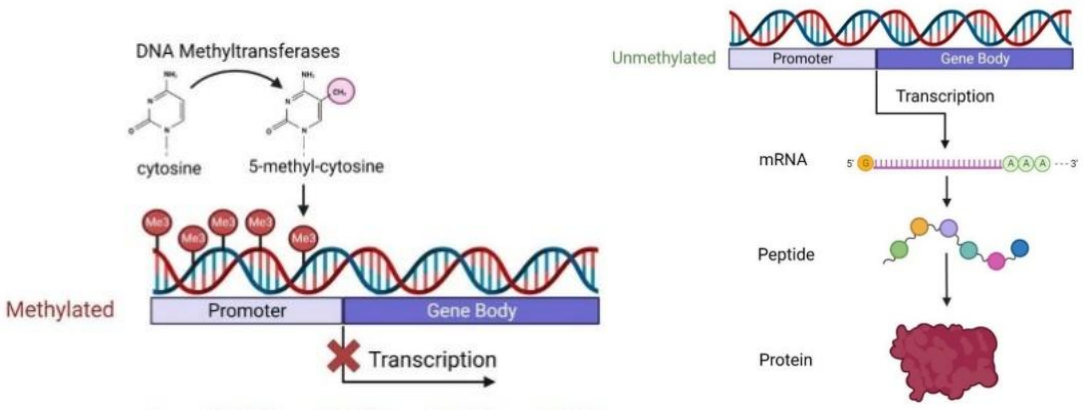


Figura 2: *Diagrama del proceso de metilación del ADN y su efecto en las regiones promotoras, donde modula la transcripción génica y en consecuencia, los niveles de expresión proteica*[15].

Estas alteraciones suelen estar asociadas a mutaciones en reguladores epigenéticos clave, como las metiltransferasas del ADN (por ejemplo, DNMT3A) o las enzimas desmetilasas (TET2), contribuyendo a la reprogramación global del metiloma tumoral. En consecuencia, se ha demostrado que los patrones de metilación del ADN poseen un gran potencial como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y estratificación en diversas neoplasias hematológicas[4,13,14,16].

En el ámbito de los LB, se han descrito perfiles de metilación alterados en comparación con las células B sanas[14,17]. Un ejemplo de ello es el gen *BCL6* (*B-cell CLL/Lymphoma 6*), que codifica un factor de transcripción esencial para la formación del centro germinal y la diferenciación celular. Las alteraciones en regiones CpG intragénicas pueden modular su expresión al interferir con reguladores como el factor CTCF (CCCTC-*binding factor*), contribuyendo directamente a la disfunción transcripcional propia del contexto tumoral[5].

A pesar de los avances en la comprensión del impacto de la metilación del ADN en la linfomagénesis, su implicación en los mecanismos de progresión, recaída y resistencia al tratamiento de primera línea no está completamente establecida. Estudios preclínicos en LBDCG sugieren que la inhibición farmacológica de la metilación del ADN podría revertir la resistencia a la quimioterapia, abriendo las puertas a nuevas estrategias terapéuticas. De esta manera, los datos disponibles sugieren que un aumento global en la metilación del ADN podría asociarse a la resistencia al tratamiento de primera línea, lo que también se observa en la enfermedad recidivante. Además, se ha descrito una correlación positiva entre el grado de alteraciones en la metilación y la progresión clínica en los LB, lo que refuerza la hipótesis de que la desregulación del metiloma constituye un factor determinante en la evolución y el pronóstico de la enfermedad[5].

Por consiguiente, la caracterización exhaustiva del metiloma tumoral podría contribuir a una mejor comprensión de su papel en la progresión de la enfermedad y en los fenotipos asociados a la recaída. Mediante la implementación de técnicas genómicas avanzadas como el RRBS (*Reduced Representation Bisulfite Sequencing*), es posible analizar con alta resolución los patrones de metilación a nivel genómico, enriqueciendo específicamente las regiones ricas en dinucleótidos CpG[5,18,19]. Asimismo, el estudio de estos perfiles en cohortes de pacientes podría facilitar la identificación de firmas epigenéticas precisas para realizar un seguimiento más estrecho de la enfermedad.

Finalmente, este enfoque busca mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes con LB (LBDCG y LF), así como identificar y validar biomarcadores predictivos de evolución y de respuesta clínica al tratamiento, consolidando el papel de la epigenética en el desarrollo de estrategias efectivas de medicina personalizada.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis principal del presente proyecto es que las firmas de metilación del ADN en LB (LF y LBDCG) constituyen biomarcadores con valor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento. La caracterización y validación de estas firmas en biopsia líquida permitirán su implementación como herramienta para la monitorización de la enfermedad y la estratificación del riesgo de recaída clínica.

Con el fin de validar esta hipótesis, el objetivo principal radica en desarrollar y validar un panel de biomarcadores epigenéticos basados en la metilación del ADN para la estratificación pronóstica y el seguimiento clínico no invasivo de pacientes con LB (LF y LBDCG).

Para alcanzar el objetivo principal se proponen los siguientes objetivos específicos orientados a la identificación y traslación de firmas epigenéticas:

1. Identificar firmas de metilación del ADN asociadas a LB (LF y LBDCG) mediante análisis *in silico* de cohortes genómicas públicas, seleccionando los candidatos con mayor relevancia biológica y capacidad discriminativa.
2. Validar experimentalmente los biomarcadores previamente seleccionados en una cohorte propia de muestras biológicas procedentes de pacientes diagnosticados con LB (LF y LBDCG).
3. Diseñar un panel de biomarcadores en muestras de biopsia líquida para determinar su aplicación en la monitorización y el seguimiento clínico de la enfermedad.

3. METODOLOGÍA DEL TRABAJO

3.1. Análisis *in silico* de perfiles de metilación del ADN

Con el objetivo de identificar y validar regiones diferencialmente metiladas asociadas a LB (LF y LBDCG) se realizó un análisis *in silico* utilizando datos públicos de metilación del ADN. Inicialmente, se analizaron datos de metilación obtenidos mediante *microarrays EPIC* de *Illumina* procedentes de la cohorte publicada por Duran-Ferrer et al (2020) [20], que incluía aproximadamente 1.500 muestras de tumores de células B, lo que permitió seleccionar las 50 regiones candidatas cuyos sitios CpG presentaban las mayores diferencias de metilación en LBDCG.

Para validar estas regiones mediante datos de secuenciación masiva (NGS) tras conversión con bisulfito, se realizó una búsqueda bibliográfica en *PubMed* utilizando la ecuación: (“*DNA methylation” OR ERRBS OR RRBS OR methylome”) AND (“Follicular lymphoma” OR “diffuse large B-cell lymphoma” OR DLBCL).* Se consultaron repositorios públicos de datos genómicos y epigenómicos, incluyendo *Gene Expression Omnibus (GEO, National Center for Biotechnology Information* [NCBI])[21] y *European Genome-Phenome Archive* (EGA)[22]. En particular se emplearon las series de GEO, GSE71702 y GSE66329, que contienen perfiles de metilación de muestras de LBDCG y células B del centro germinal como controles sanos. Las cohortes seleccionadas se utilizaron para realizar un análisis comparativo de las firmas de metilación y evaluar la reproductibilidad de las regiones candidatas identificadas inicialmente.

3.2. Población de estudio y obtención de las muestras

Se obtuvieron biopsias tisulares de ganglio linfático FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) de pacientes diagnosticados con LB (LF y LBDCG), procedentes del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro – Segovia de Arana (Madrid, España), antes de recibir el tratamiento de primera línea basado en R-CHOP. Como grupo control, se incluyeron muestras de tejido ganglionar no neoplásico proporcionadas por el propio grupo de investigación, purificadas con partículas *MagneSil* (*Promega).*

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico (ADNg) seguido de su análisis mediante RRBS. Esta metodología combina la digestión del ADNg mediante enzimas de restricción con NGS, permitiendo el enriquecimiento de regiones genómicas ricas en dinucleótidos CpG, como las islas CpG.

3.3. Extracción y purificación de ADNg en muestras FFPE de LF y LBDCG

Para la obtención de ADNg a partir de muestras de FFPE de pacientes con LB (LF y LBDCG) se utilizó el kit comercial *truXTRAC FFPE total NA kit* (*Covaris*), basado en tecnología acústica focalizada adaptativa (AFA), que optimiza la recuperación de ácidos nucleicos frente a métodos convencionales. Se preparó una mezcla de lisis compuesta por 121 µL de *Buffer* TD y 11 µL de Proteinasa K, logrando la digestión y disgregación del tejido. Los cortes se transfirieron a un tubo *microTUBE*-130, sometiéndose a un proceso de emulsión de la parafina y rehidratación del tejido mediante la aplicación de energía AFA en el sistema *Covaris*. Para conservar el *pellet* de tejido sólido que contenía el ADNg se centrifugaron a 5.000 x g durante 15 minutos (Figura 3).

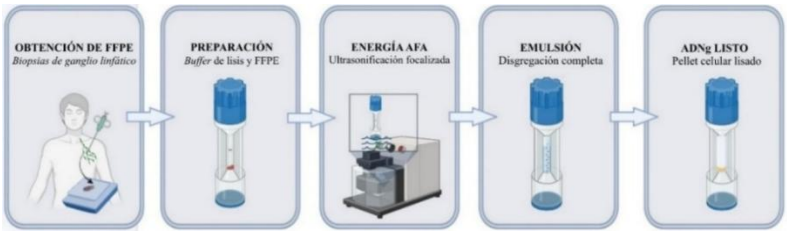


Figura 3: *Extracción de ADNg mediante el sistema Covaris M220. Elaboración propia.*

A continuación, el *pellet* tisular se sometió a una segunda fase de digestión con 88 µL de *Buffer* TD y 22 µL de Proteinasa K, incubándose a 56 ºC durante 1 hora para lograr la digestión completa de las proteínas tisulares. Posteriormente, se incubó a 80 ºC durante 1 hora para revertir los entrecruzamientos químicos inducidos por el formaldehído.

La purificación del ADNg se realizó en columnas de sílice añadiendo 140 µL de *Buffer* B1 y 160 µL de etanol puro. Para eliminar restos de proteínas e inhibidores de PCR se realizaron dos lavados consecutivos con 500 µL de *Buffer BW* y 600 µL de *Buffer B5* seguidos de una centrifugación a 11.000 x g durante 1 minuto descartando el filtrado. Tras una centrifugación a 16.000 x g durante 1 minuto para eliminar los posibles restos de etanol, el ADNg se eluyó con 50 µL de *Buffer BE* y después de 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g obteniéndose un volumen final de elución de 100 µL de ADNg purificado.

3.4. Reparación del ADNg

Con el fin de evaluar si existen diferencias entre los patrones de metilación se reparó el ADNg purificado. Para ello, se mezclaron 1,54 µL de *FFPE DNA Repair Buffer* y 12,7 µL de *NEBNext FFPE DNA Repair Mix* en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL. Tras

homogeneizar la solución, la mezcla se incubó a 20 ºC durante 15 minutos. A continuación, las muestras se purificaron añadiendo 186 µL de perlas magnéticas *SPRIselect* (*Beckman Coulter*) a cada muestra, seguidas de una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se colocaron en una placa magnética *DynaMag*^{TM}*-2* (*Invitrogen*) durante 5 minutos hasta la formación del *pellet*, eliminándose el sobrenadante (Figura 4).

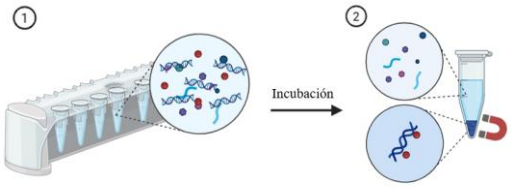


Figura 4: *Purificación del ADNg con perlas magnéticas. El uso de un imán inmoviliza el ADNg facilitando la eliminación de los contaminantes. Elaboración propia.*

Posteriormente, se realizaron dos lavados consecutivos con 200 µL de etanol al 80% durante 30 segundos, descartándose el sobrenadante sin alterar el *pellet.* Tras un lavado final en seco para evaporar los restos de etanol restante y evitar la posible inhibición enzimática, las perlas se resuspendieron en 25 µL de *nuclease-free water*. Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente y otros 2 minutos de separación magnética, se recuperó el sobrenadante con el ADNg purificado.

3.5. Control de calidad y cuantificación del ADNg

En primer lugar, la cuantificación del ADNg se realizó empleando el kit *Qubit*^{TM} *dsDNA High Sensitivity* (HS) *Assay Kit.* Para ello, se preparó una solución de trabajo compuesta por tampón *Qubit*^{TM} *dsDNA HS Buffer* y reactivo *Qubit*^{TM} *dsDNA HS reagent* en proporción 199:1. Para cada muestra se añadieron 199 µL de la solución anterior y 1 µL de ADNg en tubos *Qubit* (*Eppendorf*) de 0,5 mL.

Paralelamente se prepararon los estándares de calibración del kit añadiendo 190 µL de solución de trabajo y 10 µL de estándar 1 y 2 para asegurar la validez de los resultados. A continuación, las muestras se homogeneizaron mediante vórtex durante 3 segundos y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura fluorométrica en el fluorómetro *Qubit 4 fluorometer* (*Invitrogen*) utilizando el programa correspondiente a *dsDNA High Sensitivity.*

La integridad y la distribución de los fragmentos del ADNg se evaluó mediante electroforesis automatizada, utilizando el sistema *TapeStation* (*Agilent*) con el kit *Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape.* En este caso, se preparó una mezcla compuesta por 2 µL del reactivo *High Sensitivity* D1000 y 2 µL de ADN para cada muestra en tubos de 0,2 mL de PCR (*Axygen*). Posteriormente, las muestras se cargaron y se analizaron en el equipo *Agilent TapeStation.*

3.6. Preparación de librerías de metilación de ADNg

Para el estudio de los perfiles de metilación del ADNg se utilizó la técnica RRBS (Figura 5). Las librerías de secuenciación se prepararon utilizando el kit comercial *Zymo-Seq RRBS™ Library Kit* (*Zymo Research,* Cat. No. D5461)[23].

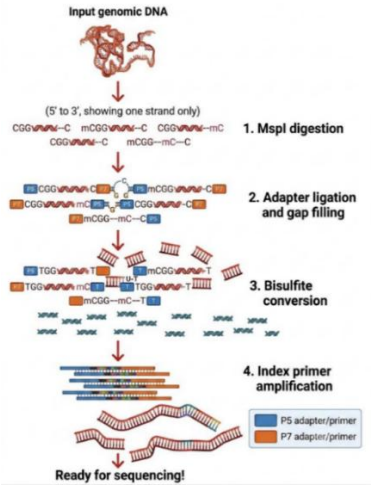


Figura 5: *Representación del proceso RRBS. Creado con Gemini Pro.*

3.6.1. Preparación de la muestra y digestión con MspI

Se partió de ADNg purificado procedente de FFPE de LF y LBDCG, que se utilizó como material de partida para la digestión enzimática. La concentración y calidad se determinó por *TapeStation* (*Agilent*) y se ajustó en el rango de 10 y 500 ng por muestra, dependiendo de la concentración medida previamente para cada muestra de ADNg purificado.

La digestión enzimática se llevó a cabo utilizando la enzima de restricción *MspI* (*Moraxella sp.*) que reconoce la secuencia 5′…C↓CGG…3′ y corta entre citosina y guanina, independientemente de la metilación de la citosina central, asegurando un enriquecimiento uniforme de fragmentos ricos en CpG[19].

Se preparó una mezcla con un volumen final de 40 µL en un tubo de 0,2 mL de PCR. A la cantidad correspondiente de ADNg, en función de la concentración de partida,

se añadieron 4 µL de *10x RRBS Buffer,* 0,5 µL de enzima *MspI* y *DNase/RNase-Free Water* hasta alcanzar el volumen final. Finalmente, se incubó en un termociclador con tapa calefactada (*Fisher Scientific*) a 37 ºC durante 4 horas, seguido de un mantenimiento a 4 ºC.

3.6.2. Reparación de extremos y ligación de adaptadores

Los fragmentos de ADNg resultantes se sometieron a una reparación de extremos con la adición de 1 µL de 10x *RRBS Buffer*, 0,5 µL de rATP (10 mM), 0,5 µL de *RRBS adapters* (10 µM), 1 µL de MspI (20 U/µL), 1 µL de T4 DNA Ligase (400 U/µL) y 6 µL de *DNase/RNase-Free Water*. La reacción se incubó con una fase inicial a 21 ºC durante 3 horas, seguida de dos ciclos de incubación a 37 ºC durante 1 hora y a 20 ºC durante 1 hora, finalizando con un mantenimiento a 4 ºC. Posteriormente, al producto resultante de la PCR anterior se añadieron 0,5 µL de *Taq DNA Polymerase* (2 U/µL) y 1.5 µL de *5-methylcytosine dNTP Mix* (10 mM). Esto se incubó en el termociclador a 74 ºC durante 30 minutos, preparando así los fragmentos para la posterior conversión con bisulfito.

Para purificar el ADNg se añadieron 364 µL de *DNA Binding Buffer* a los 50 µL resultantes y se transfirió a una nueva columna *Zymo-Spin* ^{TM} *IC*, centrifugándose a 11.000 x g durante 30 segundos. A continuación, se realizaron dos lavados consecutivos con 200 µL de *DNA Wash Buffer,* seguidos de una centrifugación en seco para eliminar posibles restos de etanol. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL y el ADNg se eluyó con 21 µL de *DNA Elution Buffer*, tras una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente y una centrifugación final para su recuperación (Figura 6).

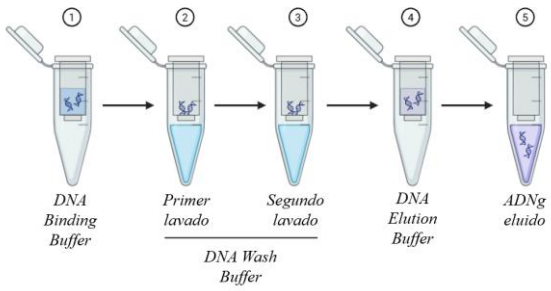


Figura 6: *Purificación de ADNg basada en el protocolo Zymo. Elaboración propia.*

3.6.3. Conversión con bisulfito

La conversión con bisulfito permite la conversión química de las citosinas (C) no metiladas en Uracilo (U) mientras que las citosinas metiladas (5-mC) permanecen inalteradas, permitiendo así su posterior identificación mediante NGS (Figura 7)[24]. De

esta manera, se mezclaron 130 µL de *Lightning Conversion Reagent* sobre el ADNg purificado y la reacción se incubó en un termociclador a 98 ºC durante 8 minutos, 54 ºC durante 1 hora y un mantenimiento a 4 ºC.

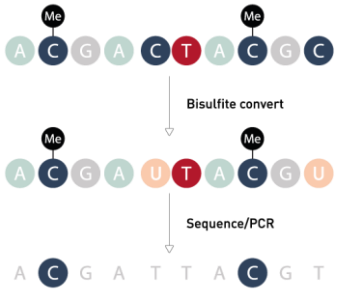


Figura 7: *Esquema de la conversión con bisulfito. Se observa que las citosinas metiladas quedan intactas tras la conversión con bisulfito*[24].

La muestra convertida se transfirió a una nueva columna *Zymo-Spin* ™ *IC* preacondicionada con 600 µL de *M-Binding Buffer* y se centrifugó a 11.000 x g durante 30 segundos, descartándose el filtrado. Tras un lavado inicial con 100 µL de *M-Wash Buffer,* se llevó a cabo la desulfonación mediante la adición de 200 µLde *L-Desulphonation Buffer* incubando la columna 15 minutos a temperatura ambiente para estabilizar las bases convertidas y permitir su posterior amplificación. Tras dos lavados consecutivos con 200 µL de *M-Wash Buffer* el ADN convertido se eluyó finalmente en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL con 21 µL de *DNA Elution Buffer*, después de 1 minuto de incubación a temperatura ambiente y una centrifugación final de 30 segundos.

3.6.4. Amplificación de la librería

Las librerías de ADNg convertido se amplificaron por PCR con 25 µL de *LibraryAmp Master Mix* y 4 µL de *Zymo-Seq*™ *UDI Primer Set* hasta un volumen final de 50 µL, permitiendo la amplificación selectiva de los fragmentos de la librería enriquecidos en regiones CpG. La reacción se llevó a cabo en un termociclador con una desnaturalización inicial a 94 ºC durante 10 minutos, seguida de 11 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 ºC durante 30 segundos, una fase de alineamiento a 55 ºC durante 30 segundos y una extensión a 68 ºC durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una extensión final a 68 ºC durante 5 minutos, seguida de un mantenimiento a 4 ºC.

Las librerías amplificadas se purificaron añadiendo 350 µl de *DNA Binding Buffer* a una nueva columna *Zymo-Spin* ™ *IC.* Se centrifugaron durante 30 segundos y se descartó el filtrado. A continuación, se realizaron dos lavados consecutivos con 200 µL

de *DNA wash Buffer* y la columna se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL para eluir las librerías finales con 15 µL de *DNA Elution Buffer.*

3.6.5. Secuenciación y análisis del ADNg

La secuenciación de ADNg fue realizada por la empresa *Novogene* mediante tecnología *Illumina,* utilizando una plataforma NovaSeq X Plus en formato *paired-end* 150 bp (PE150), siguiendo los estándares del proveedor para librerías generadas mediante conversión con bisulfito. Debido a la digestión con *MspI* y la elevada proporción de bases AT tras la conversión con bisulfito, se añadió un control *PhiX* para equilibrar la diversidad de secuencia. El servicio de secuenciación se configuró con el objetivo de garantizar una profundidad mínima de 30 millones de lecturas por librería para maximizar la cobertura sobre las islas CpG de interés.

3.6.6. Análisis bioinformático y visualización de datos

El procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación fue realizado por la empresa *Novogene* mediante su pipeline estandarizado para muestras preparadas con el kit *Zymo-Seq RRBS Library Kit* (*Zymo Research*). El flujo de análisis incluye control de calidad, alineamiento con *Bismark*, cuantificación de niveles de metilación, análisis diferencial de regiones y posiciones diferencialmente metiladas (DMR/DMP), así como análisis de enriquecimiento funcional (GO y KEGG). Los detalles específicos sobre el *pipeline*, las versiones del software y los parámetros aplicados en cada etapa del análisis se detallan en el Anexo I.

Para la visualización, comparación y validación de las regiones diferencialmente metiladas en el *análisis in silico* inicial como en las obtenidas en la fase experimental, se empleó el *Software Integrative Genomics Viewer* (IGV) versión 2.19.8[25]. Finalmente, la representación gráfica de los perfiles de metilación y la evaluación visual de la capacidad discriminativa de los biomarcadores seleccionados se llevó a cabo mediante *Heatmaps.* Para ello, los datos de metilación fueron estructurados y visualizados utilizando la herramienta *web Heatmapper*[26].

Durante la realización del trabajo se utilizó *Gemini Pro* como herramienta de apoyo para la generación del esquema del protocolo RRBS. De este modo, no se empleó para la generación de contenido científico original ni como fuente bibliográfica.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación y validación *in silico* de regiones diferencialmente metiladas en LB (LF y LBDCG)

Para identificar alteraciones epigenéticas características del LBDCG, se realizó un análisis *in silico* utilizando datos públicos de *microarrays* de metilación [20] procedentes de 1.595 muestras de diferentes neoplasias hematológicas y células B del centro germinal como controles sanos (Figura 8). A partir de esta cohorte se seleccionaron las muestras de LBDCG para el análisis comparativo de metilación frente a los controles, permitiendo identificar un conjunto de sitios CpG diferencialmente metilados en LBDCG.

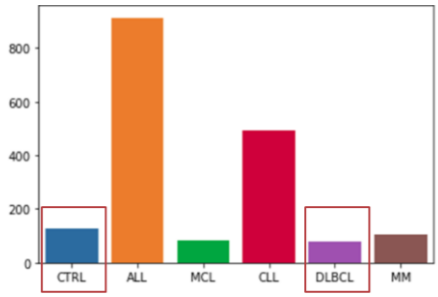


Figura 8: *Distribución de las muestras incluidas en la cohorte de microarrays de metilación, clasificadas según el tipo de neoplasia hematológica y los controles sanos.*

De este análisis se seleccionaron 50 regiones candidatas con mayor diferencia de metilación en LBDCG. El análisis jerárquico basado en estas regiones mostró una clara separación entre muestras tumorales y controles, evidenciando un patrón de metilación diferencial asociado a la enfermedad (Figura 9). El *heatmap* se generó a partir de datos de *microarrays* de metilación, donde cada región está representada por un único sitio CpG, lo que permitió visualizar la segregación entre grupos.

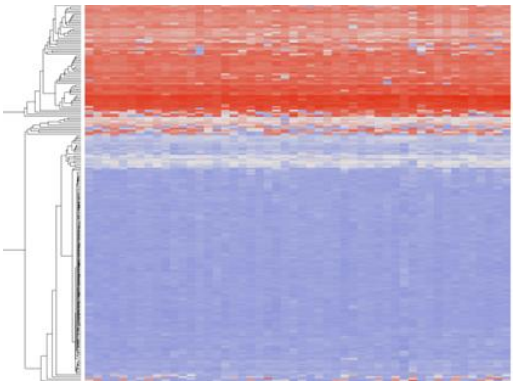


Figura 9: *Heatmap de las regiones CpG diferencialmente metiladas en las muestras de LBDCG y controles. Se observa hipermetilación en rojo e hipometilación en azul. Cada fila es una muestra y las columnas son las regiones CpG analizadas. Existe una clara separación entre ambos grupos, evidenciando patrones de metilación diferenciales.*

Con el fin de validar estos hallazgos, se analizaron datos independientes de RRBS procedentes de 13 muestras de LBDCG y 12 controles sanos descritos previamente por Teater et al. (2018)[27] y Domínguez et al. (2015)[27,28]. Sobre estos datos se aplicó un algoritmo de selección para la identificación de regiones diferencialmente metiladas específicas de LBDCG (Figura 10).

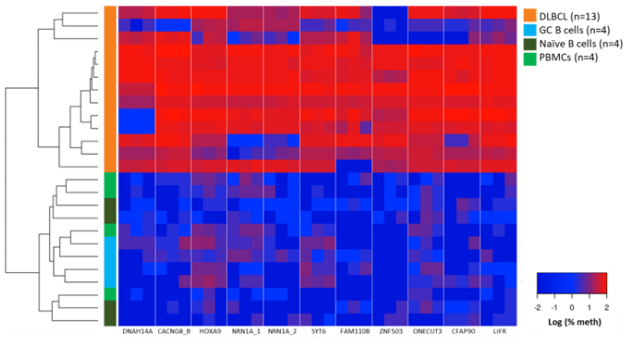


Figura 10: *Heatmap de los perfiles de metilación en muestras de LBDCG y controles sanos. Las filas representan regiones CpG y las columnas las muestras analizadas. En azul se observa menor metilación y en rojo mayor metilación.. El análisis jerárquico muestra la segregación entre LBDCG y los distintos tipos celulares de referencia.*

Se seleccionaron las regiones con metilación superior al 33% en las muestras tumorales e inferior al 5% en los controles sanos, exigiendo además la presencia de al menos tres sitios CpG metilados por región y una distancia máxima de 20 pares de bases entre islas CpG consecutivas. Estos criterios permitieron definir una firma epigenética específica de LBDCG, que mostró patrones de metilación diferenciales en las regiones seleccionadas, capaces de distinguir entre la señal de las células de tumorales de LBDCG y las células del centro germinal sano del mismo paciente (Figura 11).

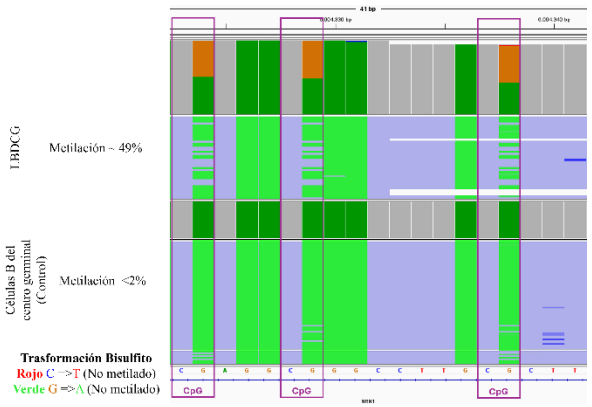


Figura 11: *Representación de las regiones CpG incluidas en la firma epigenética. Cada columna representa una región identificada mediante los criterios de selección establecidos, incluyendo la región correspondiente al gen NRN1. Las secuencias genómicas correspondientes a cada región se muestran en la parte inferior.*

4.2. Validación experimental de firmas de metilación específicas en muestras de LB (LF y LBDCG)

Para evaluar la reproductibilidad y especificidad biológica de esta firma epigenética se realizó una validación independiente en las librerías generadas mediante la técnica RRBS. La cohorte incluyó 9 pacientes con LBDCG, 9 pacientes con LF y 5 controles sanos. La inclusión de casos de LF permitirá determinar si esta firma es específica de LBDCG o si refleja alteraciones epigenéticas comunes entre distintos LB.

4.2.1. Cuantificación y preparación de muestras de ADNg

Con el objetivo de validar los biomarcadores epigenéticos identificados previamente mediante el análisis *in silico*, se generaron librerías de secuenciación RRBS a partir de muestras FFPE. El ADNg extraído mediante el sistema *Covaris* se utilizó para la preparación de las librerías utilizando el kit comercial *Zymo-Seq RRBS Library Kit.*

En primer lugar, se evaluó la integridad del ADNg de partida con el fin de caracterizar su estado inicial antes del procesamiento. El análisis mediante *TapeSation* mostró un perfil electroforético característico de muestras FFPE, con un grado variable de fragmentación, un desplazamiento hacia fragmentos de menor tamaño y una distribución amplia (Figura 12). En conjunto, el material genómico se consideró adecuado para su procesamiento mediante la digestión enzimática requerida por el protocolo RRBS.

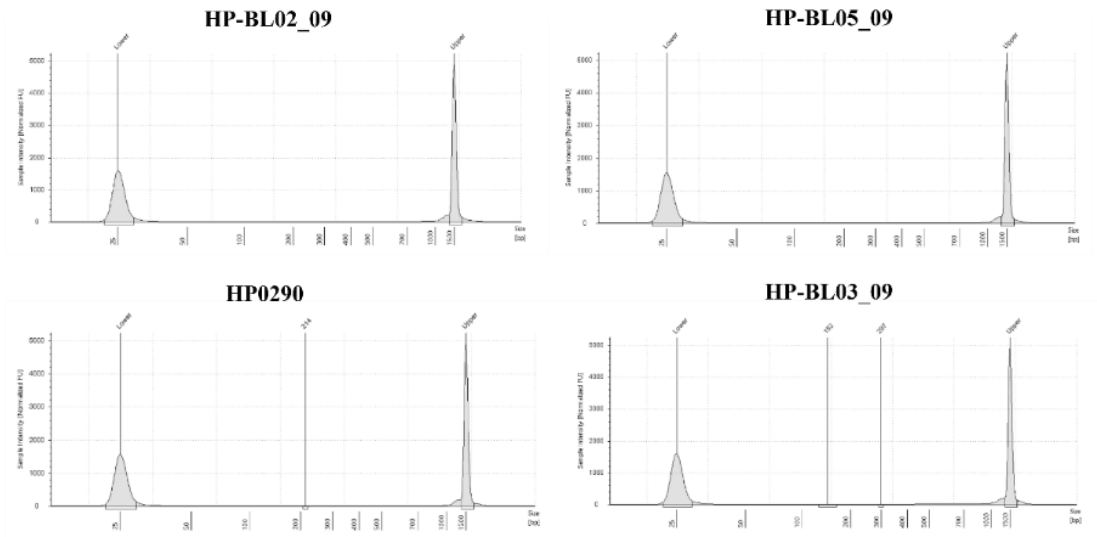


Figura 12: *Evaluación del perfil electroforético inicial del ADNg de origen mediante Agilent TapeStation. Se muestra el perfil electroforético de 4 muestras de LBDCG, observándose en todas un desplazamiento hacia fragmentos de menor tamaño.*

Posteriormente, se realizó la cuantificación del ADNg y de las librerías generadas mediante *Qubit* con el fin de asegurar su compatibilidad con los requisitos del protocolo experimental. Las concentraciones obtenidas fueron adecuadas para la secuenciación de las librerías generadas. Un subconjunto representativo de las muestras analizadas se muestra en la tabla 1, mientras que los datos completos se recogen en el Anexo II.

Tabla 1: *Cuantificación de las muestras de ADNg para la preparación de librerías RRBS. Los parámetros de concentración se determinaron mediante fluorometría de alta sensibilidad.*

Muestra	Diagnóstico	Concentración inicial (ng/µL)	Concentración librería (ng/µL)	ADN de partida (nG)
BSC180077	Control	500	0,50	250
BSC190060	Control	500	2,2	250
HP0319_01	LF	630	8,68	250
HP0344	LF	63,6	8,48	250
HP-BL03_09	LBDCG	28,2	6,17	250
HP-BL05_09	LBDCG	398	6,14	250
HP-BL02_01	LBDCG	28,8	5,3	250

4.2.2. Optimización experimental para muestras de ADNg de controles sanos

Durante la preparación de librerías RRBS a partir de ADNg de controles sanos extraído mediante partículas magnéticas *MagneSil* (Promega), no se obtuvieron perfiles de librería compatibles con los rangos recomendados por el fabricante (150-750 pb), ya que los fragmentos se localizaron en un rango de menor tamaño (50-150 pb) (Figura 13). Además, los eluidos de ADN presentaron una calidad visual inferior a la esperada.

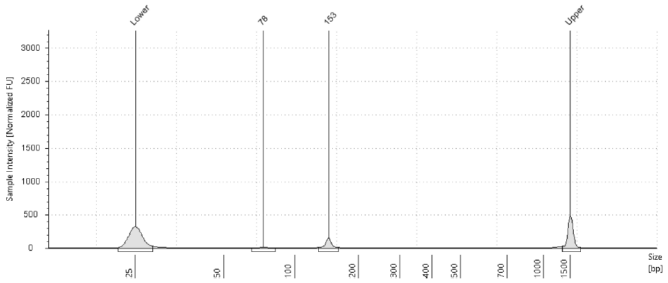


Figura 13: *TapeStation de las librerías RRBS generadas a partir de ADNg de controles sanos extraído con partículas magnéticas MagneSil. No se obtuvo un perfil de librería compatible con una preparación RRBS al no detectarse fragmentos en el rango del tamaño esperado (150-750 pb).*

Para determinar si estos resultados estaban relacionados con la calidad del ADNg de partida, se procesaron muestras control de sangre periférica procedentes del Biobanco del Hospital Universitario puerta de Hierro. Para optimizar el procedimiento, se evaluaron

distintas condiciones experimentales, modificando la cantidad de ADNg de partida (500, 250 y 50 ng), la concentración de la enzima *MspI* (0,5 o 1 µL) y el tiempo de incubación (estándar u 8 horas). Tras la optimización, el análisis mediante *TapeStation* mostró perfiles compatibles con librerías RRBS correctamente generadas, con una distribución de fragmentos dentro del rango esperado (150-750 pb) (Figura 14).

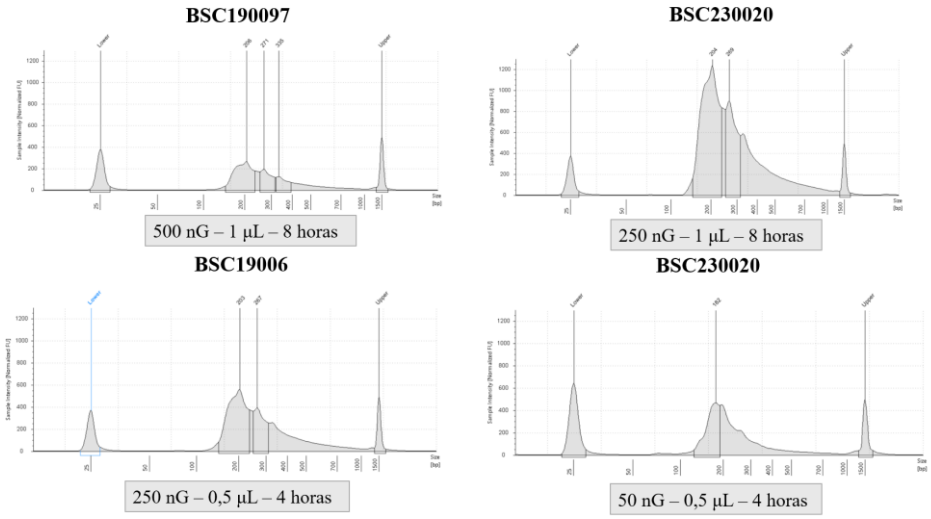


Figura 14: *Evaluación del perfil electroforético de muestras procedentes del biobanco del Hospital Puerta de Hierro tras la optimización del protocolo experimental. Se observa un perfil electroforético compatible con las librerías RRBS correctamente generadas.*

Estos resultados sugieren una influencia de las características del ADNg de partida sobre la eficiencia de la preparación de librerías. Por esta razón, las muestras procedentes del Biobanco del Hospital se seleccionaron para continuar con los análisis posteriores.

4.2.3. Análisis de librerías mediante *TapeStation*

A continuación, se evaluaron las librerías RRBS para determinar la distribución del tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión con *MspI*. Los perfiles electroforéticos obtenidos mostraron una distribución dentro del rango esperado para librerías RRBS (150-750 pb), con un enriquecimiento predominante en torno a 180-250 pb, en concordancia con las especificaciones del kit *Zymo-Seq RRBS.*

Los perfiles fueron homogéneos entre las muestras de LF y LBDCG, sin diferencias relevantes en la distribución de tamaños ni en el patrón general de las librerías. Estos resultados indican que la fragmentación enzimática y la preparación de librerías se llevaron a cabo de forma adecuada y reproducible en ambos grupos de muestras (Figura 15).

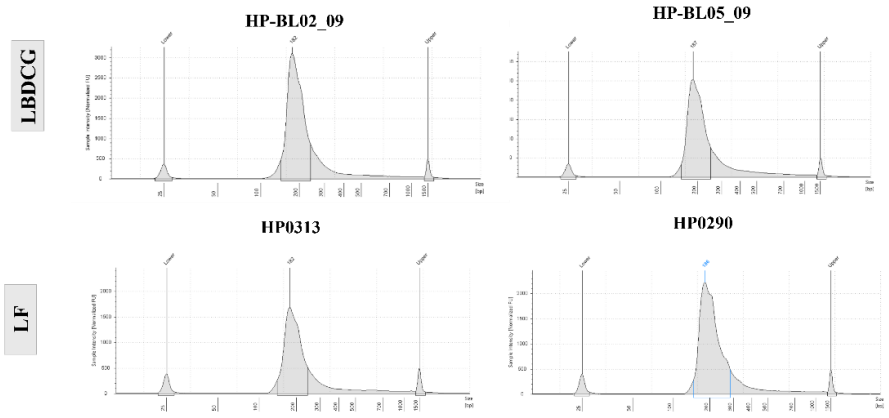


Figura 15: *Perfiles electroforéticos de la librería final tras la digestión con MspI de LBDCG y LF. El pico de enriquecimiento se sitúa dentro del rango objetivo, confirmando una distribución de tamaños adecuada para la secuenciación, conforme a las especificaciones del fabricante (150-750 pb).*

Finalmente, se analizaron los parámetros cuantitativos de las librerías, un subconjunto representativo se muestra en la Tabla 2, mientras que el conjunto completo de datos se recoge en el Anexo III. Se observó una cantidad de ADNg óptima en todas las librerías y se observó cierta variabilidad entre las muestras, ya que la mayoría presentó valores medios de fragmento en torno a 290 pb, mientras que las muestras de LBDCG reflejaron un valor homogéneo de 222 pb, que se corresponde a una acotación interna del software analítico, sin afectar a la calidad o viabilidad biológica de la muestra.

Tabla 2: *Parámetros cuantitativos y de control de calidad de las librerías de secuenciación RRBS. Se incluye la concentración individual (Qubit), el volumen final tras el eluido y la masa total de ADN disponible en la fracción concentrada.*

Muestra	Diagnóstico	Tamaño medio de fragmentos (pb)	Concentración librería (ng/µL)	Volumen (µL)	ADN (nG)
BSC180077	Control	240	0,50	15	7,5
BSC190060	Control	247	2,2	15	33
HP0319_01	LF	223	8,68	15	130,2
HP0344	LF	222	8,48	15	127,2
HP-BL03_09	LBDCG	222	6,17	15	92,55
HP-BL02_01	LBDCG	238	5,3	15	79,5

4.2.4. Secuenciación masiva y control de calidad

Aunque la cohorte total incluyó 23 muestras, los resultados mostrados corresponden al análisis preliminar de 9 librerías, debido a que el procesamiento del conjunto completo

de datos seguía en curso en el momento de la redacción. La secuenciación masiva de las 9 librerías en la plataforma *Illumina* generó un total de 900,43 millones de lecturas brutas, equivalentes a 273,12 G de bases crudas. Tras el filtrado de calidad, eliminación de artefactos y recorte de adaptadores, se obtuvieron 522,19 millones de lecturas limpias correspondientes a 63,96 G de bases limpias. El número de lecturas por muestra se distribuyó de manera homogénea, oscilando entre 34,97 y 85,19 millones de lecturas.

Los parámetros de calidad técnica mostraron un alto rendimiento global (Figura 16), con valores de Q20 superiores al 99,46% y Q30 entre el 96,93% y el 98%. El contenido medio de GC se situó entre el 36,14% y el 39,47%, un rango característico de librerías tratadas con bisulfito, que refleja la conversión química de las citosinas no metiladas en timinas. Asimismo, la tasa de conversión por bisulfito alcanzó el 100% en todas las muestras, confirmando la alta eficiencia del tratamiento aplicado a las librerías. Este resultado minimiza el riesgo de falsos positivos derivados de una conversión incompleta en la posterior identificación de los sitios CpG metilados. Las métricas detalladas de cada muestra se recogen en el anexo IV.

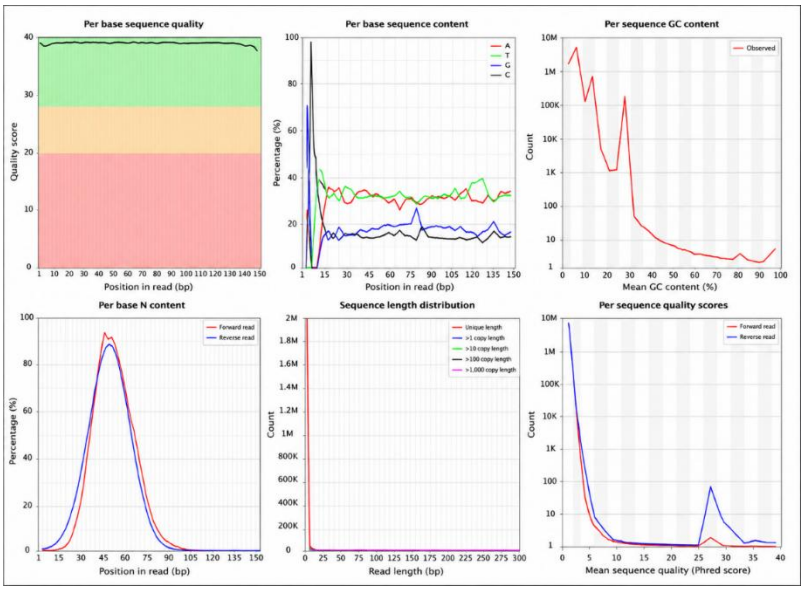


Figura 16: *Control de calidad de las lecturas de secuenciación obtenido mediante FastQC para la muestra HP0290.*

Se evaluó la eficiencia de la digestión de la enzima *MspI* en las 9 librerías (Anexo IV). Se observó una eficiencia media de corte del 46,87%, con valores comprendidos entre el 46,00 y el 47,99%, reflejando la eficiencia del proceso de digestión enzimática, un paso crítico en el enriquecimiento de regiones CpG. Este valor es consistente con el tipo de material de partida utilizado (FFPE), en el que la fragmentación previa del ADN

y las modificaciones derivadas del proceso de fijación pueden limitar el acceso de la enzima a los sitios de restricción, influyendo así en el rendimiento global del proceso.

Debido a la fragmentación previa del ADNg y a las características inherentes del protocolo, la cobertura efectiva obtenida fue inferior a la profundidad de secuenciación teórica esperada (10x), situándose en una media de 1,5x para todo el genoma completo (Anexo V). Esto se refleja en la figura 17, donde se observa que la mayoría de los sitios presentan una baja cobertura y una disminución progresiva del porcentaje de bases a medida que esta aumenta, siguiendo un patrón de caída exponencial característico de este tipo de librerías[29,30].

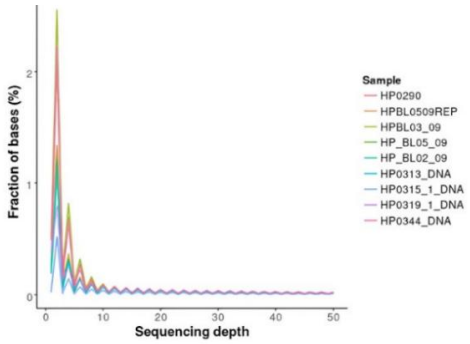


Figura 17: *Distribución de la cobertura del genoma por muestra. Se representa el porcentaje de bases frente a la profundidad de secuenciación, mostrando la baja cobertura global obtenida.*

4.2.5. Alineación con el genoma de referencia

El análisis de metilación en el contexto GC reveló una distribución bimodal (Figura 18), con dos poblaciones principales de sitios: una con baja metilación (≈10%) y otra con alta metilación (≈90%). Este comportamiento coincide con el perfil de metilación descrito en muestras biológicas humanas, donde predominan los estados extremos de metilación[31].

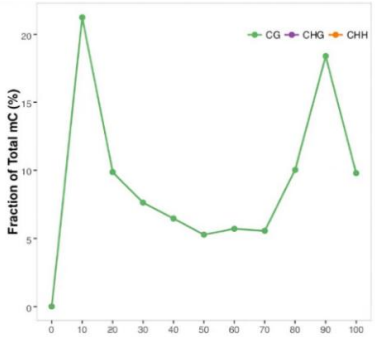


Figura 18: *Distribución bimodal de los niveles de metilación en el contexto GC correspondiente a la muestra HP0290. La gráfica representa la fracción total de citosinas metiladas (mC) en función del porcentaje de metilación, evidenciando una acumulación de sitios en los estados extremos.*

4.2.6. Identificación de las citosinas metiladas

Para comprender la distribución funcional de los sitios metilados, se realizó un perfilado de los niveles de metilación a través de distintas regiones genómicas (Figura 19A), observándose un patrón consistente con la arquitectura genómica humana, caracterizado por hipometilación en islas CpG (CGI) y los promotores, e hipermetilación en regiones de secuencias repetitivas (*repeats*). Este patrón se confirma mediante el análisis de la distribución de frecuencias en estos elementos (Figura 19B).

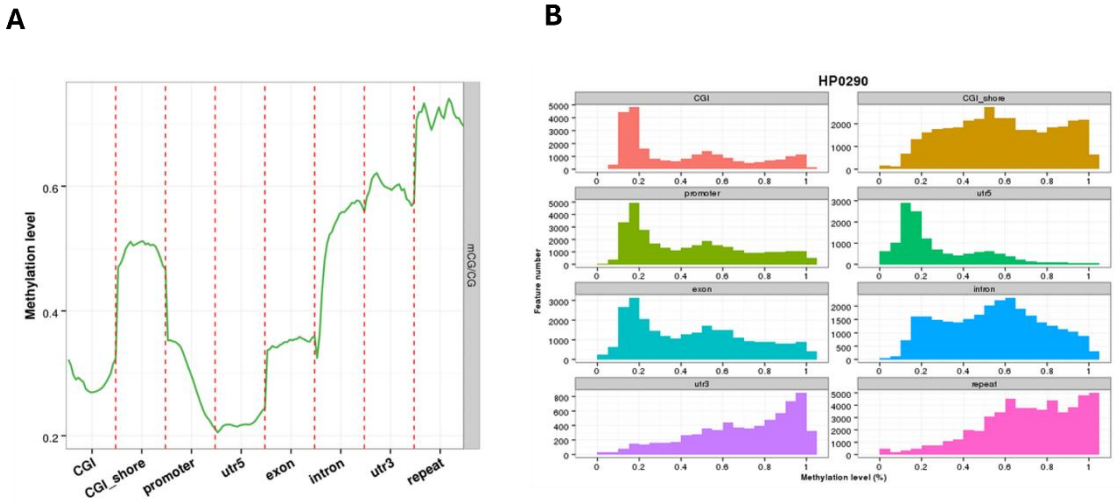


Figura 19 A y B: *Perfil de metilación del ADN a través de regiones genómicas en la muestra HP0290. Se muestra el nivel de metilación en el contexto CG para distintos elementos estructurales del genoma.*

4.2.7. Análisis de identificación de metilación diferencial

La visualización de las regiones en IGV confirmó la presencia de un patrón diferencial previamente identificado en el análisis *in silico*. Los datos obtenidos con *Bismark* mostraron las dos hebras de ADN juntas, por lo que es necesario un *Script* bioinformático para poder separarlas y generar el *Heatmap* correspondiente. No obstante, la inspección de las lecturas mostró la presencia de múltiples sitios CpG consecutivos metilados en una misma molécula de ADN.

En las posiciones correspondientes a las islas CpG del gen *NRN1* (señaladas en morado) aproximadamente un 30% de las lecturas conservan la citosina tras la conversión con bisulfito, indicando que estos sitios permanecen metilados. Este porcentaje es consistente con la infiltración tumoral estimada en las muestras FFPE (aproximadamente un 40%), ya que la presencia de células tumorales no diluye la señal global de metilación.

Por otro lado, se observa metilación en varias CpG consecutivas dentro de las mismas lecturas, lo que concuerda con lo observado en los análisis *in silico*, demostrando que no se trata de artefactos derivados de la secuenciación o de una conversión incompleta por bisulfito. En la hebra complementaria se visualiza un patrón equivalente, ya que la metilación en las islas CpG es simétrica entre ambas cadenas de ADN. De esta manera, el porcentaje de lecturas metiladas observadas en una hebra es comparable al detectado en la otra.

En conjunto, estos resultados constituyen una validación experimental de las regiones diferencialmente metiladas *in silico,* demostrando la presencia de bloques de CpG consecutivos metilados específicamente en las muestras de LBDCG. La figura 20 muestra un ejemplo representativo correspondiente al gen *NRN1*, mientras que en el Anexo VI se incluyen ejemplos adicionales de otras regiones génicas. La incorporación futura de muestras control permitirá confirmar la ausencia de este patrón de metilación en tejido no tumoral.

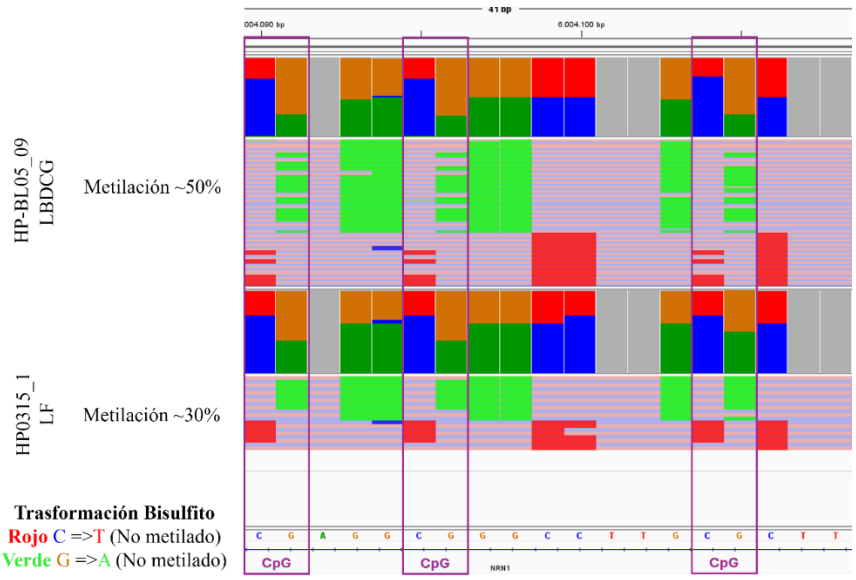


Figura 20: *Visualización en IGV de las lecturas de ADNg tratado con bisulfito en una región diferencialmente metilada del gen NRN1, mostrada previamente como ejemplo en el análisis in silico. Los recuadros morados indican las islas CpG, donde aproximadamente un 30% de las lecturas presentan bloques de CpG consecutivos metilados en ambas hebras de ADN, respaldando el patrón de metilación identificado in silico.*

Finalmente, no se observaron diferencias relevantes entre las muestras FFPE reparadas y no reparadas, por lo que la reparación del ADNg no pareció influir en los resultados obtenidos.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante el análisis *in silico* permitieron identificar un conjunto de regiones diferencialmente metiladas capaces de discriminar de forma precisa entre las muestras de LBDCG y las células B del centro germinal[4]. Un aspecto metodológico diferencial de este análisis fue la priorización de regiones que presentaban múltiples sitios CpG próximos entre sí (al menos tres sitios consecutivos) en lugar de CpG individuales. A diferencia de los cambios epigenéticos puntuales, que pueden ser susceptibles a ruido técnico o biológico, la selección de regiones con al menos tres CpG consecutivas metiladas aumenta significativamente la robustez del biomarcador, reduce la probabilidad de falsos positivos y sugiere la existencia de mecanismos epigenéticos coordinados que alteran regiones reguladoras del genoma[5,20]. Este patrón de metilación en bloque es característico de las neoplasias de células B. Por tanto, el hecho de que el 30% de los candidatos iniciales cumplieran este estricto criterio respalda su potencial como firmas epigenéticas específicas, justificando su validación experimental mediante RRBS y su futura traslación a biopsia líquida.

Para la validación experimental de estas firmas se evaluó la viabilidad de utilizar muestras FFPE para la generación de librerías RRBS. Aunque la evaluación inicial del material genómico confirmó una integridad adecuada sin degradación severa, la fase de optimización puso de manifiesto que la pureza y la calidad del ADNg de partida son determinantes críticos para la eficiencia del protocolo. Las diferencias observadas entre el rendimiento de las extracciones procedentes del Biobanco frente a los controles procesados empíricamente con partículas *MagneSil* evidenciaron la necesidad de reajustar el protocolo estándar. Diversos estudios han corroborado que la técnica RRBS es especialmente sensible a pequeñas variaciones experimentales; la presencia de contaminantes inhibitorios o las modificaciones químicas inducidas por la fijación en formol pueden comprometer la digestión enzimática, la reparación del ADN y en consecuencia, la calidad final de las librerías[32,33]. En este sentido, la optimización lograda en este estudio representa un avance metodológico sustancial.

A pesar de la complejidad intrínseca de las muestras, la NGS confirmó la eficiencia de las modificaciones introducidas en el protocolo. El análisis final de las librerías mostró un enriquecimiento idóneo de fragmentos en el rango objetivo (entre 180 y 250 pb), sin sesgos técnicos observables entre las neoplasias analizadas (LF y LBDCG).

A nivel técnico, el ensayo demostró una elevada robustez analítica, alcanzando parámetros de calidad excelentes (Q30 > 96%) y una tasa de conversión por bisulfito del 100%, lo cual garantiza la fiabilidad de las lecturas de metilación. Paralelamente, la eficiencia media de digestión de la enzima *MspI* (46,87%) y la cobertura media obtenida para el genoma completo (1,5x) son resultados compatibles y satisfactorios dadas las limitaciones inherentes al procesamiento de muestras FFPE.

A pesar de esto, el perfil global de metilación obtenido conservó la arquitectura epigenética característica de las células B. Se observó la esperada hipometilación en promotores e islas CpG e hipermetilación en regiones intergénicas y elementos repetitivos[14,34]. Este patrón, descrito previamente tanto en células B sanas como en neoplasias derivadas del centro germinal, refleja la organización funcional del metiloma en este tipo celular[27,28].

A nivel específico, el análisis en IGV proporcionó una validación técnica y biológica fundamental de las regiones identificadas *in silico*. Se contrastó que aproximadamente un 30% de los *loci* presentaban múltiples sitios CpG consecutivos metilados, mostrando una correlación empírica con el grado de infiltración tumoral estimado en las muestras (40%). La coocurrencia de varias CpG metiladas en las mismas moléculas de ADN reduce la probabilidad de que la señal observada se deba a errores de secuenciación o a conversiones incompletas por bisulfito. Estos resultados confirman la hipótesis planteada a partir del análisis *in silico,* y demuestran que la metilación aberrante en LBCDG ocurre en bloques reguladores ininterrumpidos y no como eventos aislados[35].

Los patrones de metilación del ADN presentan una elevada estabilidad biológica y se detectan incluso en cantidades reducidas de ADN tumoral circulante (ctADN)[16]. Esto convierte a las firmas epigenéticas identificadas en candidatos para el desarrollo de herramientas de biopsia líquida. En este contexto, la identificación de regiones diferencialmente metiladas específicas del LBDCG facilitaría el desarrollo de estrategias diagnósticas mínimamente invasivas para la detección, monitorización y estratificación molecular de los pacientes[10,36].

5.1. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

No obstante, el alcance del presente trabajo se encuentra acotado por los plazos de la investigación académica, lo que supone ciertas limitaciones. Para realizar análisis estadísticos de esta firma epigenética es necesario extender el análisis bioinformático a la

totalidad de la cohorte. La generación del *heatmap* para corroborar la segregación jerárquica de todos los grupos se encuentra en ejecución por el volumen masivo de datos crudos y la alta demanda computacional para el alineamiento de secuencias.

Esto condiciona temporalmente el avance del tercer objetivo, ya que el desarrollo de una herramienta clínica de secuenciación dirigida requiere establecer previamente la firma epigenética específica del LBDCG y el LF. Por tanto, diseñar el panel antes de confirmar las regiones diferencialmente metiladas en el conjunto de la cohorte, comprometería la sensibilidad y especificidad diagnóstica en sangre periférica[7,10]. Como perspectiva futura, una vez concluido el análisis bioinformático global, se diseñará y validará el panel para evaluar su aplicabilidad como herramienta de biopsia líquida en pacientes con LB (LF y LBDCG).

5.2. Impacto traslacional, social y de sostenibilidad

Desde una perspectiva traslacional, este estudio tiene implicaciones relevantes en el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular de precisión. La identificación de firmas específicas de metilación podría contribuir a una mejor estratificación de los pacientes, facilitar la detección precoz de la enfermedad y favorecer el desarrollo estrategias de medicina personalizada. En este sentido, este trabajo se alinea con el objetivo de Desarrollo Sostenible 3 (Salud y Bienestar)[37] de la Organización de las Naciones Unidas[38], al promover el desarrollo de biomarcadores epigenéticos aplicables al diagnóstico y seguimiento en linfomas, así como con el ODS 9[39] (Industria, Innovación e Infraestructura), mediante el uso de tecnologías de NGS y análisis epigenómico.

Desde una perspectiva social, la aplicación de biopsia líquida constituye una alternativa mínimamente invasiva que podría reducir la necesidad de procedimientos diagnósticos agresivos y mejorar la monitorización de la enfermedad. Por otra parte, la incorporación de biomarcadores de metilación en la práctica clínica permitiría optimizar la estratificación de los pacientes y la selección terapéutica, contribuyendo a una mayor eficiencia y sostenibilidad de los sistemas de salud.

Finalmente, la optimización experimental permitió reducir la repetición de ensayos, y, por tanto, el consumo de reactivos, plásticos y recursos asociados a la secuenciación. Aunque el impacto ambiental de este tipo de estudios es limitado, estas estrategias de eficiencia se alinean con el ODS 12 (Producción y consumo responsables)[40].

6. CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* identificó una firma de metilación específica asociada al LBDCG, basada en bloques de tres o más sitios CpG. La selección de este tipo de regiones aumenta la robustez del biomarcador y reduce la probabilidad de falsos positivos técnicos. Los datos obtenidos mediante RRBS confirmaron la presencia de esta firma y respaldaron la existencia de los tres bloques consecutivos de CpG metilados identificados *in silico.*

2. La optimización del protocolo RRBS para muestras FFPE permitió obtener librerías de alta calidad a pesar de las modificaciones químicas inducidas por la fijación en formol, demostrando la viabilidad de esta metodología para el estudio del metiloma en muestras de LF y LBDCG, proporcionando una base experimental sólida para la validación de biomarcadores epigenéticos.

3. Los resultados preliminares sugieren que la firma epigenética identificada en LBDCG podría estar presente también en muestras de LF, lo que apunta a la existencia de alteraciones epigenéticas compartidas entre ambos subtipos de LB. No obstante, será necesario completar el análisis de la cohorte para confirmar este hallazgo.

4. Estos resultados sientan las bases para el diseño de un panel de biomarcadores epigenéticos aplicable a biopsia líquida. Su desarrollo definitivo requerirá la validación de la firma epigenética en la cohorte completa y la consolidación del *pipeline* bioinformático. Este enfoque podría constituir una herramienta prometedora para la monitorización no invasiva de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Jamil A, Mukkamalla SKR. Lymphoma [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jul 17 [cited 2026 Jun 04]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560826/

2. Arber DA, Campo E, Jaffe ES. Advances in the Classification of Myeloid and Lymphoid Neoplasms. Virchows Arch 2023;482(1):1-9 [cited 2026 Apr 12] Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36586001/

3. Jiménez-Ubieto A, Poza M, Martin-Muñoz A, et al. Real-life disease monitoring in follicular lymphoma patients using liquid biopsy ultra-deep sequencing and PET/CT. Leukemia 2023;37(3):659–669.

4. Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, et al. DNA methylation signatures define molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood [homepage on the Internet] 2010;116(20): e81-e89.

5. Pan H, Jiang Y, Boi M, et al. Epigenomic evolution in diffuse large B-cell lymphomas. Nat Commun 2015; 6:6921.

6. Araf S, Okosun J, Koniali L, Fitzgibbon J, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. Epigenomics. 2016;8(1):77–84.

7. Fernández-Miranda I, Pedrosa L, Llanos M, et al. Monitoring of Circulating Tumor DNA Predicts Response to Treatment and Early Progression in Follicular Lymphoma: Results of a Prospective Pilot Study. Clin Cancer Res. 2023;29(1):209–220.

8. Paillard C, Nicolae A, Aussenac L. Linfoma no Hodgkin en niños: tipos histológicos, presentaciones clínicas y tratamientos. EMC Pediatr. 2023;58(2):1–11.

9. Almasri M, Maher N, Deeban B Al, Diop NM, Moia R, Gaidano G. Liquid Biopsy in B and T Cell Lymphomas: From Bench to Bedside. Int. J. Mol. Sci. 2025;26(10):4604.

10. Cirillo M, Craig AFM, Borchmann S, Kurtz DM. Liquid biopsy in lymphoma: Molecular methods and clinical applications. Cancer Treat. Rev. 2020; 91:102106.

11. Fong J, Gardner JR, Andrews JM, et al. Determining subpopulation methylation profiles from bisulfite sequencing data of heterogeneous samples using DXM. Nucleic Acids Res. 2021;49(16): e93.

12. Arzuaga-Mendez J, Prieto-Fernández E, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, García-Ruiz JC, García-Orad A. Cell-free DNA as a biomarker in diffuse large B-cell lymphoma: A systematic review. Crit Rev Oncol Hematol 2019; 139:7–15.

13. Božić T, Kuo CC, Hapala J, et al. Investigation of measurable residual disease in acute myeloid leukemia by DNA methylation patterns. Leukemia 2022;36(1):80–89.

14. O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, et al. Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. Leukemia. 2009;23(10):1858–1866.

15. Wang SS, Lewis MJ, Pitzalis C. DNA Methylation Signatures of Response to Conventional Synthetic and Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) in Rheumatoid Arthritis. Biomedicines. 2023;11(7):1908.

16. Espín-Pérez A, Brennan K, Ediriwickrema AS, Gevaert O, Lossos IS, Gentles AJ. Peripheral blood DNA methylation profiles predict future development of B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. NPJ Precis Oncol. 2022;6(1):53.

17. Choi JH, Li Y, Guo J, et al. Genome-wide DNA methylation maps in follicular lymphoma cells determined by methylation-enriched bisulfite sequencing. PLoS One. 2010;5(9): e12702.

18. Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, et al. DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. Nat Genet. 2015;47(11):1316–1325.

19. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2005;33(18):5868–5877.

20. Duran-Ferrer M, Clot G, Nadeu F, et al. The proliferative history shapes the DNA methylome of B-cell tumors and predicts clinical outcome. Nat Cancer 2020;1(11):1066–1081.

21. Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, [cited 2026 Jun 28]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds

22. European Genome-phenome Archive (EGA) [Internet]. Barcelona: Center for Genomic Regulation; [cited 2026 Jun 28]. Available from: https://ega-archive.org/

23. Zymo Research. Zymo-Seq RRBS Library Kit: Instruction Manual [Internet]. Irvine (CA): Zymo Research; 2026 [cited 2026 Jun 05]. Available from: https://zymoresearch.eu/products/zymo-seq-rrbs-library-kit

24. Diagenode. DNA Methylation Manually and Automated System. [Internet]. [cited 2026 Jun 8]. Available from: https://www.diagenode.com/en/categories/dna-methylation

25. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 2011;29(1):24.6.

26. Heatmapper [Internet]. Edmonton: The metabolomics Innovation Centre; [cited 2026 Jun 15]. Available from: https://heatmapper.ca/

27. Teater M, Dominguez PM, Redmond D, et al. AICDA drives epigenetic heterogeneity and accelerates germinal center-derived lymphomagenesis. Nat Commun. 2018;9(1):222.

28. Dominguez PM, Teater M, Chambwe N, et al. DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. Cell Rep. 2015;12(12):2086–2098.

29. Meyer, M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(6):pdb. prot5448.

30. Schuber M, Ermini L, Der Sarkissian C, Jónsson H, Ginolhac A, Schaefer R, et al. Characterizacion of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. Nat Protoc. 2014;9(5):1056-1082.

31. Gu H, Smith ZD, Bock C, Boyle P, Gnirke A, Meissner A. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. Nat Protoc. 2011;6(4):468–481.

32. Boyle P, Clement K, Gu H, et al. Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. Genome Biol. 2012;13(10): R92.

33. Carlund O, Thörn E, Osterman P, et al. Semimethylation is a feature of diffuse large B-cell lymphoma, and subgroups with poor prognosis are characterized by global hypomethylation and short telomere length. Clin Epigenetics. 2024;16(1):88.

34. Do C, Dumont ELP, et al. Allele-specific DNA methylation is increased in cancers and its dense mapping in normal plus neoplastic cells increases the yield of disease-associated regulatory SNPs. Genome Biol. 2020;21(1):153.

35. Božić T, Kuo CC, Hapala J, et al. Investigation of measurable residual disease in acute myeloid leukemia by DNA methylation patterns. Leukemia. 2022;36(1):80-89.

36. United Nations. Goal 3: Good Health and Well-Being [Internet]. Department of Economic and Social Affairs; [cited 2026 Jun 30]. Available from: https://sdgs.un.org/goals/goal3

37. United Nations. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development [Internet]. Department of Economic and Social Affairs; [cited 2026 Jun 30]. Available from: https://sdgs.un.org/2030agenda

38. United Nations. Goal 9: Industry, Innovation and Infrastructure [Internet]. Department of Economic and Social Affairs; [cited 2026 Jun 30]. Available from: https://sdgs.un.org/goals/goal9

39. United Nations. Goal 12: Responsible Consumption and Production. [Internet]. Department of Economic and Social Affairs; [cited 2026 Jun 30]. Available from: https://sdgs.un.org/goals/goal12

8. ANEXOS

ANEXO I. DETALLE DE SOFTWARE Y DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS EN EL PROCESAMIENTO DE DATOS DE SECUENCIACIÓN.

En este anexo se resume el flujo de análisis bioinformático y se detallan las herramientas y parámetros empleados durante el procesamiento de los datos de secuenciación.

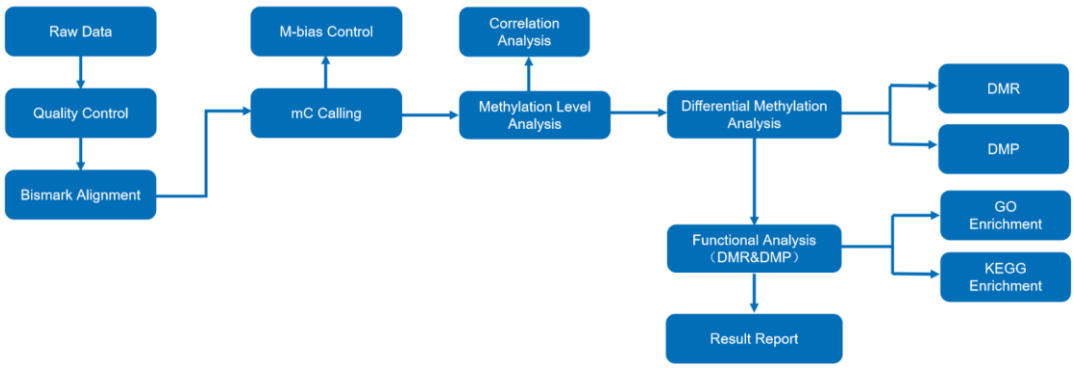


Figura A1: *Flujo de trabajo bioinformático empleado por la empresa Novogene para el procesamiento y análisis de los datos de metilación obtenidos mediante secuenciación RRBS, incluyendo las etapas de control de calidad, alineamiento, identificación de citosinas metiladas, análisis de metilación diferencial y análisis funcional.*

Tabla A1: *Software, versiones y parámetros utilizados en cada etapa del procesamiento y análisis de los datos de secuenciación.*

Análisis	Software	Versión	Parámetros
CGI	cpgIslandExt	-	-
repeat	RepeatMasker	-	-
Trim	fastp	0.23.1	--cut_front_window_size=1 --cut_front_mean_quality=3 --cut_tail_window_size=1 --cut_tail_mean_quality=3 --cut_right_window_size=4 --cut_right_mean_quality=15 --length_required=36
QC	fastqc	0.11.8	-
mapping	Bismark	0.24.0	--score_min L, 0, -0.2, -X 700 --dovetail
deduplicate	Bismark (deduplicate_bismark)	-	--paired --samtools_path
mC calling	Bismark (bismark_methylation_extractor)	-	--multicore 4 --paired-end --no_overlap -ignore 5 --ignore_r2 5

DMR analysis	DSS	2.12.0	smoothing.span=200, delta=0, p.threshold=1e-05, minlen=50, minCG=3, dis.merge=100, pct.sig=0.5
GO enrichment	Goseq/topGO Bioconductor	2.13	corrected p-value<0.05
KEGG enrichment	KOBAS	3.0	corrected p-value<0.05
Circos plot	circos	0.62-1	-

ANEXO II. LISTADO COMPLETO DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS MEDIANTE RRBS.

En este anexo se presenta el listado completo de las muestras incluidas en el análisis mediante RRBS, así como los parámetros empleados para la preparación de las librerías, completando el subconjunto representativo mostrado en la sección de Resultados.

Tabla A2: *Información completa de las muestras utilizadas en el análisis mediante RRBS, incluyendo el diagnóstico, la concentración inicial de ADN, la concentración de la librería y la cantidad de ADN de partida.*

Muestra	Diagnóstico	Concentración inicial (ng/µL)	Concentración librería (ng/µL)	ADN de partida (nG)
BSC180077	Control	500	0,50	250
BSC190060	Control	500	2,20	250
BSC230050	Control	500	0,48	250
BSC230020	Control	500	0,36	250
BSC190097	Control	500	0,32	250
HP0313	LF	200	3,16	250
HP0315_01	LF	71,8	6,6	250
HP0319_01	LF	630	8,68	250
HP0344	LF	63,6	8,48	250
HP0308	LF	412	4,62	250
HP0311_01	LF	614	6,72	250
HP0325_01	LF	102	6,62	250
HP0322	LF	96	5,5	250
HP-BL05_07	LF	143	6,46	250
HP0290	LBDCG	82,6	3,84	250
HP-BL03_09	LBDCG	28,2	6,17	250
HP-BL02_09	LBDCG	348	4,95	250
HP-BL05_09	LBDCG	398	6,14	250
HP-BL02_01	LBDCG	28,8	5,3	250
HP-BL03_02_01	LBDCG	20,2	5,2	250
HP-BL11_16	LBDCG	41	4,24	250
HP-BL12_05	LBDCG	54	5,42	250
HP-BL12_09	LBDCG	55,4	4,78	250

ANEXO III. PARÁMETROS CUANTITATIVOS COMPLETOS DE LAS LIBRERÍAS RRBS.

En este anexo se presentan los parámetros cuantitativos completos de las librerías obtenidas mediante RRBS, completando al subconjunto representativo mostrado en la sección de Resultados.

Tabla A3: *Caracterización de las librerías RRBS, incluye: concentración inicial del ADNg, concentración de la librería, volumen útil, cantidad de ADNg de partida y tamaño medio de los fragmentos.*

Muestra	Diagnóstico	Tamaño medio de fragmentos (pb)	Concentración librería (ng/µL)	Volumen (µL)	ADN (nG)
BSC180077	Control	240	0,50	15	7,5
BSC190060	Control	247	2,2	15	33
BSC230050	Control	241	0,48	15	7,2
BSC230020	Control	244	0,36	15	5,4
BSC190097	Control	241	0,32	15	4,8
HP0313	LF	221	3,16	15	47,4
HP0315_01	LF	220	6,6	15	99
HP0319_01	LF	223	8,68	15	130,2
HP0344	LF	222	8,48	15	127,2
HP0308	LF	345	4,62	15	69,3
HP0311_01	LF	352	6,72	15	100,8
HP0325_01	LF	332	6,62	15	99,3
HP0322	LF	354	5,5	15	82,5
HP-BL05_07	LF	345	6,46	15	96,9
HP0290	LBDCG	222	3,84	15	57,6
HP-BL03_09	LBDCG	222	6,17	15	92,55
HP-BL02_09	LBDCG	222	4,95	15	74,25
HP-BL05_09	LBDCG	222	6,14	15	92,1
HP-BL02_01	LBDCG	238	5,3	15	79,5
HP-BL03_02_01	LBDCG	236	5,2	15	78
HP-BL11_16	LBDCG	236	4,24	15	63,6
HP-BL12_05	LBDCG	235	5,42	15	81,3
HP-BL12_09	LBDCG	238	4,78	15	71,7

ANEXO IV. MÉTRICAS COMPLETAS DE SECUENCIACIÓN, CONTROL DE CALIDAD Y EFICENCIA DE LA DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE RRBS.

En este anexo se recogen las métricas completas de secuenciación y control de calidad de las muestras analizadas mediante RRBS, así como los parámetros de alineamiento y la eficiencia de la digestión de la enzima *MspI* para cada una de las librerías.

Tabla A4: *Métricas de secuenciación y control de calidad de las muestras analizadas mediante RRBS, incluyendo el número de lecturas brutas y limpias, bases crudas y limpias, porcentaje de Q20 y Q30, contenido de GC y tasa de conversión por bisulfito.*

Muestra	Lecturas sin procesar	Bases crudas (G)	Lecturas limpias	Bases limpias (G)	Índice de limpieza	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)	BS %
HP0290	146682796	44.00	80652337	9.57	21.75	99.64	98.00	36.85	100
HPBL0509	91931359	27.58	52502312	6.34	22.99	99.52	97.20	37.76	100
HPBL03_09	131598413	39.48	85188154	11.07	28.04	99.56	97.38	36.14	100
HP_BL05_09	88989852	26.70	51013987	6.13	22.96	99.47	97.05	38.01	100
HP_BL02_09	90041913	27.01	50128582	5.91	21.88	99.52	97.24	37.34	100
HP0313	90240379	27.07	53277014	6.41	23.68	99.49	97.13	37.94	100
HP0315_1	89455610	26.84	34965044	3.58	13.34	99.53	97.20	39.47	100
HP0319_1	91243780	27.37	57918070	7.50	27.40	99.46	96.95	38.06	100
HP0344	90244890	27.07	56546440	7.45	27.52	99.46	96.93	37.33	100

Tabla A5: *Métricas de alineamiento y eficiencia de digestión de las muestras analizadas mediante RRBS, incluyendo el número de lecturas totales mapeadas, la tasa de mapeo y la eficiencia de digestión de la enzima MspI.*

Muestra	Lecturas totales	Lecturas mapeadas	Tasa de mapeo	Eficiencia de la digestión
HP0290	80652337	52278844	64,82	46.00
HP-BL05_09_REP	52502312	35418059	67,46	47,88
HP-BL03_09	85188154	52527015	61,66	46.19
HP-BL05_09	51013987	34929276	68,47	46.07
HP-BL02_09	50128582	35315586	70.45	47,99
HP0313	53277014	36148453	67,85	47.03
HP0315_1	34965044	24993013	71,48	47,64
HP0319_1	57918070	39395871	68.02	46,93
HP0344	56546440	36393288	64,36	46.14

ANEXO V. MÉTRICAS COMPLETAS DE COBERTURA Y PROUNDIDAD DE SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE RRBS.

En este anexo se presentan las métricas completas de cobertura de los sitios CpG y la profundidad de secuenciación obtenidas para las muestras analizadas mediante RRBS.

Tabla A6: *Métricas de cobertura de las sitios CpG en las muestras analizadas mediante RRBS, incluyendo el número total de sitios CpG identificados, la cobertura media y el número de sitios con una profundidad de secuenciación 1x, 5x y 10x.*

Muestra	Número de sitios CpG	Sitios covgMean	Sitios numCovg1	Sitios numCovg5	Sitios numCovg10
HP0290	153084296	2.04	4.94	1.89	1.41
HPBL0509REP	112800311	1.40	3.64	1.63	1.34
HPBL03_09	198306088	2.24	6.40	2.35	1.69
HPBL05_09	104406545	1.37	3.37	1.54	1.25
HP-BL02_09	93920686	1.35	3.03	1.40	1.13
HP0313	98840862	1.42	3.19	1.49	1.22
HP0315_1	43212931	0.82	1.39	0.72	0.60
HP0319_1	107757976	1.69	3.48	1.93	1.58
HP0344	176395204	1.60	5.69	2.19	1.69

ANEXO VI. VISUALIZACIÓN ADICIONAL DE LAS REGIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE RRBS.

En este anexo se presentan las visualizaciones adicionales en IGV de las regiones diferencialmente metiladas identificadas en el análisis *in silico* para algunas de las muestras analizadas mediante RRBS. Estas figuras complementan el ejemplo representativo mostrado en la sección de Resultados y muestran la reproductibilidad del patrón de metilación observado.

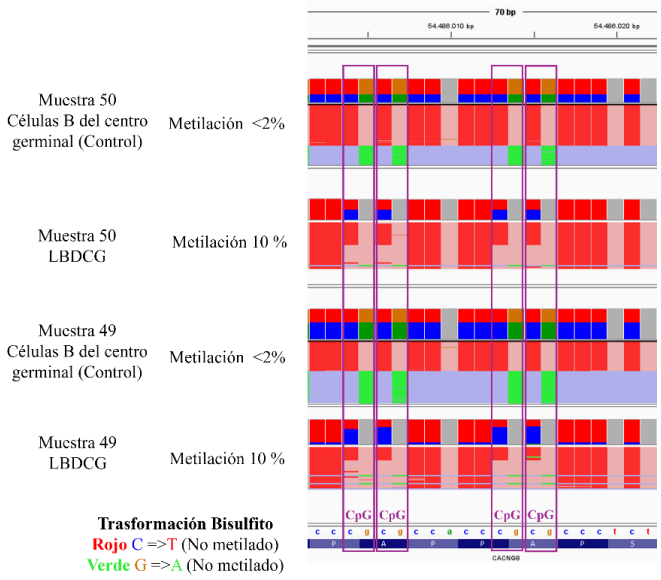


Figura A2: *Visualización en IGV de la metilación del ADNg tratado con bisulfito en la región diferencialmente metilada del gen CACNG8 a partir de los datos in silico. Los recuadros morados indican las islas CpG, donde aproximadamente el 10% de las lecturas presentan bloques consecutivos de*

CpG metilados en ambas hebras de ADN en comparación con los controles donde la metilación es inferior al 2%.

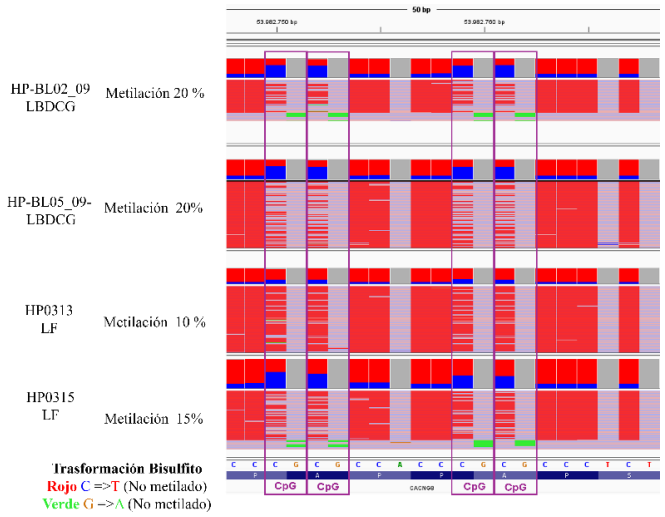


Figura A3: *Visualización en IGV de la metilación del ADNg tratado con bisulfito en la región diferencialmente metilada del gen CACNG8 a partir de los resultados obtenidos mediante la técnica RRBS. Los recuadros morados indican las islas CpG, donde aproximadamente el 10% de las lecturas presentan bloques consecutivos de CpG metilados en ambas hebras de ADN en comparación con los controles donde la metilación es inferior al 2%.*

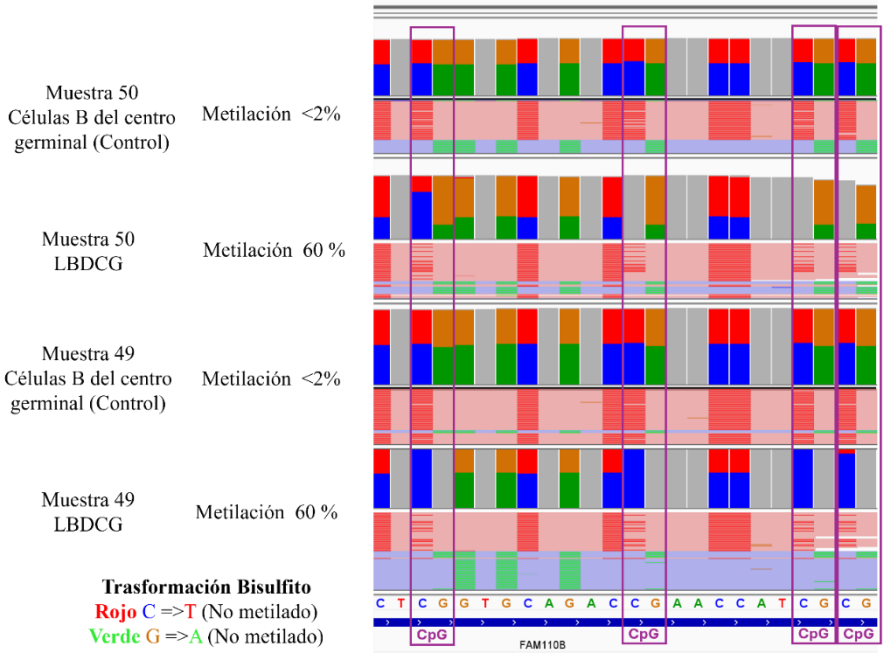


Figura A4: *Visualización en IGV de la metilación del ADNg tratado con bisulfito en la región diferencialmente metilada del gen FAM110B a partir de los datos in silico. Los recuadros morados indican las islas CpG, donde aproximadamente el 60% de las lecturas presentan bloques consecutivos de CpG metilados en ambas hebras de ADN en comparación con los controles donde la metilación es inferior al 2%.*

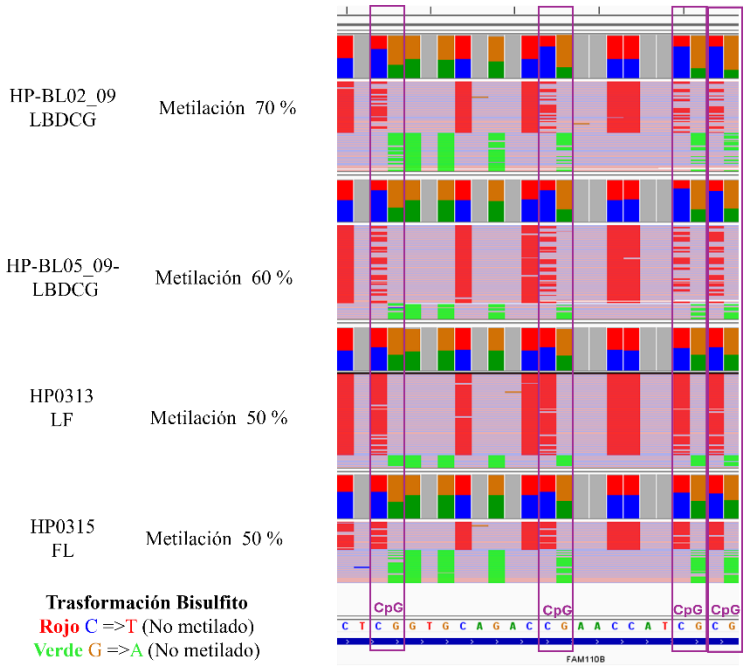


Figura A5: *Visualización en IGV de la metilación del ADNg tratado con bisulfito en la región diferencialmente metilada del gen FAM110B a partir de los resultados obtenidos mediante la técnica RRBS. Los recuadros morados indican las islas CpG, donde aproximadamente el 50% de las lecturas presentan bloques consecutivos de CpG metilados en ambas hebras de ADN en comparación con los controles donde la metilación es inferior al 2%.*