

EPIGENÉTICA.
**¿SOMOS ÚNICAMENTE LA EXPRESIÓN DE
NUESTRO GENOTIPO, O HAY INTERACCIONES
ENTRE LOS GENES Y FACTORES EXTERNOS
QUE MODIFICAN NUESTRO FENOTIPO?**

POR LA

Ilma. Sra. Dña. MARÍA VICTORIA ARRUGA LAVIÑA

*Los grandes estadistas y militares pueden
gobernar el mundo, pero es la presencia de
los que amamos y la memoria de los que
hemos perdido, aunque continúan viviendo
en nuestros corazones, lo que da la alegría
de vivir y el significado a lo que hacemos.*

**A todos cuantos han formado el tejido
de mi vida y le han dado color y belleza.**

ÍNDICE

Página

Prólogo	3
Discurso	8
I.-Definición y conceptos básicos	8
I. 1.- Componentes principales del gen	12
I. 1. 1.- El ADN	12
I. 1. 2.- Las proteínas histonas y su empaquetamiento con el ADN	13
I. 2.- ¿Qué es la impronta genética?	18
II.- Epigénesis	19
II.1.- La metilación del ADN	19
II. 1. 1.- ¿Qué relación tiene la impronta genética con la metilación del ADN?-----	24
II. 1. 2.- ¿Cómo se pueden establecer y mantener patrones metilados y no metilados de ADN en mamífero como los que surgen en el desarrollo embrionario? 25	
II. 1. 3.- El silenciamiento transcripcional de la cromatina como un objetivo de la metilación <i>de novo</i>	29
II. 1. 4.- Consecuencias del aumento de la metilación: silenciamiento transcripcional estable de genes	30
II. 1. 5.- Consecuencias de la pérdida de metilación: la activación de genes durante el desarrollo	34
II. 2.- La modificación de las histonas	35
II. 2. 1.- Acetilación	36
II. 2. 2.- Fosforilación	36
II. 2. 3.- Sumoilación	37
II. 2. 4.- Ubiquitinación	37
II. 2. 5.- Vínculos entre la metilación del ADN y la modificación de las histonas -	39
II. 2. 6.- Las proteínas del grupo Polycomb y la metilación del ADN en el desarrollo y en el cáncer	41

II. 2. 7.- El posicionamiento del nucleosoma y la metilación del ADN -----	42
II. 2. 8.- La desmetilación del ADN -----	43
II. 3.- Los ARN no codificantes y el epigenoma -----	44
II. 3. 1.- Los ARN de interferencia (siRNAs) -----	45
II. 3. 2.- Los micro ARNs (miARNs) -----	45
II. 3. 3.- Los pi ARNs (piRNAs) -----	46
III.- La herencia epigenética y la evolución. La herencia transgeneracional -----	46
IV.- Efectos de la dieta y la nutrición -----	54
V.- Efectos dependientes de la temperatura -----	54
VI.- Efectos de la presencia de predadores -----	55
VII.- La Epigenética y el cáncer -----	55
VII. 1.- Influencias de los factores epigenéticos en el cáncer -----	55
VII. 1. 1.- En el diagnóstico de la Leucemia mieloide aguda (LMA) -----	56
VII. 1. 2.- La metilación del ADN en el diagnóstico del cáncer -----	57
VII. 2.- La vía de señalización Wnt -----	58
VII. 3.- La vía de transducción de señales Notch -----	61
VIII.- Biomarcadores epigenéticos -----	62
IX.- Referencias bibliográficas -----	67

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza,

Excmos. Sras. y Sres. Académicos,

Autoridades,

Sras., Sres., amigas y amigos,

PRÓLOGO

En primer lugar expreso mi agradecimiento a los miembros de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza que han avalado y apoyado mi candidatura como Académica de número. Me siento muy honrada de formar parte de esta Academia y de poder contribuir a su actividad en pro de la Ciencia.

Hoy se me presenta una ocasión formidable para hacer referencia a todas las personas de quienes he aprendido, con quienes he compartido mis grandes satisfacciones y, también, mis pequeñas frustraciones, dudas y preocupaciones que con frecuencia acompañan en la búsqueda de lo desconocido en este maravilloso mundo de la Ciencia. Debo centrar mi agradecimiento en aquellas personas que han tenido una influencia más directa, pero soy consciente que son muchos más los que me han ayudado en mi desarrollo personal y profesional que los que aquí menciono.

Agradezco profundamente la ayuda y apoyo de los Académicos: la Profesora Dra Doña Caridad Sánchez-Acedo que propuso mi candidatura y que siempre he contado con su consejo y amistad, muchas gracias por su dedicación y esfuerzo por la Ciencia en todos los ámbitos donde se ha desenvuelto y al Profesor Dr D. Juan Pablo Martínez Rica, que tan generosamente aceptó realizar el discurso de réplica, fuente de sabiduría, muchas gracias también por su dedicación a las tareas que la Ciencia le ha propuesto. A ambos les agradezco todo lo que me han animado y estimulado.

Me mueve un profundo agradecimiento a las personas con las cuales me he formado, los profesores Ingemar Gustavsson, de la Universidad de Suecia, en Uppsala y Leopoldo Iannuzzi, del Instituto de Producción Animal de la Región Mediterránea, del Consejo Nacional de Investigación en Italia, así como a mis directores de Tesis, los Profesores Isaías Zarazaga y Miguel Vallejo.

Y de una forma muy especial, deseo resaltar a mi predecesor que fue también mi maestro, el profesor Dr. D. Manuel Tamparillas Salvador, tristemente fallecido. En estos momentos le recordamos con gran respeto y reconocimiento, por su obra de diagnóstico genético en todo el territorio nacional y su labor de maestro y científico que tanto influyó en todos los que amamos la Citogenética. En su Laboratorio nos iniciamos en esta disciplina todos cuantos hemos trabajado en este campo apasionante de la Citogenética, en las áreas geográficas de Aragón, Navarra, Soria o La Rioja, entre otras.

Trataré de cumplir firmemente mi compromiso de ser merecedora de llevar su medalla, y aportar el entusiasmo y la dedicación que él puso en el trabajo académico y en engrandecer todo lo posible a esta Academia de Ciencias.

Deseo aprovechar esta ocasión para agradecer la confianza que todos ellos depositaron y depositan en mí y toda la ayuda que me prestaron para poder llegar a estos momentos de mi vida profesional.

Además del apoyo e influencia de mis maestros, en mi contribución a la Ciencia he contado con un equipo de colaboradores que me han mostrado siempre un apoyo incondicional. He de reconocer que toda mi trayectoria no hubiese sido posible si no hubiera contado con discípulos del máximo nivel y de quienes me siento muy orgullosa. Codo con codo hemos invertido esfuerzo, entusiasmo y dedicación a nuestras tareas investigadoras conjuntas y nunca me faltó su colaboración, lealtad y compañía. Muchos de ellos ocupan cargos relevantes en distintas Universidades y en la profesión veterinaria, como Cristina García García, Lourdes Sanz Oloriz, Cristina Grúas Vinués, Ana Hériz Peyrolón, Silvia Llambí, Carlos Schifferli, Alicia Postiglioni, Ricardo Ponz, Juan Ansón y con algunos de ellos, como José Ignacio Bonafonte, M. José Martínez-Sañudo, Azucena Gálvez, Antonio Leuza, Ángel Díaz-Otero, Cristina Bonastre y Amaya de Torre, con ellos tengo el gusto de estar colaborando actualmente en el Grupo de Investigación Consolidado, reconocido por el Gobierno de Aragón y que dirijo con gran satisfacción por mi parte.

Más allá de todo reconocimiento profesional, tengo claro que mi trayectoria se debe sobre todo a mis padres, a quienes considero verdaderamente sabios al ser capaces de reconocer, en un entorno desfavorable, la importancia de una formación superior, a la que ellos no pudieron acceder. Ese ha sido su gran legado, por el que me siento orgullosa de haberlos tenido como padres. También quiero agradecer a mi hermana, que en todo momento me ha dado su apoyo, su ánimo y su ayuda para poder dedicarme con mayor intensidad a la Ciencia. Y agradecer con toda la profundidad de mi corazón a mi marido José Ignacio y a mis hijos Elena y Nacho, que siempre me ponen retos a superar, con su intelecto y agudeza mental. Ellos supieron

renunciar a tiempos que en muchas ocasiones les hubieran correspondido y que los dediqué a la Ciencia. No quiero olvidarme de mi hija política, María, y de mis nietas Almudena y María, quienes me aportan una felicidad sosegada y esperanzada en la vida. Todos me facilitan la inspiración y el empeño en mi trabajo. Tenerlos a ellos es el mayor privilegio que la vida me ha dado.

En este discurso de ingreso he querido abordar un tema que me ha maravillado a lo largo de mi trayectoria profesional, que es lo que hoy se conoce como Epigenética.

Cuando a lo largo de la Historia de la Humanidad se comienza con la domesticación de los animales y con la agricultura, el criador, además de seleccionar para la reproducción a aquellos animales que le han proporcionado mayores rendimientos, como puede ser la producción de carne o de leche, entre otros, sabe muy bien que la alimentación, la higiene y otros factores externos son necesarios para lograr e incluso mejorar ese rendimiento en la descendencia. Igualmente le sucede al agricultor, él sabe que no sólo debe sembrar las semillas mejores, sino que las condiciones meteorológicas y la situación del terreno van a ser decisorias para una buena cosecha.

Y es que para la expresión de los genes no solamente cuenta la información de bases nitrogenadas que, como hoy sabemos, constituyen la llamada molécula de la vida o ADN, base de toda la información genética. De siempre, el hombre ha conocido la influencia del ambiente sobre los caracteres de producción y la Ciencia ha identificado genes cuya expresión está condicionada por factores externos como el ambiente, en definitiva por otras características no genéticas.

Pero el conocimiento del por qué sucede esto en unos genes y no en todos, por qué son tan importantes las condiciones externas para que la expresión de esos genes sea de una o de otra forma, por qué hay expresiones diferentes en gemelos univitelinos, cuando se sabe que ambos tienen la misma información genética, el por qué de las respuestas y funciones distintas de los billones de células que componen nuestro organismo, organizadas en más de 200 tipos celulares diferentes, si todas ellas tienen el mismo ADN, por qué el tipo de vida que hacemos es tan determinante y sus consecuencias, favorables o desfavorables, pasan a nuestros nietos y a generaciones posteriores; estos interrogantes y muchos otros más han estado siempre presentes. A todos ellos está tratando de responder la Epigenética.

La Epigenética hace referencia al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia o desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su senescencia, pasando por la forma adulta. Interviene en la regulación heredable de la expresión génica sin que se produzcan cambios en la secuencia de nucleótidos

del ADN. Se puede decir que la Epigenética es el conjunto de reacciones químicas y demás procesos que modifican la actividad del ácido nucleico sin alterar su secuencia.

El término fue acuñado por Conrad Hal Waddington en 1942, para referirse al estudio de las interacciones entre genes y ambiente que tienen lugar en los organismos.

Tras la finalización del Proyecto Genoma Humano, en el año 2003, y su publicación en *Nature* en octubre de 2004, quedó definitivamente constatado el hecho de que en las bases moleculares de los genes hay mucho más que la propia secuencia sin más. Ese conjunto constituido por la secuencia, la interacción génica y los efectos externos es lo que está actuando sobre el funcionamiento celular, sobre el desarrollo embrionario, sobre el envejecimiento y sobre la aparición de muchas enfermedades, entre otras cosas.

La Epigenética reinterpreta conceptos conocidos y desvela nuevos mecanismos por los cuales la información contenida en el ADN de cada individuo es traducida y expresada. Concepto a concepto, se está descifrando un nuevo lenguaje del genoma e introduciendo la noción de que nuestras propias experiencias pueden marcar nuestro material genético, de una forma hasta ahora desconocida y que estas marcas pueden ser transmitidas a generaciones futuras.

Hasta hoy, se han podido discernir mecanismos epigenéticos en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos que incluyen, por ejemplo, varios tipos de cáncer, patologías cardiovasculares, neurológicas, reproductivas e inmunes, entre otros.

Por ello, a lo largo de mi discurso, abordaré, en primer lugar, la regulación epigenética que, hasta el momento, se sabe está condicionada por la metilación del ADN, la modificación de histonas y los ARN no codificantes, constituyendo los mecanismos de regulación epigenética que contribuyen al llamado epigenoma.

La distribución de ADN metilado, las modificaciones de las histonas y la expresión de los RNA no codificantes, no sólo pueden ser específicas para un organismo particular, sino también, para un tejido o, incluso, para un tipo de célula particular.

Por lo cual, como se ha demostrado, el epigenoma no es estático, sino que puede ser dinámico; está influenciado por factores ambientales y estímulos extracelulares y puede cambiar de acuerdo con la respuesta a todos estos factores.

Describiré los vínculos que se han establecido entre la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas y la influencia recíproca establecida entre ambos mecanismos en los mamíferos durante el desarrollo embrionario y la aparición del cáncer; igualmente indicaré que las variaciones epigenéticas controlan la actividad de los genes por lo que, en el

futuro, la comprensión de su contribución a esa regulación dará una mayor comprensión y resolución de las patologías.

Expondré qué es y cómo se manifiesta la impronta genética y también los efectos dependientes de la temperatura, de la nutrición y del estrés, así como la detección de marcas en generaciones muy posteriores a los individuos que han sufrido esos efectos.

Citaré la influencia de la presencia de predadores de otras especies y de conespecíficos y resaltaré la importancia que está adquiriendo la identificación de biomarcadores epigenéticos para detectar modificaciones epigenéticas en la activación o inactivación de un gen.

Y terminaré mi discurso mostrando algunos de los últimos avances en el conocimiento del proceso de metilación del ADN, de la modificación de histonas y de los ARN no codificantes, en el diagnóstico y terapia de enfermedades tan agresivas como el cáncer y otras; es decir los últimos conocimientos que sobre Epigenética se han obtenido.

DISCURSO

I. Definición y conceptos básicos

La Epigenética (del griego *epi*, *en* o *sobre*, y *-genética*) hace referencia al estudio de todos aquellos factores no propiamente genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia o desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su senescencia, pasando por la forma adulta. Estos factores epigenéticos están afectando a la regulación heredable de la expresión génica sin que se hayan producido cambios en la secuencia de nucleótidos de la molécula orgánica, el ADN o el ARN, dependiendo de cual sea la secuencia nucleotídica que constituya el material genético en el organismo.

Se puede decir que la Epigenética es el conjunto de reacciones químicas y demás procesos que modifican la actividad del ácido nucleico, pero sin alterar su secuencia, definiendo el fenotipo del organismo.

El término fue acuñado por Conrad Hal Waddington en 1942, para referirse al estudio de las interacciones entre genes y ambiente que se producen en los organismos. (Waddington, 1939 y 1942; Berger et al. 2009).

En el año 2003, tras la finalización del Proyecto Genoma Humano y de su publicación en la revista científica Nature, en octubre de 2004, se pudo comprobar que hay mucho más, de lo que hasta entonces se pensaba, en las bases moleculares del ADN que está influenciando el funcionamiento celular, el desarrollo, el envejecimiento y muchas enfermedades. La idea que se tenía de que los seres humanos y los demás organismos vivos éramos tan sólo lo que está escrito en nuestros genes desde la concepción, cambió. No es solo el concepto un gen una enzima, ya que en el genoma y en la información genética, en general, hay expresiones suplementarias que hacen que se codifiquen pequeñas modificaciones químicas capaces de regular la expresión de multitud de genes. Y la Ciencia avanza para lograr descifrar este lenguaje.

Es cierto que como dice Aristóteles, el gran sabio de la Antigüedad: *“Nunca se alcanza la verdad total, ni nunca se está totalmente alejado de ella”*, sabemos que no se va a alcanzar la verdad total, pero estamos seguros de que la Ciencia avanza y que se logrará un conocimiento más profundo que dará respuesta a estos interrogantes.

La Epigenética reinterpreta conceptos conocidos y desvela nuevos mecanismos por los cuales la información contenida en el ADN de cada individuo es traducida y expresada. Concepto a concepto, se está descifrando un nuevo lenguaje del genoma y se está introduciendo la noción

de que nuestras propias experiencias pueden marcar nuestro material genético, de una forma hasta ahora desconocida y estas marcas pueden ser transmitidas a generaciones futuras. Hasta hoy, se han podido discernir mecanismos epigenéticos en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos que incluyen desde varios tipos de cáncer, patologías cardiovasculares, neurológicas, reproductivas e inmunes, y hasta manifestaciones anómalas en la tercera o cuarta generación de descendientes de eventos como la hambruna o el estrés sufridos por sus ancestros, sin haberse producido modificaciones en su ADN.

Se sabe que la expresión génica puede presentar diferentes perfiles, debido a la información contenida en los mismos genes, pero también como respuesta a factores no genéticos (epigenéticos), como los factores ambientales y otros. Estos últimos cambios pueden permanecer estables durante muchas generaciones celulares.

Estudios realizados con gemelos monocigóticos han determinado discrepancia en la prevalencia de muchas enfermedades (Bell and Spector, 2011).

Existe una variación en los riesgos de sufrir diferentes enfermedades metabólicas dependiendo de la localización geográfica y la etnia (Wallace, 2010).

De todos los componentes ambientales o tóxicos que están relacionados con la aparición de enfermedades, muy pocos tienen la capacidad de alterar la secuencia del ADN o provocar mutaciones. En términos de biología evolutiva, la mutación al azar no es suficiente para explicar el origen de fenotipos tan diversos.

Desde el inicio de los tiempos, el criador sabe que en los animales que tienen una mayor producción de carne o de leche, o de otros caracteres, ello no se debe solamente a que procedan de progenitores que produjeron más, sino que son necesarios, también, otros factores como la alimentación, la higiene, la sanidad, entre otros, para que produzcan mejores rendimientos. O el agricultor, que sabe que las mejores semillas, para que den un mejor rendimiento, no necesitan tan solo que provengan de los cultivos mejores, sino que, además, requieren de un buen terreno bien abonado o de una climatología favorable. Y hechos como los diferentes patrones de expresión génica que se dan en los diferentes tipos de células de un organismo, aunque cada una de éstas comparta el mismo ADN o el hecho que se está observando acerca de padecimientos de hambruna o de estrés, o de otras limitaciones sufridas en generaciones anteriores, que se están manifestando en terceras y cuartas generaciones, aunque no estén escritas en la secuencia del ADN. Estas consideraciones y muchas otras más han estado siempre presentes.

Esto es lo que estudia la Epigenética: la actividad diferente de los genes que puede ser estable durante largos períodos de tiempo, que persiste a través de muchas divisiones celulares, e incluso que se hereda a través de varias generaciones, sin que por ello haya ningún cambio en la secuencia del ADN (Roloff y Nuber 2005; Gurdon 2008; Probst et al. 2009; Ng et al. 2010; Ng et al. 2014).

La Epigenética estudia las modificaciones en la expresión de los genes que no obedecen a una alteración de la secuencia del ADN y que son heredables, estudia cómo interactúan los genes y qué factores externos influyen para que se dé una expresión diferente en unas células y otras.

En los últimos años se está realizando un gran esfuerzo por comprender fenómenos que aparentemente no obedecían a principios genéticos conocidos. Así, los estudios sobre la denominada variegación por efecto posicional en *Drosophila* llevaron a la conclusión de que cambios en la localización cromosómica de un gen, sin afectar a su secuencia, pueden determinar si dicho gen se expresará o no. Otro ejemplo enigmático es la impronta genómica, que da lugar a que en algunos genes se silencie la copia paterna (o la materna, en otros casos). Un fenómeno similar, aunque a mayor escala, causa el silenciamiento aleatorio de uno de los dos cromosomas X durante el desarrollo embrionario en hembras de mamíferos, para asegurar así un mismo nivel de expresión génica en ambos sexos. Se sabe ahora que la causa molecular de éstos y otros fenómenos epigenéticos reside en modificaciones químicas del ADN, de las proteínas histonas estrechamente unidas a él para formar la cromatina y de los ARNs no codificantes. Tales modificaciones reciben el nombre de **marcas epigenéticas**, y se ha propuesto que constituyen una capa adicional de información (el **epigenoma**) superpuesta a la secuencia de nucleótidos que es lo que se denomina el **genoma** (Roldán 2010).

El término "epigenética" tiene diversos significados dependiendo de la disciplina biológica a que se refiera.

Así en Genética del Desarrollo, hace referencia a los mecanismos de regulación genética que no implican cambios en la secuencias del ADN.

En Biología del Desarrollo, hace referencia a la dependencia contextual de los procesos embriológicos. El contexto incluye factores epigenéticos tanto internos (materiales maternos, propiedades genéricas físicas y autoorganizativas de las células y los tejidos, procesos de regulación genética, dinámica celular y tisular) como externos (temperatura, humedad, luz, radiación, etc.).

En Biología Evolutiva, la denominación herencia epigenética engloba a los mecanismos de herencia no genéticos.

En Genética de Poblaciones se emplea la expresión variación epigenética para denominar a la variación fenotípica que resulta de diferentes condiciones ambientales (norma de reacción). Los cambios epigenéticos son cambios reversibles del ADN que hacen que unos genes se expresen o no dependiendo de condiciones externas (*polifenismo*).

Una de las fuentes de mayores modificaciones de los genes es el factor ambiental y puede afectar a uno o varios genes con múltiples funciones.

Por medio de la regulación epigenética se puede observar cómo es la adaptación al medio ambiente dada por la plasticidad del genoma, la cual tiene como resultado la formación de distintos fenotipos según el medio ambiente al que sea expuesto el organismo.

Estas modificaciones presentan un alto grado de estabilidad y, al ser heredables, se pueden mantener en un linaje celular a lo largo de muchas generaciones. Esto es importante ya que cuando hay errores en las modificaciones se pueden generar enfermedades que perduren en una familia durante mucho tiempo.

El interés por la Epigenética ha crecido de forma exponencial en esta última década. Las principales bases de datos existentes ya registran más de 278 libros que tratan el tema, de los cuales 26 han sido publicados en el presente año 2015; más de 5.000 artículos publicados igualmente en este año 2015, y se han establecido más de 135 de las llamadas colecciones acerca de Epigenética. Una colección es el conjunto de descripciones realizadas por los laboratorios, con los resultados de pruebas y búsquedas de marcas epigenéticas en los diversos órganos o tejidos. En concreto, en la base de datos internacional del GenBank se estableció una división especializada en estas colecciones, denominada Epigenomics MyCollection, en la que figuran datos acerca de las marcas de metilación del ADN en 5 especies: *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. (NCBI 2015).

Merece destacarse el Proyecto Roadmap Epigenomics en el que se han recopilado más de 3.438 datos de lugares de metilación del ADN en humanos. Se ha establecido una base de datos donde se puede localizar un gen sobre el cromosoma correspondiente y el lugar de metilación u otro mecanismo epigenético (<http://www.roadmapepigenomics.org>). Para facilitar la difusión de los datos del Proyecto, se han creado varios recursos basados en la web, como la página de referencia del Consorcio del Mapa Epigenómico, la base de datos Epigenoma NCBI, la página de datos NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) Atlas Humano

del epigenoma, y la Hoja de Ruta de visualización del Proyecto. Si bien el objetivo general de estos recursos es el mismo, hay algunas diferencias con respecto a las funciones disponibles (Epigenomics Help 2014).

Esta proliferación de trabajos y publicaciones traerá consigo una ampliación todavía mayor en un futuro próximo, que contribuirá a un mayor conocimiento de lo que la Epigenética representa en el control y regulación de la actividad de los genes. El desarrollo y conocimiento del genoma y del epigenoma corren paralelos en este gran campo de la Ciencia y ponen cada día nuevos retos y nuevos objetivos a conquistar.

A continuación, se describen algunos conceptos básicos para comprender mejor el origen y modo de actuación de los factores epigenéticos en el genoma de los diferentes organismos.

I. 1.- Componentes principales del gen.

I. 1. 1.- El ADN. Es la llamada “molécula de la vida”, y es el principal componente del material hereditario. El modelo de la doble hélice de ADN que Watson y Crick propusieron en 1953, consta de dos moléculas de polinucleótidos (hebras) de 2 nm de diámetro, que se disponen de forma antiparalela en direcciones (5' - 3' y 3' - 5'), consta, además, de un esqueleto de azúcar-fosfato fuera de la hélice y de cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) dentro de la hélice. Las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno (débiles) y apareadas de forma complementaria (A con T y C con G). Figuras 2 y 3.

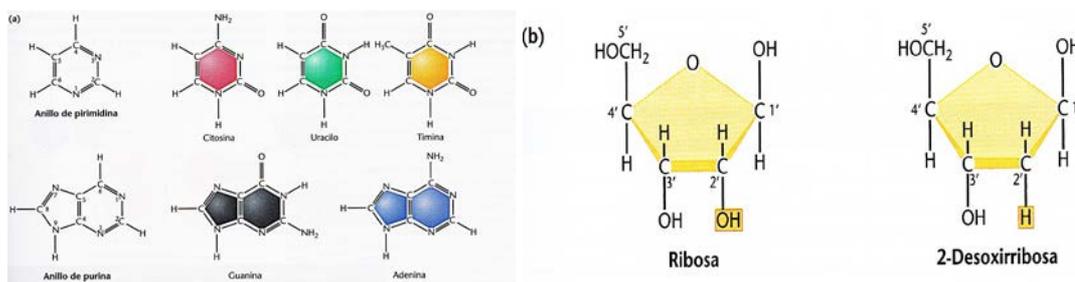


Figura 2.- (a) Estructura química de las bases purinas y pirimidinas que sirven de base nitrogenada en el ADN y ARN y (b) estructura química anular de la ribosa y de la 2-desoxirribosa, que sirven de azúcar en el ARN y ADN respectivamente.

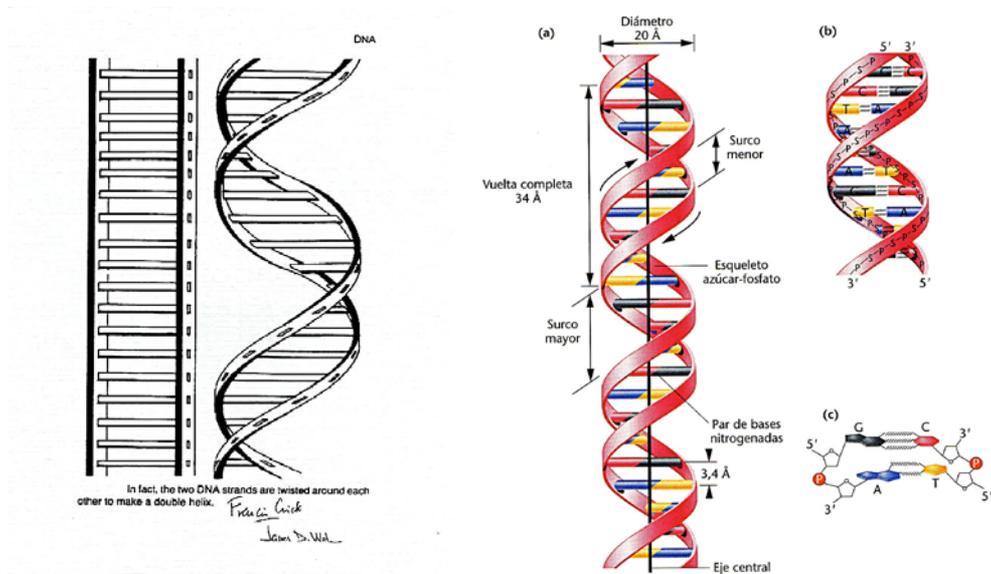


Figura 3.- A la izquierda la doble hélice del ADN propuesta por Watson y Crick (1953) y a la derecha la doble hélice (forma B) esquematizada indicando en (a) el eje, el diámetro, la longitud de los surcos, la distancia entre las bases nitrogenadas, en (b) el emparejamiento entre las bases y su complementariedad, unidas por puentes de hidrógeno A: Adenina unida a T: timina y C: citosina unida a G: guanina y en (c) representación del carácter antiparalelo de la hélice, la disposición de las bases y el azúcar (desoxirribosa) fosfato (P).

I. 1. 2.- Las proteínas histonas y su empaquetamiento con el ADN.

Otro componente son las proteínas histonas. El ADN envuelve a las proteínas histonas formando un complejo de nucleoproteína llamado **nucleosoma**. El nucleosoma mide 6 nm y está constituido por un octámero de histonas en el que hay dos subunidades de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de las que sobresale un extremo amino, que permite la unión de otras proteínas para las funciones de transcripción, de replicación y de reparación. Está compuesto, además, por una histona H1 que se coloca en el exterior del octámero. Figura 4.

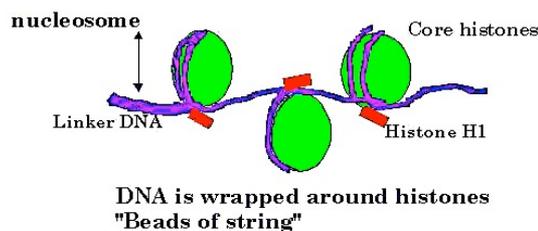


Figura 4.- En el nucleosoma el ADN se coloca alrededor de las histonas.

La nucleoproteína constituye entre el 60 - 90% de un cromosoma y representa la base molecular fundamental de la estructura del cromosoma. El análisis químico de la nucleoproteína da una relación de 1: 1 entre el ADN aislado y la histona.

En los cromosomas aislados (metafase) aproximadamente el 15% es ADN, el 12% ARN y el 70% son proteínas (Bird 2002).

Los cromosomas pueden contener, además, una proteína no histónica adicional. Y suele haber ARN, probablemente transitorio como producto de la transcripción.

Las histonas experimentan una fuerte interacción básica, con el ADN ácido.

Alrededor de este octámero se coloca la molécula de ADN con dos vueltas (140 pares de bases aproximadamente). El espaciamiento entre las cuentas es lo que se llama ADN puente o ADN de unión y suele comprender unos 60 pares de bases. Este ADN puente o “linker” interacciona directamente con la histona H1. Figura 5.

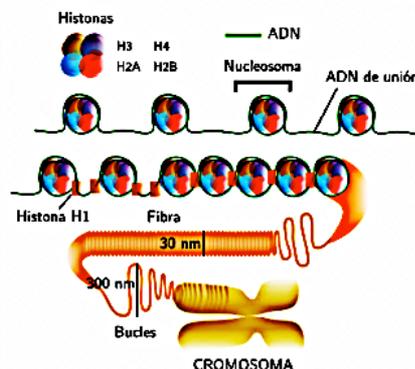


Figura 5.- Imagen en la que se observan los múltiples niveles de embalaje del ADN con las histonas: El nucleosoma es el octámero de histonas más el ADN: 166 nucleótidos del ADN, más 2H2A, más 2H2B, más 2H3, más 2H4 (el octámero de histonas). Los nucleosomas están unidos por el ADN enlazador o ADN “puente” y la histona H1, para formar la fibra de cromatina como si fueran las "cuentas de un collar".

La acción electrostática, entre la carga positiva de la histona y los fosfatos negativos del ADN, es la fuerza estabilizadora en el mantenimiento de la cromatina,

ya que el ADN es un polianión mientras que las histonas son proteínas básicas, por

lo que la asociación del ADN alrededor de estas proteínas es de carácter iónico, sin que

existan enlaces químicos entre ambos tipos de moléculas.

A su vez, el nucleosoma, que posee una histona H1, se pliega en una conformación que se supone en zigzag (pero también se piensa que en helicoides o con interacciones cruzadas) interaccionando con otros nucleosomas mediante contactos entre sus moléculas H1, formando **el solenoide**, fibra de 30 nm de espesor. Las histonas H1 se disponen de manera que forman el eje central sobre el que se sitúan los nucleosomas. Por cada vuelta de la espiral hay seis nucleosomas. Figura 6. (Bird 2002).

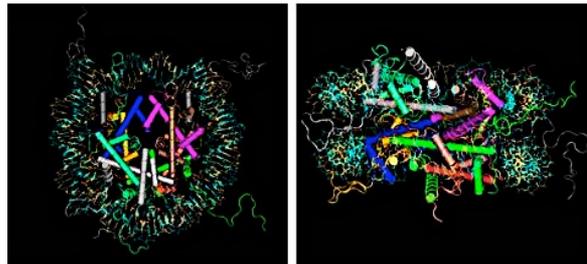


Figura 6.- El bloque de construcción de la cromatina: el nucleosoma se compone de un octámero de proteínas histonas que se envuelve por 166 pares de bases de ADN, Cuando los nucleosomas interactúan entre ellos, merced a las histonas H1 que los unen, constituyen una fibra de 30 nm denominada solenoide.

El solenoide, a su vez, se enrolla en bucles de 300 nm. Si se eliminan las histonas del cromosoma en la metafase mitótica se puede ver que los cromosomas tienen un esqueleto central densamente teñido. Desde este esqueleto se proyectan lazos de ADN que comienzan y acaban en el esqueleto. Este esqueleto central llamado **andamio** está compuesto por proteínas no histónicas, como la enzima topoisomerasa II (también llamada condensina) que enlazan o separan nudos o lazos en una cadena, y también por proteínas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes o mantenimiento de la estructura del cromosoma). En este esqueleto hay regiones especiales llamadas zonas SAR (**Scaffold Attachment Region o Regiones de Unión al Andamio**) que son zonas de la fibra de 30 nm muy ricas en amina y timina que se unen al andamio, dando lugar a la fibra de 300 nm. El empaquetamiento en este punto es de 2.000 veces la hebra de ADN.

El andamio en metafase consiste en una densa red de fibras o hilos de ADN que emanan del andamio como bucles de media longitud (30-90 kb). Figura 7. El andamio se parece a un par de cromátidas hermanas. Andamios hermanos están generalmente bien conectados, aunque a

veces por separado y se unen por sólo unas pocas fibras. Posiblemente son las estructuras responsables de mantener la forma de los cromosomas mitóticos.

En los sitios de unión del ADN con el andamio se encuentran genes MAR (región de unión de matriz) por lo general contienen un sitio de reconocimiento para la topoisomerasa II (implicada en la regulación de la transcripción).

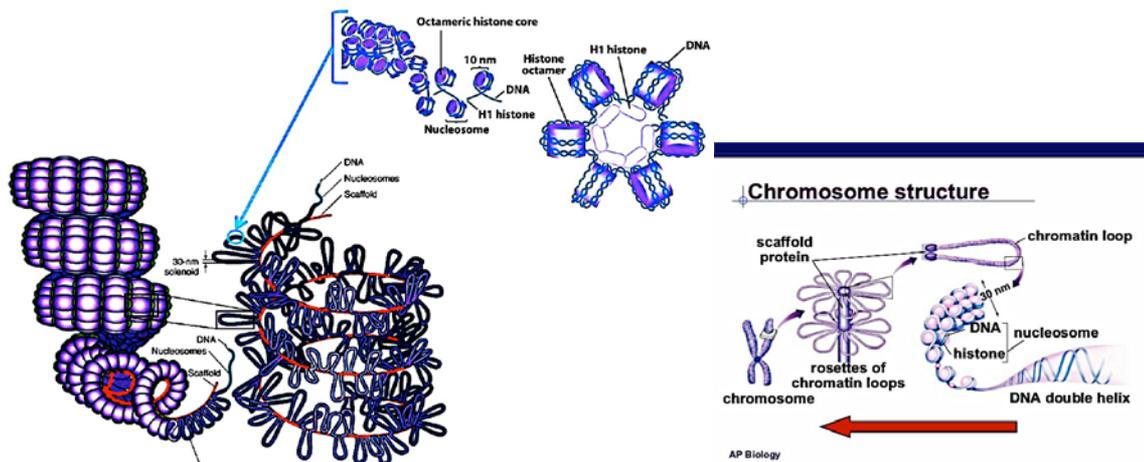


Figura 7.- A la izquierda una representación del conjunto ADN más las proteínas histonas cuando ambos se organizan para dar lugar a la fibra de cromatina cada vez más condensada, constituyendo los nucleosomas (6 nm), los solenoides (30 nm) y la fibra de 300 nm. A la derecha, una imagen que clarifica la estructura de los bucles de cromatina y de las zonas SAR.

La fibra de 300 nm se pliega sobre sí misma formando una espiral y empaquetando el ADN hasta 10.000 veces dando lugar a la cromátida que cuando se produce la fase de síntesis del ADN en el ciclo de reproducción celular, da lugar a la cromátida hermana y con ella, al cromosoma metafásico. La unión de las dos cromátidas hermanas se produce a través de las condensinas.

En la actividad cromosómica se encuentran los genes codificadores de proteínas, que se conocen como los únicos depósitos de la herencia, pero también se encuentran los genes no codificadores que dan lugar a cadenas activas del ARN, las mismas que alteran el comportamiento de los genes codificadores y la información epigenética. Esta última información resulta crucial para el desarrollo, el crecimiento, el envejecimiento y el cáncer, entre otros acontecimientos. No altera la secuencia del ADN aunque influye en su expresión. Los mecanismos epigenéticos pueden integrar señales genómicas y ambientales para controlar

el desarrollo de un fenotipo particular, por lo que están íntimamente ligados con la plasticidad fenotípica y la salud.

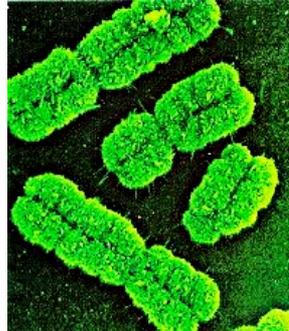


Figura 8.- Estructura de cromosomas eucarióticos en metafase.

Se sabe que en los organismos procariontes, los genes que codifican enzimas que tienen funciones relacionadas, por ejemplo los genes implicados en el metabolismo de la lactosa, están estrechamente ligados entre sí y, con frecuencia, se encuentran bajo el control genético coordinado de una única unidad reguladora. Esta unidad, suele estar localizada en lo que se llama comúnmente, corriente arriba del grupo génico que controla y se llama **sitio de actuación en cis**.

Las interacciones en este sitio implican la unión de moléculas que controlan la transcripción o lo que es lo mismo, la síntesis del ARN a partir del ADN, del grupo génico en cuestión. Estas moléculas se denominan **elementos de actuación en trans**. Las interacciones en los sitios de regulación determinan el que los genes se expresen o no. La unión de un elemento de actuación en *trans* a un sitio de actuación en *cis* puede regular el grupo génico tanto de forma negativa, desconectando los genes, como de forma positiva, conectando los genes del grupo.

El descubrimiento de que el gen regulador y el sitio de regulación forman parte del grupo génico tuvo una importancia capital para entender cómo se controla la expresión génica en este sistema (Klug 2006). En la figura 9, se observa cómo son necesarios varios genes, cada uno con su función específica, desde los genes estructurales, que llevan la información para la síntesis de la enzima, hasta los genes reguladores y represores, para que pueda realizarse la regulación genética.

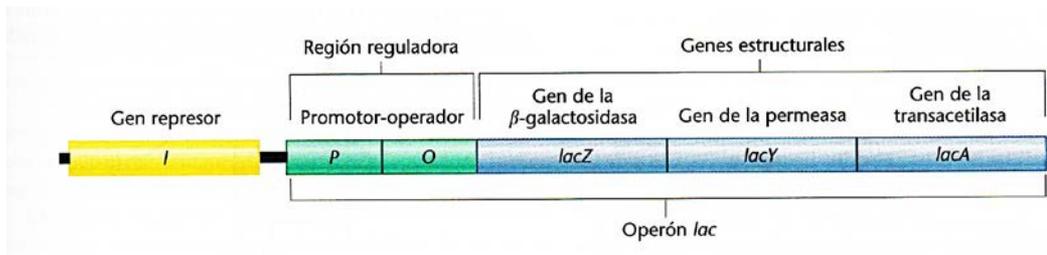


Figura 9.- Resumen simplificado que sirve de ejemplo de la conformación de un grupo génico y de las unidades reguladoras implicadas en el control, en este caso, del metabolismo de la lactosa en organismos procariontes.

I. 2.- ¿Qué es la impronta genética?

Cada copia de un gen contiene una instrucción individual y específica para una tarea particular que se lleva a cabo en las células del cuerpo. Hay dos copias de cada gen, una recibida de la madre y otra del padre. Tanto los genes maternos como los paternos están habitualmente activos o expresados, sin embargo, un pequeño número de los aproximadamente 20.000 genes que se supone poseemos los humanos, va a actuar o no dependiendo si la copia del gen ha venido del padre o de la madre. Este proceso, en el que la expresión de una copia del gen se altera dependiendo de que proceda del óvulo o del esperma, se llama imprinting o impronta genética; y se refiere al hecho de que algunos cromosomas, o segmentos de cromosomas, o algunos genes, se marcan con una "memoria" dependiendo del progenitor del que se ha recibido. Esta expresión del gen se denomina "matriz de efectos origen" y fue descrita por Helen Crouse en 1960.

A pesar de que tanto la impronta, como una mutación en un gen pueden modificar el producto del gen, mientras una mutación cambia la información codificada en el gen de forma permanente, el imprinting es reversible en la siguiente generación. Los procesos de metilación del ADN juegan un papel importante en la acción de la impronta genómica. Según el origen parental los genes pueden ser activados o silenciados. La impronta afecta al crecimiento prenatal y se ha establecido su importancia en la generación de enfermedades. Durante la gametogénesis se inicia la impronta genómica y por lo tanto ésta es heredada durante la fusión de los gametos. Durante la formación del cigoto la impronta es reprogramada en el nuevo individuo.

El ejemplo más claro de este mecanismo se da en la regulación de la dosis compensatoria del cromosoma X en las hembras de los mamíferos. Esta reprogramación juega un papel importante en la expresión de los genes de tejidos específicos que si llegan a ser modificados

pueden tener consecuencias en el desarrollo adecuado del organismo. Por lo tanto, con un mejor entendimiento de cómo ocurren estos procesos y cómo son regulados, se puede llegar a entender enfermedades como la preeclampsia, las pérdidas durante la gestación, los fallos que se dan en la reproducción, etc.

II.- La Epigénesis

La Epigénesis es un proceso celular normal que regula la expresión de los genes de forma que la célula disponga de las proteínas que necesite de acuerdo con el tejido en que se encuentre y la función que deba realizar en cada momento. Tanto la regulación como las marcas epigenéticas se producen merced a los siguientes mecanismos:

- 1.- La metilación del ADN
- 2.- Las modificación de histonas
- 3.- Los RNAs no codificantes

II. 1.- La metilación del ADN

Uno de los mecanismos moleculares mejor conocido es el de la metilación de residuos de citosina en posiciones específicas en la molécula del ADN (Bestor 2000; Bird 2002).

Las enzimas que llevan a cabo la reacción de metilación están bien caracterizadas (Okano et al. 1999), así como el mecanismo por el que la configuración de las posiciones metiladas se propaga a través de la replicación del ADN (Groth et al. 2007).

La consecuencia típica de la metilación en una región genómica es la represión de los genes cercanos (Bird 2002).

La metilación del ADN es una marca epigenética heredable que implica la transferencia covalente de un grupo metilo en la posición C-5 del anillo de citosina del ADN por las ADN metiltransferasas (DNMTs), dando lugar a la 5 metilcitosina (5mC); el grupo donador es el llamado S-adenosil-L-metionina SAM (Jin et al. 2011). Figura 10.

En organismos superiores, un grupo metilo se le añade a la citosina permitiendo la conformación cerrada de la cromatina. Por lo tanto un alto grado de metilación se asocia con el silenciamiento de genes. Una forma de controlar el grado de metilación es mediante la acción de efectos ambientales.

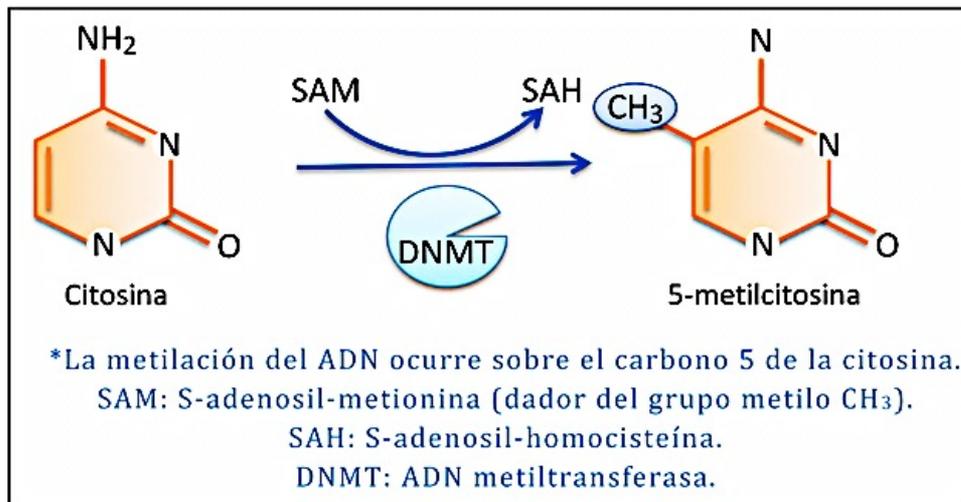


Figura 10.- Imagen en la que se observa la formación de la metilación del ADN, transformando la citosina en 5-metilcitosina.

En los mamíferos se ha visto que la metionina, la colina, el ácido fólico y las piridoxinas (que son sustancias provenientes de la dieta) tienen como función la adición de grupos metilo. Por lo general, la metilación se da en mayor grado en las **islas CpG** que son regiones ricas en CG, con altas concentraciones de citosina y guanina de forma tal que una citosina está situada a continuación de una guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de la cadena del ADN. CpG es la abreviatura de "-C-fosfato-G-", es decir, citosina y guanina separados por sólo un fosfato; el fosfato une longitudinalmente cualquiera de los dos nucleósidos en la hebra de ADN. La anotación se utiliza para distinguir esta secuencia lineal de lo que es el apareamiento de bases CG de la citosina y guanina que unen transversalmente las dos hebras complementarias. Las islas CpG suelen formar parte de la región promotora de los genes y cuando están localizadas dentro de las secuencias del gen se denominan **CpGI**. (Bird 2002).

Para que la metilación se produzca de forma adecuada es necesaria la presencia de la enzima **ADN metiltransferasa**, que se encarga de establecer y mantener los patrones de metilación y de las **proteínas de unión metil-CpG** que están involucradas en hacer las marcas epigenéticas de metilación. También hay evidencia de que una **ADN metilasa** contribuye a regular los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario, aunque se desconoce su modo de acción (Mayer et al. 2000).

La metilación del ADN se produce en las citosinas en cualquier contexto del genoma de los mamíferos. Pero en las células somáticas, alrededor de un 98% de la metilación del ADN, se

produce en un contexto CpG. En las células madre embrionarias (ESCs) un 25 % de toda la metilación aparece en un contexto no CpG. (Bird 2002; Chatterjee y Eccles 2015).

La metilación del ADN se elimina normalmente durante la formación del cigoto y luego es reestablecida en el embrión aproximadamente en el momento de la implantación.

Actualmente se sabe que existen dos tipos de metilación, la metilación de mantenimiento y la *de novo*. Mientras que la metilación de mantenimiento reconoce hemimetilaciones (metilaciones en sólo una hebra del ADN) y metila la hebra complementaria, la metilación *de novo* metila regiones CpG que no estaban metiladas previamente. Básicamente, la metilación de mantenimiento lo que hace es "perpetuar" la metilación durante la división celular (participando en la impronta genética) y la *de novo* metila genes concretos para silenciarlos en momentos determinados de la función celular.

La mayor parte de la metilación del ADN es esencial para el desarrollo normal, y juega un papel muy importante en una serie de procesos clave, como la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X en las hembras de los mamíferos y la supresión de la transcripción de elementos repetitivos y de la transposición. Cuando esta metilación del ADN se desregula contribuye a la aparición de enfermedades como el cáncer.

La metilación del ADN en los mamíferos está regulada por una familia de enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs): DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L (Bestor et al. 1988; Bestor 2000; Bird 2002; Chatterjee y Eccles 2015).

Aunque otras clasificaciones han sido hechas de acuerdo con el sustrato sobre el que actúan, como en el caso de las **m6A** que dan lugar a la N6-metiladenina, las **m4C** que generan N4-metilcitosina y las **m5C** que dan lugar a la C5-metilcitosina (Cheng 1993); por estar mejor conocidas las ADN metiltransferasas en los mamíferos, la primera clasificación es la que se utiliza, más comúnmente.

Las DNMT1 metilan preferentemente el ADN hemimetilado *in vitro* y se localizan en la replicación durante la fase S. Como tal, la metiltransferasa de mantenimiento es responsable de copiar los patrones de metilación del ADN a las cadenas hijas durante la replicación del ADN. En modelos de ratón con ambos alelos *Dnmt1* delecionados se ha visto que se produce letalidad en los embriones, aproximadamente, sobre el día 9 (E9) (Jin et al. 2011).

Las DNMT2 son metiltransferasas homólogas que metilan la citosina-38 en el bucle anticodón del ARN de transferencia del ácido aspártico, en lugar de metilar el ADN (Goll et al. 2006).

Las DNMT3A y DNMT3B, en contraste con las DNMT1s, tienen preferencia por los dinucleótidos CpG no metilados y llevan a cabo **la metilación de novo** durante el desarrollo embrionario. Los ratones que carecen de *Dnmt3a* mueren al cabo de las 4 semanas de edad (Jin et al. 2011)

Las DNMT3L presentan homología con las DNMT3A y DNMT3B, ayudan a las metiltransferasas *de novo* aumentando su capacidad de unirse al grupo metilo donador, (S-adenosil-L-metionina, SAM) y estimulan su actividad *in vivo*. No obstante, la DNMT3L no tiene en sí actividad catalítica. Los ratones homocigóticos nulos para *Dnmt3L* son viables, mientras que los embriones heterocigóticos derivados de ovocitos homocigóticos, sin *Dnmt3L*, mueren alrededor de E9 y muestran deterioro en el imprinting de metilación materna y expresión bialélica de genes imprintados normalmente expresados sólo desde el alelo de origen paterno (Jin et al. 2011).

La cooperación entre las diferentes DNMTs también se requiere en la metilación de algunas regiones del genoma, en particular en elementos repetitivos. Como se ha mencionado anteriormente, ha sido ampliamente descrito que las DNMT1 actúan principalmente como metiltransferasas de "mantenimiento" durante la síntesis del ADN y que las DNMT3A y DNMT3B actúan como enzimas *de novo* en el desarrollo embrionario, sin embargo, la evidencia indica que las DNMT1 también pueden ser necesarias para la metilación *de novo* del ADN genómico y que las DNMT3A y DNMT3B contribuyen a la metilación de mantenimiento durante la replicación.

En los mamíferos, la mayoría de los dinucleótidos CG están metilados, pero si están dentro de los promotores tienden a estar protegidos de la metilación.

Los **defectos en la metilación del ADN** están estrechamente relacionados con el cáncer, aunque ninguna mutación o deficiencia en cualquiera de las DNMTs ha sido identificada como causalmente vinculada al desarrollo de tumores, lo más probable por su papel crítico durante la embriogénesis.

La mayor parte de la metilación del ADN es esencial para el desarrollo normal, y juega un papel muy importante en una serie de procesos clave, como la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X de las hembras de los mamíferos y la supresión de la transcripción de elementos repetitivos.

Los llamados **factores de transcripción** se unen al ADN reconociendo la secuencia de bases en la región promotora del gen, cuando se va a sintetizar el ARN mensajero y eligen esas secuencias para la activación o la represión, es decir para que la transcripción se produzca, o

no, y por consiguiente el ARN mensajero. La interacción de estos factores con las secuencias afines desencadena una serie de acontecimientos en los cuales, a veces, se producen cambios en la estructura de la cromatina. Sin embargo estos tipos de factores de transcripción no son suficientes para definir la compleja actividad de los genes, ni tampoco para explicar por qué se expresan unos genes en unas células y en otras no.

Ya se conocen algunas **marcas de diferenciación** muy estables, de forma que aunque se introduzca el núcleo en un citoplasma extraño, no se borran de la memoria. Estas marcas es muy poco probable que sean debidas a mutaciones somáticas generalizadas sino que, más bien, lo sean a mecanismos epigenéticos. Como indicaron Russo et al. (1996) y Bird (2002), estos mecanismos son los cambios heredables en la función de los genes que no se pueden explicar por cambios en la secuencia del ADN.

Un requisito previo para la comprensión de la función de la metilación del ADN es el conocimiento de su distribución en el genoma. En los animales el espectro de los niveles de metilación es muy amplio: por ejemplo, en el gusano *Caenorhabditis elegans* es el más bajo de los que se conocen y su genoma no codifica para una ADN metiltransferasa convencional (Bird 2002). Otro invertebrado, *Drosophila melanogaster*, tiene un gen para la ADN metiltransferasa y también se han detectado niveles muy bajos (Lyko et al. 2000), no obstante tiene el dinucleótido CpT, en lugar de CpG que es el principal objetivo de la metilación en los animales. La mayor parte de los genomas de otros invertebrados tienen niveles moderadamente altos que están concentrados en grandes dominios de ADN metilado separados por dominios equivalentes de ADN no metilado.

En el extremo opuesto están los genomas de los vertebrados, los cuales tienen los niveles más altos en todo el Reino Animal. La metilación del ADN está dispersa por todo el genoma, dando lugar al término conocido como **metilación global**.

Los patrones de metilación del ADN en los mamíferos varían en el espacio y en el tiempo. En las células somáticas humanas, representa aproximadamente el 1% del total de bases de ADN y, por tanto, afecta entre un 70% -80% de todos los dinucleótidos CpG en el genoma (Bird 2002).

Aunque la metilación se elimina durante la formación del cigoto y luego se restablece en el embrión en el momento de la implantación, en el ratón esta metilación declina de forma patente, representando tan solo un 30 % con respecto al nivel del adulto (Kafri et al. 1992).

Un descenso menor se da en la rana *Xenopus laevis* (Stancheva y Meehan 2000) y ningún descenso se ha observado en el pez cebra, *Danio rerio* (MacLeod et al. 1999). Incluso dentro

de los vertebrados, la variación entre especies podría reflejar diferencias en el papel desempeñado por la metilación en estos organismos. Sin embargo, en ratones y, probablemente, en otros mamíferos, el ciclo de desmetilación en el cigoto, seguido de una metilación *de novo*, es crítico en la determinación de los patrones de metilación del ADN.

Una reducción en la metilación a escala del genoma también se ha visto en células germinales primordiales (Tada et al. 1997; Reik et al. 2001) durante la fase proliferativa de las oogonias y de las espermatogonias.

La característica más llamativa de los **patrones de la metilación del ADN** de vertebrados es la presencia de islas CpG. Un análisis masivo de la secuencia del genoma humano predijo 29.000 islas CpG (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001).

Una proporción pequeña pero significativa de todas las islas CpG está metilada durante el desarrollo embrionario, y cuando esto sucede, el promotor asociado está silenciado de forma estable. La impronta genómica y la inactivación del cromosoma X de las hembras de los mamíferos son ejemplo de este tipo de metilación de las islas CpG.

La metilación *de novo* se produce en las células germinales y en las fases tempranas del desarrollo embrionario (Jaenisch et al. 1982), lo que sugiere que la metilación *de novo* es particularmente activa en estas etapas. Aunque también, la metilación *de novo* puede ocurrir en células somáticas de adultos.

Una fracción significativa de islas CpG humanas es propensa a la metilación progresiva en ciertos tejidos durante el envejecimiento (Issa 2000), o en células anómalas como en el cáncer (Serman et al. 2014; Ohgami y Arber 2015) y en líneas celulares permanentes.

II. 1. 1.- ¿ Qué relación tiene la impronta genética con la metilación del ADN?

La impronta de genes hace referencia a que una de las copias del gen que se hereda de los padres (puede ser tanto la copia materna o paterna), puede encontrarse completamente silenciada con el fin de tener una expresión monoalélica de ciertos genes. Por lo tanto, se observará un patrón de metilación correspondiente al sexo.

Si existen anomalías en el silenciamiento de ciertas copias se pueden dar cambios en el fenotipo que pueden ser resultado de enfermedades como es el caso del síndrome de Beckwith Wiedemann. Este síndrome se da cuando las dos copias del gen *IGF2* están activas, es decir el proceso de impronta genética no se dio de forma adecuada al no silenciar la copia materna, y por lo tanto el individuo se caracteriza por la presencia de un alto número de tumores de gran tamaño.

Se sabe que un alto índice de metilación de genes reguladores del ciclo celular y de reparadores del ADN produce una mayor frecuencia de formación de tumores cancerígenos. De igual forma, cuando hay un bajo nivel de metilación (hipometilación) también se presentan enfermedades.

Estudios recientes han demostrado que la metilación es un mecanismo de defensa contra virus y parásitos para evitar que éstos dañen el ADN (Jin et al. 2011).

La hipermetilación es una de las mayores modificaciones epigenéticas responsable de reprimir la transcripción vía región promotora de los genes supresores de tumores. La hipermetilación ocurre en las islas CpG de la región promotora, dando lugar a un silenciamiento transcripcional heredable.

La metilación del ADN puede por sí misma impedir físicamente la unión de los reguladores transcripcionales del gen y más importante aún, el ADN metilado participa en la conformación de la cromatina a través de interacciones con otras modificaciones epigenéticas, como la modificación del código genético para las histonas, o los complejos proteicos Polycomb (Este complejo está compuesto por una familia de proteínas identificadas por vez primera en *D. melanogaster* que pueden dar lugar a una remodelación de la cromatina produciendo el silenciamiento epigenético de genes. Las proteínas Polycomb mejor conocidas son las que afectan al silenciamiento de los genes *Hox* a través de la modulación de la estructura de la cromatina durante el desarrollo embrionario en *D. melanogaster*). En los mamíferos la expresión de genes del grupo Polycomb es importante en muchos aspectos del desarrollo embrionario (Portoso y Cavalli 2008).

Por todo ello, es importante examinar los vínculos entre la metilación del ADN y otros reguladores epigenéticos para comprender mejor los mecanismos moleculares de la represión transcripcional en el desarrollo y en la carcinogénesis.

La hipometilación surge principalmente por la pérdida de metilación en elementos repetitivos fuertemente metilados, incluyendo satélites (por ejemplo, SAT2) y retrotransposones (por ejemplo, LINEs), que conducen a la inestabilidad genómica y a la activación de oncogenes.

II. 1. 2.- ¿Cómo se pueden establecer y mantener los patrones metilados y no metilados de ADN en mamíferos al igual que los que surgen en el desarrollo embrionario?

Ante este interrogante se han planteado hipótesis distintas que se han tratado de forma experimental. Se trata de conocer los mecanismos que actúan en el mantenimiento de los patrones de metilación y de la ganancia y pérdida de esta metilación.

El mantenimiento de la metilación describe los procesos que reproducen los patrones de metilación del ADN a lo largo de las generaciones de células.

El mecanismo más sencillo para el mantenimiento depende de la copia semiconservativa del patrón parental en la hebra de la cadena de ADN (Holliday y Pugh 1975; Riggs 1975). De acuerdo con el modelo, la enzima de metilación DNMT1 prefiere metilar los CpG copia de los que ya figuran metilados en la cadena parental (Bestor y Tycko 1996; Pradhan et al. 1999). Por lo tanto, lo que hace es copiar un patrón de CpG metilados y no metilados a lo largo de una cadena de ADN y esto proporciona una forma de pasar información epigenética entre generaciones celulares. (Figura 11).

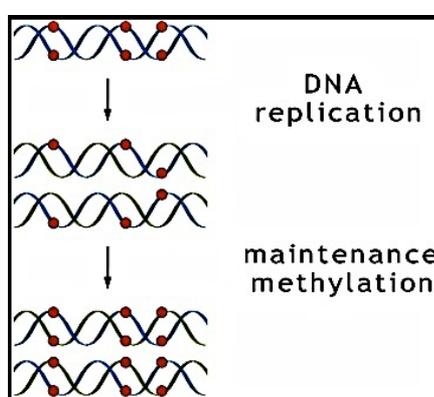


Figura 11.- Mecanismo que mantiene la metilación del ADN durante la replicación. Las cadenas originales que tienen la molécula metilada se copian a la cadena nueva que se sintetiza ya que la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) reconoce específicamente los dinucleótidos hemimetilados y transfiere un grupo metilo a la citosina en la nueva cadena.

Existe la idea de que se establecen patrones de metilación del ADN en el desarrollo embrionario temprano en los mamíferos, mediante las metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B *de novo* (Okano et al. 1998, 1999; Hsieh 1999) que luego son copiados a las células somáticas por el mantenimiento de la ADN metiltransferasa DNMT1, pero, como se verá a continuación, esta idea no explica completamente que esta enzima sea la única responsable de la persistencia de los patrones de metilación durante la proliferación celular.

Los experimentos que primero mostraron la replicación de los patrones de metilación utilizaron un ADN metilado artificialmente, y describieron una fidelidad relativamente baja para el proceso (Pollack et al. 1980; Wigler et al. 1981). Después de muchas generaciones de

células, la metilación del ADN introducido se mantuvo, pero a un nivel menor que en el organismo de partida, estimándose con una frecuencia del 5% por cada sitio CpG y por cada división celular. Estos estudios indican que no sólo la ADN metiltransferasa es el factor de mantenimiento de la metilación.

Entonces, ¿puede decirse que no existe el concepto de mantenimiento de la metilación?. Las islas CpG mantienen su estado no metilado (o metilado) extremadamente estable a través de múltiples generaciones celulares. La DNMT1 es, en parte, responsable de esta estabilidad, pero es probable que sea otro componente aún desconocido el que esté actuando para el mantenimiento del proceso. Una evidencia muy clara para mantener esta idea proviene de la constatación de que la metilación de la isla CpG se mantiene de manera estable incluso en ausencia de la DNMT1. Un fenómeno similar puede explicar el mantenimiento de las huellas de metilación en condiciones donde la concentración de DNMT1 era muy baja. (Chattejee y Eccles 2015).

El origen de los patrones de metilación del ADN es, todavía, un misterio. Las DNMT3A y DNMT3B metiltransferasas *de novo* están ampliamente expresadas en células embrionarias tempranas, y es en esta fase cuando suceden la mayor parte de los eventos de metilación *de novo* programados (Okano et al. 1998 y 1999). ¿Qué es lo que determina cuales son las regiones del genoma que deben ser metiladas? Una posibilidad lejana es que la metilación del ADN *de novo* en el desarrollo embrionario temprano de mamíferos es un proceso indiscriminado afectando potencialmente a todos los lugares CpG. Está claro que no todas las regiones del genoma están igualmente accesibles a las ADN metiltransferasas. La DNMT3B en particular, es requerida para la metilación *de novo* de regiones genómicas específicas, como en ratones o en pacientes humanos con mutaciones DNMT3B, los cuales presentan deficiencia en la metilación de secuencias de ADN repetitivo pericentromérico y en las islas CpG sobre el cromosoma X inactivo (Miniou et al. 1994;. Okano et al. 1998; Hansen et al. 2000; Kondo et al. 2000). La DNMT3B, por lo tanto, puede adaptarse a las regiones metiladas de la cromatina silente.

La evidencia de que también son necesarios factores accesorios para asegurar la metilación apropiada se clarificó inicialmente a partir de plantas, donde la proteína DDM1-SNF2 se demostró que era esencial para la plena metilación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Jeddeloh et al. 1999). Una dependencia equivalente se ve en las mutaciones *ATRX* de humanos (Gibbons et al. 2000) y en los genes *Lsh2* de ratón (Dennis et al. 2001) que codifican para la proteína SNF2 de la remodelación de la cromatina y producen efectos significativos en los patrones de metilación del ADN global. La pérdida de la proteína LSH2, en particular,

coincide con el fenotipo de la mutación *DDMI* en *Arabidopsis*, para ambos mutantes se pierde metilación de secuencias de ADN altamente repetitivas, pero retienen alguna metilación en otras partes del genoma. Quizás la metilación global eficiente del genoma requiere un cambio en la estructura de la cromatina producido por estas proteínas remodelantes de la misma, para que las DNMTs puedan tener acceso al ADN. La colaboración entre las DNMTs y factores que permiten el acceso a las regiones cromosómicas especializadas puede ser particularmente importante en regiones que son heterocromáticas e inaccesibles.

Otra hipótesis para explicar la metilación global es que la maquinaria de metilación del ADN es atraída preferentemente por ciertas secuencias de ADN en el genoma de los mamíferos (Turker 1999). Un iniciador hipotético de la metilación del ADN es la repetición de secuencias de ADN, la cual puede promover la metilación *de novo* como se vió en hongos filamentosos y plantas, bajo ciertas circunstancias (Selker 1999; Martienssen y Colot 2001). En mamíferos, la evidencia más sugerente se refiere a la manipulación del número de copias transgénicas en un solo locus en el genoma del ratón (Garrick et al. 1998); aquí se encontraron niveles altos de repetición de un transgén y se evidenció que fue la causa significativa del silenciamiento de dicho transgén y de la metilación concomitante. Por el contrario, la eficacia de la expresión del gen aumentó a medida que el número de copias se redujo en el locus, y a medida, también que decrecía el nivel de metilación.

Como indican estos autores, no se sabe si la repetición causó directamente la metilación, o fue indirectamente como una consecuencia de algún otro evento (por ejemplo, silenciamiento transcripcional).

Se ha evidenciado el llamado **centro de metilación del ADN** en el hongo *Neurospora*, donde cortos segmentos de ADN ricos en TpA inducían metilación (Miao et al. 2000). En mamíferos, la identificación de un centro de metilación del ADN se identificó en secuencias finales del gen de la *adenina fosforribosiltransferasa (APRT)* (Yates et al. 1999). La región contiene elementos repetitivos B1 y atrae altos niveles de metilación *de novo* después de la transfección en células embrionarias, aunque el efecto es relativo, porque muchas secuencias de ADN están sujetas a la metilación *de novo* en estas células.

Debido a que la evidencia sugiere que la replicación de los patrones de metilación debida a la acción de la DNMT1, sólo es en parte responsable para el mantenimiento de la metilación, una posibilidad atractiva es que las características de un dominio de ADN que ayuda a mantener su estatus metilado son las mismas características que promueven su metilación *de novo*.

El ARN de doble cadena dirige la destrucción de las transcripciones que contienen la misma secuencia, pero hay pruebas concluyentes que también puede dirigir la metilación *de novo* del ADN genómico homólogo (Wassenegger et al. 1994; Bender 2001; Matzke et al. 2001). El silenciamiento génico postranscriptional por el ARN de doble cadena es probablemente un antiguo sistema de defensa genómico porque ocurre tanto en hongos, como en plantas y en animales; pero la metilación del ADN no va necesariamente a la par, el silenciamiento es eficiente en *C. elegans* en ausencia completa de DNMT. Incluso en el hongo *Neurospora*, con frecuencia, la metilación del ADN no se requiere para el silenciamiento del gen postranscripcional (Cogoni et al. 1996).

Las plantas tienen un sistema de metilación CpG, pero éste no parece ser esencial para el silenciamiento génico dirigido por el ARN (Wassenegger et al. 1994; Bender 2001; Matzke et al. 2001). El optimismo de que la metilación *de novo* sea dirigida por ARN en los mamíferos ha desaparecido por falta, hasta ahora, de una clara demostración de que el ARN de doble cadena conduzca al silenciamiento génico mediatizado por la metilación del ADN.

II. 1. 3.- El silenciamiento transcripcional de la cromatina como un objetivo de la metilación *de novo*.

Varias evidencias sugieren que la metilación del ADN no interviene en el silenciamiento de promotores activos, sino que afecta a genes que ya están en silencio.

La metilación de genes que ya están en silencio es observada durante la inactivación del cromosoma X en el embrión de hembras de mamífero. Estudios cinéticos demostraron que el gen para la *fosfoglicerato quinasa* está silente en el cromosoma X inactivo en las hembras de los mamíferos antes de que se produzca la metilación de las islas CpG de sus promotores (Lock et al. 1987). Estudios posteriores en ratón, especie en la cual el proceso está mejor estudiado, han establecido que la expresión de un ARN no codificante sintetizado a partir del gen *Xist* en el cromosoma X inactivo, desencadena el proceso de inactivación *in cis*. Se sabe que en mamíferos placentarios, la represión de los genes ligados al cromosoma X depende de la expresión del gen *Xist*, que juega un papel en el proceso de inactivación. Específicamente, la activación del gen *Xist* y el inicio de su replicación tardía precede a la metilación de la isla CpG en varios días (Keohane et al. 1996; Wutz y Jaenisch 2000). En otras palabras, la metilación afecta el cromosoma X cuando los genes ya están silenciados por otros mecanismos.

La posibilidad de que las fases de la cromatina estén afectando a la maquinaria de metilación del ADN es atractiva (Selker 1990). Las fases de acetilación y de metilación de las histonas nucleosomales está estrechamente correlacionada con la actividad transcripcional (Jenuwein y

Allis 2001) y podría ser interpretada por la maquinaria de metilación, llevándola a cualquier dominio metilado o no metilado. De hecho, el trabajo sobre *Neurospora* (Tamaru y Selker 2001) demostró una íntima relación entre la metilación de histonas y la metilación del ADN.

Si la dependencia de la metilación del ADN a la previa metilación de histonas pudiera ser aplicable a los mamíferos, reforzaría aún más el argumento de que la metilación del ADN está dirigida a los genes que ya están en silencio.

II. 1. 4.- Consecuencias del aumento de la metilación: silenciamiento transcripcional estable de genes.

¿Por qué metilar genes que ya están en silencio? Una respuesta es para silenciarlos irrevocablemente. La metilación contribuye claramente a la estabilidad de la inactivación, porque la inactivación del cromosoma X (Graves 1982; Venolia et al. 1982), puede ser disminuída mediante el tratamiento con agentes desmetiladores en células somáticas. Las personas que carecen de DNMT3B muestran metilación reducida de algunas islas CpG en el cromosoma X inactivo y también genes silentes ligados al X de forma imperfecta (Miniou et al. 1994; Hansen et al. 2000).

Pero, ¿qué genes se ven afectados por la metilación del ADN en el silenciamiento de genes? Estudios previos se basaron en la utilización de la 5-azacitidina (Jones y Taylor 1980), que se usó para activar genes en el X inactivo en clones de células híbridas de roedores y humanos (Graves 1982). En líneas celulares de ratones que carecen de DNMT1 (Li et al. 1992) se evidenciaron los efectos de la metilación del ADN sobre la expresión génica. En mamíferos placentarios, la represión de los genes ligados al cromosoma X depende de la expresión del gen *Xist*, que juega un papel en el proceso de inactivación, culminando con la metilación generalizada de islas CpG. El cromosoma X activo, por otra parte, debe ser protegido del silenciamiento, y esto requiere la represión del gen *Xist* y de nuevo depende de la metilación (Panning y Jaenisch 1996). Un sistema de metilación del ADN intacto es también esencial para la impronta genómica, porque la supresión del gen *Dnmt1* conduce a la interrupción de la expresión monoalélica de varios genes imprintados (Li et al. 1993).

Tanto la inactivación del cromosoma X como la impronta genómica implican el silenciamiento de un solo alelo, dejando al otro no afectado.

Un conjunto inusual de genes que están activados en la línea germinal, la mayoría de los cuales están ligados al cromosoma X, parece utilizar la metilación para el silenciamiento completo, en las células somáticas (De Smet et al. 1996, 1999).

El silenciamiento del elemento de transposición como consecuencia de la metilación del ADN

Los elementos transponibles o transposones están clasificados como ADN repetitivo. Son secuencias de ADN con capacidad de cambiar de lugar dentro de un genoma y, en ocasiones, extenderse a otros genomas.

Una consecuencia de la deficiencia de la metilación del ADN es la activación de los promotores de los elementos transponibles. Las secuencias relacionadas con el factor de transposición están fuertemente metiladas y transcripcionalmente silenciadas en las células somáticas. En células de ratón, por ejemplo, la metilación reprime la transcripción de elementos de una partícula A (IAP), que constituye una familia activa de elementos transponibles. En los embriones que carecen de la DNMT1, la transcripción de elementos IAP se induce de forma masiva, argumentando que la metilación es normalmente responsable de su represión (Walsh et al. 1998). La des-represión de los promotores de LINE (Woodcock et al. 1997) y SINE (Liu et al. 1994) en el genoma humano también se produce cuando la metilación del ADN se reduce. El SINE más abundante en el genoma humano es la familia *Alu*, que consta de varios cientos de miles de elementos (Smit 1999). Sólo una pequeña minoría de elementos son capaces de transposición (<1%), pero muchos llevan promotores funcionales. Curiosamente, estos promotores pueden ser activados por varias clases de estrés (Liu et al. 1995; Chu et al. 1998) y la des-metilación artificial también estimula la expresión.

Es posible que la represión se requiera para evitar daños en el ADN debido a la transposición sin restricciones, lo que se ha venido en denominar el modelo de defensa del genoma (Yoder et al. 1997); y también puede ser que la transcripción de un gran exceso de promotores irrelevantes constituiría un nivel inaceptable del ruido transcripcional que pudiera interferir con los programas de la expresión génica.

Quizá todavía es pronto para descartar la posibilidad de que los promotores de transposición, la mayoría de los cuales pertenecen a elementos degenerados que son incapaces de transposición, deben ser silenciados para suprimir el ruido de la transcripción.

Otro interrogante que se plantea es el de por qué la metilación del ADN interfiere con la transcripción. Dos modos de represión se pueden prever, y es probable que ambos sean biológicamente relevantes. El primer modo implica una interferencia directa del grupo metilo en la unión de una proteína con su secuencia de ADN (Fig. 12). Muchos factores de transcripción se unen a secuencias que contienen CpG, y algunos de ellos fallan en su unión cuando la CpG está metilada.

El segundo modo de represión es opuesto al primero, ya que implica proteínas que son atraídas, en lugar de repelidas, por la metil-CpG (Fig. 12). Se ha caracterizado una familia de proteínas ligadas a metil-CpG. Cuatro de estas proteínas la MBD1, MBD2, MBD3 y MeCP2 están implicadas en la represión de la transcripción dependiente de la metilación (Bird y Wolffe 1999). Una proteína Kaiso no relacionada se une al ADN metilado y logra represión de la transcripción dependiente de la metilación (Prokhortchouk et al. 2001).

La mutación dirigida del gen de la MeCP2 está asociada a la disfunción neurológica en humanos y en ratones (Amir et al. 1999; Chen et al. 2001) y la mutación del gen *MBD2* de ratón conduce a un defecto del comportamiento materno (Hendrich et al. 2001).

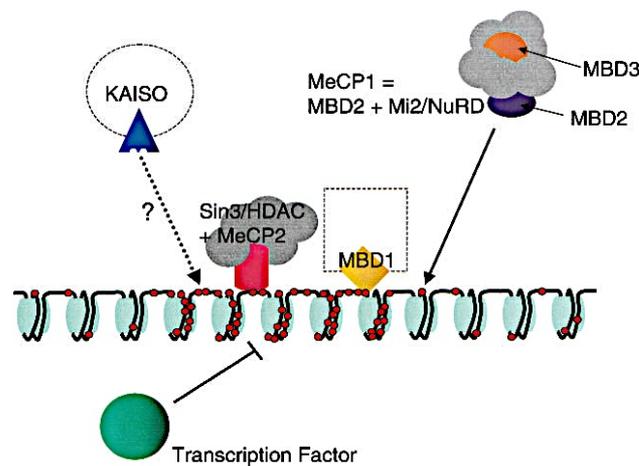


Figura 12. Mecanismos de represión transcripcional por la metilación del ADN. Un tramo de ADN nucleosomal se muestra con todas las CpG metiladas (círculos pequeños sobre el ADN de los nucleosomas). El círculo grande, de la parte inferior de la imagen, representa un factor de transcripción que es incapaz de unirse a su sitio de reconocimiento cuando en este sitio hay una CpG metilada. Muchos factores de transcripción son repelidos por metilación. En la parte superior de la figura se representan complejos de proteínas que pueden ser atraídos por metilación, incluyendo la proteína MeCP2 ligada al metil-CpG (más el complejo histona desacetilasa Sin3A), el complejo MeCP1 que comprende MBD2 más el complejo corepressor NuRD; y también el MBD1 y los complejos Kaiso.

Los MeCP2 y MBD1 son proteínas ligadas al cromosoma, mientras que MeCP1 puede estar menos fuertemente unido.

Aunque la metilación afecta a la mayor parte del genoma en los mamíferos, está notoriamente ausente en ciertas regiones. ¿De qué forma surgen estos dominios no metilados? Un mecanismo sencillo para crear un dominio no metilado dentro de un genoma densamente metilado, es enmascarar un tramo de ADN mediante la unión de proteínas. La proteína unida al DNA podría lograr esta desmetilación pasiva por exclusión de DNMTs (Bird 1986).

Si el silencio transcripcional, de hecho, desencadena la metilación del ADN, entonces la actividad del promotor de la transcripción en el desarrollo temprano del embrión debería crear islas CpG libres de metilación (Figura 13). En otras palabras, las islas CpG no metiladas pueden ser huellas de la actividad del promotor de transcripción embrionario.

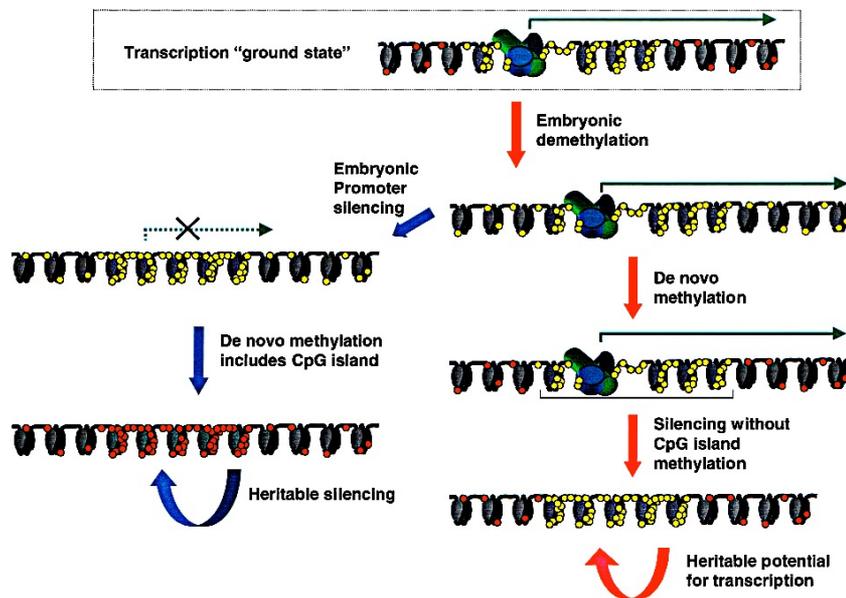


Figura 13.- En la imagen se describe un escenario hipotético relativo a la actividad transcripcional embrionaria y al estado de metilación del ADN en mamíferos. Empezando desde una fase fundamental de transcripción, la desmetilación embrionaria conduce a la sustitución de los lugares o sitios **metilados** (círculos muy pequeños, color gris oscuro, sobre el ADN de los nucleosomas,) por sitios **no metilados** (círculos muy pequeños color blanco sobre el ADN de los nucleosomas). Dos destinos alternativos pueden suceder: o bien la transcripción persiste conduciendo a la restauración de la isla CpG no metilada (a la derecha, la isla CpG subrayada por la línea gris); o, (a la izquierda) la transcripción se extingue por otros mecanismos en el embrión y esto invita a la metilación *de novo* de la isla CpG y sus flancos. De esta manera la actividad de los promotores embrionarios se impronta durante el curso de la vida somática adulta.

Una predicción obvia de este modelo es que todas las islas CpG no metiladas, incluidas las de los promotores de los genes expresados específicamente en un tejido, deben contener promotores que funcionan durante el desarrollo temprano del embrión cuando el sistema de memoria de metilación es más activo. Los datos obtenidos hasta ahora favorecen esta teoría, ya que un promotor del gen *alpha-Globina* con una isla CpG, cuyo producto ARN, no se esperó que se produjera en el embrión temprano, sin embargo, se expresó (Bird 2002).

La protección contra la metilación *de novo* mediante proteínas unidas o mediante la modificación de la cromatina, puede asegurar que la metilación del ADN nunca alcance un dominio importante en la secuencia del ADN. Dominios no metilados también podrían surgir mediante la eliminación de la metilación del ADN. Esta es la llamada **desmetilación activa** y podría llevarse a cabo, ya sea por la rotura desfavorable termodinámicamente del enlace carbono-carbono que liga la pirimidina a su grupo metilo, o por un proceso reparador que escinde la base 5mC, dando lugar a su sustitución por C (Kress et al. 2001).

La necesidad de aislar enzimas desmetilantes se ha convertido en algo muy urgente.

II. 1. 5.- Consecuencias de la pérdida de metilación: la activación de genes durante el desarrollo.

El interés en la metilación del ADN ha sido impulsado, durante mucho tiempo, por la idea de que la pérdida estratégica de grupos metilo durante el desarrollo podría conducir a la activación de genes específicos en el linaje apropiado. Como se ha destacado (Walsh y Bestor 1999), gran parte de la evidencia de este escenario está inconclusa, pero estudios recientes han reavivado la idea. En la rana la expresión génica se suprime desde la fertilización hasta la etapa de mediados de blástula (~5000 células), en cuyo momento se activa la transcripción. La inhibición de la enzima DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) redujo la metilación y la activación prematura de ciertos genes, lo que sugiere un papel directo de la metilación del ADN en el mantenimiento de su silenciamiento temprano antes de la etapa de blástula (Stancheva y Meehan 2000). La delección del gen *Dnmt1* que codifica para la enzima DNMT1, en cultivos de células somáticas del ratón también causó la activación generalizada de genes (Jackson-Grusby et al. 2001).

¿La pérdida de la integridad del genoma es consecuencia de la pérdida de metilación del ADN?

Los primeros estudios con el inhibidor de la metilación del ADN, la 5-azacitidina, revelaron reordenamientos cromosómicos en cultivos celulares (Viegas-Pequignot y Dutrillaux 1976).

Los linfocitos estimulados con mitógenos en pacientes con mutaciones en la DNMT3B, muestran similares reordenamientos cromosómicos (Jeanpierre et al. 1993; Xu et al. 1999).

Curiosamente, los reordenamientos no se detectan en las células de los pacientes, cuando no han sido estimuladas con mitógenos.

Chen et al. (1998) examinaron los efectos de la reducción de los niveles de metilación de ADN en las tasas de mutación en células madre embrionarias de ratón. En un primer estudio, se encontró que la tasa de mutación en dos loci aumentó ~ 10 veces en comparación con el mismo loci en las células originarias, lo que sugiere que la falta de metilación predispone a eventos de recombinación anómalos. Un segundo estudio utilizando un sistema de selección para detectar mutaciones (Chan et al. 2001) identificó un gran número de mutaciones en dos loci independientes, pero ni las mutaciones ni la aparición de reordenamientos genómicos se incrementaron cuando se limitaba la metilación del ADN. De hecho, las mutaciones más bien disminuían cuando disminuía la metilación por hipometilación genómica.

Estas inconsistencias plantean preguntas acerca de la relación entre la integridad del genoma y la metilación del ADN con lo cual serán necesarias más investigaciones concretas para aclarar este interrogante.

II. 2.-La modificación de histonas.

En la célula, el ADN se asocia con las histonas para formar la cromatina. El empaquetamiento del ADN en la cromatina puede hacer que grandes regiones del DNA sean inaccesibles y evitar que se produzcan procesos como la transcripción del ADN. Este es un nivel clave de regulación ya que el estado en el que se encuentre la cromatina determina el momento, el lugar y la forma en que un gen puede ser expresado o no.

Si la cromatina se encuentra en un alto grado de condensación, los elementos de transcripción no pueden acceder a dicha región del ADN y, por lo tanto, el gen no se transcribe.

En contraste, si la cromatina no se encuentra condensada, los activadores de transcripción se pueden unir a las regiones promotoras para que ocurra la transcripción del gen. Ésta es una de las formas en que se da la regulación del genoma.

Las proteínas histonas pueden ser modificadas químicamente (por acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación) y causar cambios estructurales en la cromatina (Kouzarides 2007).

II. 2. 1.- Acetilación

La acetilación tiene lugar cuando las proteínas histonas, alrededor de las cuales se fija el ADN, son modificadas con la adición de grupos acetilo (-CH₃CHO). Esta alteración disminuye la interacción entre el ADN y la histona y está asociada con una mayor expresión genética, ya que cambia la estructura de la interacción ADN-histona, al separarse el ADN de los nucleosomas, permitiendo así que los factores de transcripción se unan al ADN.

La acetilación de histonas es un proceso dinámico, y el estado acetil lisina se puede cambiar rápidamente. Las acetiltransferasas histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC) son las enzimas responsables de la adición y la eliminación de esta modificación, y se dirigen a determinados residuos de lisina. Estas proteínas son parte de complejos de proteínas más grandes, que contienen otros factores importantes para el reclutamiento o para coactivación/corepression. Una de las HDACs mejor conocidas, actualmente, es la Sir2, un NAD de la histona desacetilasa dependiente; se ha visto que es importante para el mantenimiento de la cromatina silente y ha sido implicada como reguladora del envejecimiento celular (Vaquero 2003). Actualmente, están siendo explorados compuestos inhibidores de HDAC y se utilizan como terapias anti-cancerosas.

II. 2. 2.- Fosforilación

La fosforilación se produce cuando las histonas H1 son modificadas por la adición de un grupo fosfato, esta modificación se asocia con cambios en la actividad genética en las inmediaciones de la histona fosforilada. La mayoría de los estudios de la fosforilación de las histonas se han centrado en la división celular, cuando la fosforilación está en su apogeo.

Puede servir como una señal de activación en una proteína diana, tal como un factor de transcripción (Turjanski et al. 2007). También se cree que por la fosforilación de la histona, estas señales pueden transmitirse directamente a la cromatina (Pokholok et al. 2006).

La fosforilación de las proteínas histonas es otra modificación posterior a la traducción que se ha observado (Cerutti y Casas-Mollano 2009). La fosforilación en la histona H3 en serina 10 y serina 28 se cree es importante para la regulación de condensación de la cromatina durante la mitosis (Bonenfant et al. 2007). El mecanismo no se conoce muy bien, pero se mantiene que estas modificaciones sirven como sitios de reconocimiento para otros factores y proteínas efectoras que reconozcan los residuos de fosfoserina e interactuen con la histona H3. Además, la fosforilación de dichas proteínas puede alterar la estructura de la cromatina al afectar la carga de las proteínas histonas (Taverna 2007).

II. 2. 3.- Sumoilación

La sumoilación (SUMOilación) es una modificación postraducciona mediante la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína (de peso molecular 11 kDa) llamada SUMO (small ubiquitin-related modifier). SUMO es también conocida por otros nombres, como por ejemplo sentrina, Smt-3 y GPM-1.

Las consecuencias de la sumoilación son variadas y dependen de la naturaleza de la proteína que ha sido modificada.

En los mamíferos existen al menos tres genes que codifican distintas variantes de SUMO (llamados *SUMO-1*, *-2* y *-3*). *SUMO-2* y *-3* son altamente homólogos y en general se conocen como *SUMO-2/3*. Se ha descrito otra proteína conocida como SUMO-4, pero al parecer carece de la capacidad de modificar otros factores.

El proceso de sumoilación es análogo al de ubiquitinación y ocurre mediante un mecanismo que requiere enzimas de activación, conjugación y ligación. En el caso de SUMO se conoce sólo una enzima de conjugación, denominada Ubc9.

La sumoilación es un fenómeno altamente dinámico, en el cual también están implicadas enzimas conocidas como enzimas de des-umoilación, las cuales son factores que eliminan SUMO de la proteína que ha sido modificada.

II. 2. 4.- Ubiquitinación

La ubiquitinación es un proceso enzimático de modificación proteica post-traducciona (PTM) en el cual el ácido carboxílico de la glicina terminal (que se encuentra en el motivo de diglicina de la ubiquitina activada) forma un enlace amida con el grupo amino épsilon de la lisina en la proteína modificada.

La ubiquitina es una pequeña proteína reguladora que ha sido encontrada en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. Una de sus muchas funciones es dirigir el reciclaje de proteínas. La ubiquitina puede asociarse a proteínas y marcarlas para su destrucción. El marcaje de ubiquitina dirige las proteínas al proteosoma, que es un gran complejo de proteínas que se encuentra en la célula y que degrada y recicla proteínas innecesarias.

El mecanismo por el cual la ubiquitination histónica contribuye a la regulación epigenética, todavía no está claro. Es interesante observar que en ensayos de monoubiquitinación de la histona H2A se ha demostrado que desempeña un papel en la represión transcripcional,

mientras que la monoubiquitinación de la histona H2B está implicada en la activación transcripcional (Weake y Workman 2008).

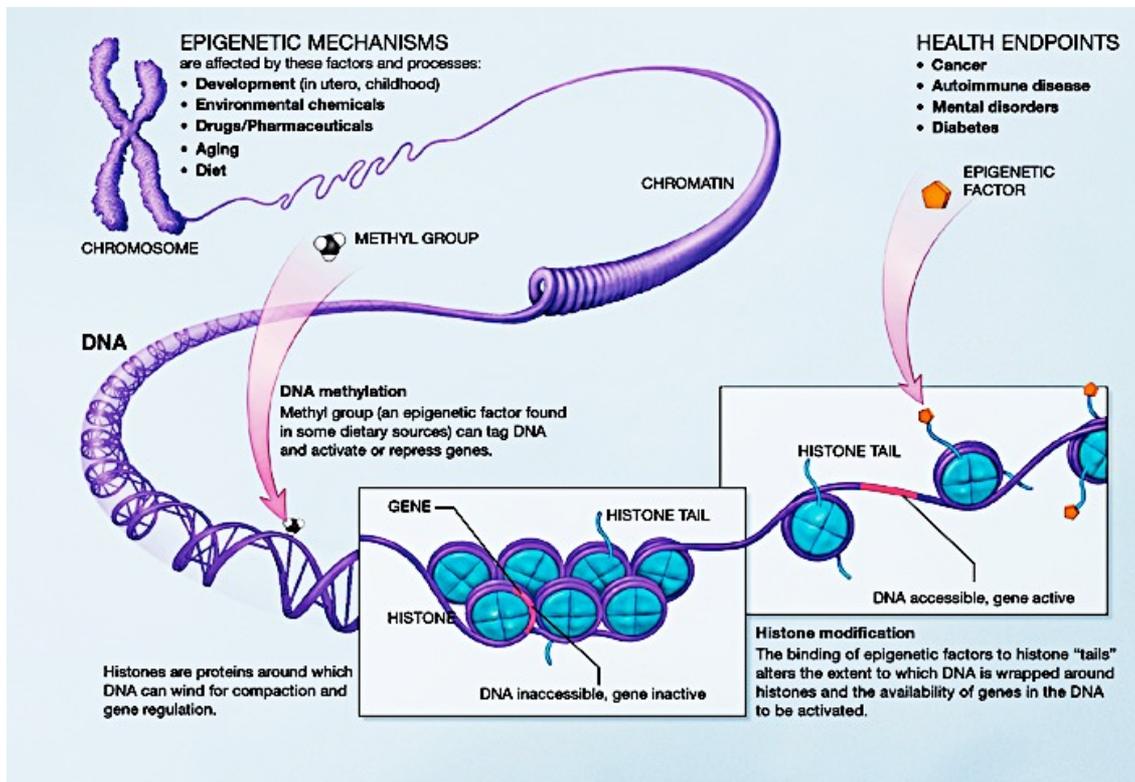


Figura 14.- Los mecanismos epigenéticos regulan la estructura de la cromatina. Tanto la metilación del ADN como las modificaciones de histonas participan en la modulación de la estructura de la cromatina.

El conjunto de alteraciones que se puede producir en las histonas llevó a establecer el llamado **código de histonas** (Strahl y Allis 2000), que representa el conjunto de alteraciones de estas proteínas. Figura 14.

Asimismo, se creó una nomenclatura denominada **nomenclatura de Brno**, establecida por un consorcio de laboratorios europeos para estandarizar la descripción de las modificaciones de las histonas (Turner 2005).

Sirva como ejemplo la nomenclatura H3K27me3, esta inscripción está definiendo la histona afectada (histona H3), seguida del aminoácido modificado (K27 que representa la lisina) y finalmente la modificación sufrida (me3 que se trata de una trimetilación).

¿Cómo está afectando la modificación de histonas sobre el organismo?

Uno de los campos más estudiados en relación con la modificación de histonas es el del

aprendizaje y la memoria. La modificación de histonas juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica de los genes implicados en los procesos de aprendizaje y memoria.

En modelos biológicos más simples como en el molusco gasterópodo *Aplysia*, el aprendizaje está asociado a la acetilación de una lisina en la histona H3 y otra en la H4 (Peixoto y Abel 2013). No obstante, en animales superiores como los mamíferos, dependen del tipo de aprendizaje y del área cerebral implicada. Por ejemplo, el aprendizaje asociado a la prueba del condicionamiento al miedo genera un incremento de la acetilación de la H3, pero no de la H4, en la región del hipocampo (Bousiges et al. 2010). Así pues, parece evidente que los distintos procesos de aprendizaje expresan patrones específicos de acetilación de histonas, aunque la acetilación de las histonas H3 y H4 son las más comunes en estos procesos de plasticidad neuronal.

Numerosas patologías en medicina, psicología, genética, etc. humana han sido asociadas con alteraciones de las modificaciones de histonas como la adicción (Nestler 2014), la esquizofrenia, trastornos depresivos o trastorno bipolar (Graff y Mansuy 2009).

II. 2. 5.- Vínculos entre la metilación del ADN y la modificación de las histonas

La modificación covalente del ADN y de las histonas, proporciona un mecanismo hereditario para la regulación de la expresión génica (Jin et al. 2011).

Las terminaciones de las histonas se someten a una variedad de enlaces covalentes que son clave en la regulación de los procesos celulares, tales como la transcripción de genes, la replicación y la reparación del ADN. (Cedar y Bergman 2009; Chi et al. 2010).

La metilación del ADN y las modificaciones específicas de las histonas influyen recíprocamente entre sí durante el desarrollo de los mamíferos y en la aparición del cáncer.

Figura 15.

La metilación de las histonas puede dirigir patrones de metilación del ADN y la metilación del ADN puede servir como una plantilla para el establecimiento de ciertas modificaciones de las histonas después de la replicación del ADN (Cedar y Bergman 2009; Jin 2011).

La trimetilación de las histonas H3 lisina 9 (H3K9), histona H3 lisina 27 (H3K27) y la histona H4 lisina 20 (H4K20) es un requisito previo para la metilación del ADN posterior, que parece ser atribuible a las asociaciones físicas entre los componentes de estos sistemas de metilación de las histonas y una o más DNMTs.

Los patrones anómalos de metilación del ADN han sido asociados con un gran número de enfermedades en humanos y se han encontrado de dos maneras distintas: hipermetilación e hipometilación, cuando se han comparado con los estándares normales.

Características epigenéticas del cáncer incluyen la hipometilación del ADN global y la hipermetilación de loci específicos de islas CpG (Jin et al. 2011).

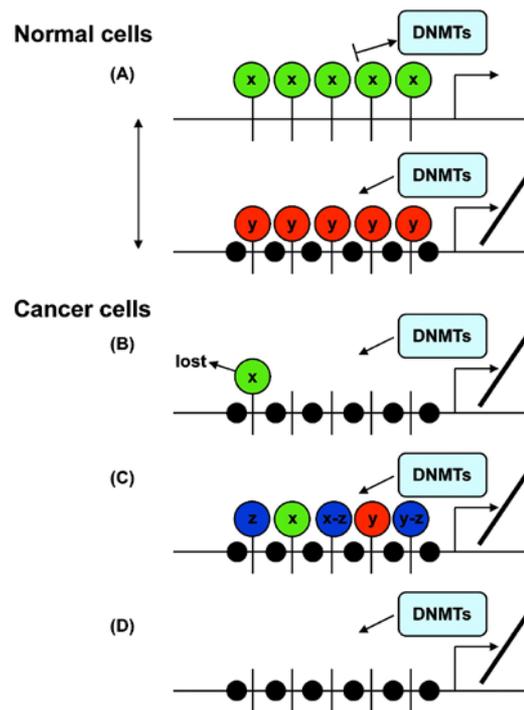


Figure 15. En la figura se expresa cómo el código de histonas puede dirigir la metilación del ADN durante el desarrollo y la carcinogénesis.

(A) Durante el desarrollo normal, la marca H3K4me3 (x) que activa transcripcionalmente, produce el bloqueo de las DNMTs o bien las repele, mientras que las marcas represivas H3K9me o H3K27me (y) permiten la actuación de las DNMTs o bien las adquieren.

(B) Durante la carcinogénesis, se produce la interrupción del código de histonas bien en la forma de pérdida de la marca H3K4me3 (x)

(C) o por la sustitución de la marca H3K4me3 (x) por H3K9me o H3K27me (y), por la aleatorización de las marcas, por la adquisición aberrante de una nueva marca (z), o

(D) por la pérdida de todas las marcas de histonas.

Todo ello permite o induce activamente la adquisición de las DNMTs.

x = H3K4me3;

y = H3K9me o H3K27me;

z = otra marca histónica;

flecha doblada = lugar de inicio de la transcripción;

círculos de diferentes tonos de grises = marcas de histonas;

círculos negros más pequeños = la metilación del ADN.

II. 2. 6.- Las proteínas del grupo Polycomb y la metilación del ADN en el desarrollo y en el cáncer.

Las proteínas Polycomb fueron descubiertas por primera vez en *D. melanogaster* como reguladoras clave de la expresión génica de genes homeóticos (*Hox*), fundamentales para el desarrollo normal del organismo (Jin et al. 2011).

En los mamíferos, se han identificado dos complejos principales de proteínas, PRC1 y PRC2, y ambos juegan papeles fundamentales en el silenciamiento de la transcripción. El complejo PRC1 en mamíferos es diverso e incluye la HPH (1, 2, y 3), RING1/RING2, RYBP y BMI1 (o sus homólogos MEL18 y NSPC1) como subunidades principales.

La PRC2 tiene tres componentes básicos EZH2, EED y SUZ12.

PRC1 es un ejecutor directo del silenciamiento de los genes diana. Los complejos PRC1 tienen, al menos, dos funciones centrales: la primera (originalmente definido para PRC1) es la compactación de la cromatina, y la segunda es la catálisis de la monoubiquitinación de la histona H2A.

En la actualidad se cree que la represión por las proteínas Polycomb se establece a principios del desarrollo embrionario, luego se pierde de una forma específica para cada linaje, en la diferenciación celular (Jin et al. 2011).

Los complejos Polycomb tienen fuertes vínculos con el cáncer. Por ejemplo, EZH2 se sobreexpresa en los tumores. BMI1 coopera con MYC para promover linfomas reprimiendo el locus INK4a/ARF supresor de tumores.

Los genes diana para los complejos Polycomb están generalmente asociados con los promotores de CpGI y, como tales, están protegidos de la metilación *de novo* en el momento de la implantación. Por lo tanto, la mayoría de los genes diana EZH2, en realidad, siguen siendo constitutivamente no metilados a lo largo del desarrollo embrionario (Mohn et al.

2008). Sin embargo, algunos de estos genes podrían convertirse en dianas para la metilación del ADN *de novo* bajo condiciones patológicas y contribuir a la aparición de cáncer.

La metilación del ADN de genes diana Polycomb está presente en condiciones pre-neoplásicas y puede conducir a la expresión anómala de un gen asociado con la carcinogénesis.

Las modificaciones de la cromatina en células cancerosas se asemejan a las observadas en las células madre embrionarias normales, estas modificaciones pueden evitar que las células madre o precursoras inicien la diferenciación hasta que se haya programado para hacerlo así (Ohm y Baylin 2007).

El patrón de cromatina puede hacer que grupos de genes sean más vulnerables a errores dando lugar a la adquisición de un promotor anómalo de metilación temprana del ADN, durante la progresión del cáncer en adultos, bloqueando de forma anómala la fase del silenciamiento de genes (en particular genes pro-diferenciación) y haciéndolos incapaces de responder adecuadamente a las señales de diferenciación.

II. 2. 7.- El posicionamiento del nucleosoma y la metilación del ADN

Como se ha indicado anteriormente, las histonas H2A, H2B, H3, y H4, junto con el ADN que se empaqueta a su alrededor forman el nucleosoma, todo ello junto con la histona H1 y el ADN enlazador situados entre los nucleosomas, forman la cromatina.

Jeong et al. (2009) y Chodavarapu et al. (2010) determinaron que tanto la DNMT3A como la DNMT3B están firmemente ancladas a los nucleosomas, mientras que la DNMT1 interactúa principalmente con el ADN enlazador.

Cuando las interacciones del ADN con la histona dentro del nucleosoma se ven perturbadas por el bromuro de etidio que se intercala dentro del ADN, la DNMT3A y la DNMT3B se disocian de las proteínas histónicas y co-sedimentan con el ADN libre, lo que sugiere que la actuación de las enzimas depende de la interacción con el ADN y con las histonas, para dar lugar a un anclaje estable.

Los elementos repetitivos SINE y LINE metilados y las CpGIs en los nucleosomas representan los principales sitios de unión de la DNMT3A y de la DNMT3B sugiriendo que desde la cromatina son necesarias señales adicionales para la herencia de la metilación del ADN.

El posicionamiento del nucleosoma también tiene un efecto llamativo sobre la metilación del ADN. Una ausencia de la histona H1 induce a una hipometilación del ADN de los lugares

específicos CpGIs, tales como las regiones de control de la impronta de los loci *H19-Igf2* y *Gtl2-Dlk1* (Fan et al. 2005), indicando que las histonas enlazadoras participan en la regulación epigenética de la expresión génica contribuyendo al mantenimiento y/o establecimiento de los patrones de metilación específica del ADN. El mecanismo por cual la H1 logra esto, sin embargo, sigue siendo desconocido.

Es bien sabido que la composición del nucleosoma influye en su posicionamiento y, en definitiva, en la estructura de la cromatina. El reemplazo del núcleo de las histonas con variantes de la histona H2A o H3 representa otro posible medio de la regulación de genes. Si se incrementa la H2A.Z que es una variante de la histona H2A, se observa un descenso de la transcripción dentro de los genes, un hallazgo conservado desde las plantas a los animales. (Raisner et al. 2005; Zemach et al. 2010).

Widom et al. (2001) indican que el ADN unido al nucleosoma es un sustrato preferido para la metilación del DNA. La DNMTs entra en el surco mayor del ADN para acceder y metilar la citosina en el exterior del nucleosoma (surco menor). Los nucleosomas parecen dictar el acceso al ADN y por lo tanto dar lugar al registro de la metilación para todas las ADN metiltransferasas. La metilación del ADN se produce en diferentes regiones del genoma de *Arabidopsis* y de humanos, incluyendo genes estructurales, promotores, regiones pericentroméricas y regiones eucromáticas, sugiriendo que la relación entre el posicionamiento nucleosomal y la metilación del ADN es general. No obstante, Chodavarapu et al. (2010) aseguran que el ADN nucleosomal es mucho menos accesible que el ADN enlazador para muchas proteínas que actúan mejor sobre el ADN que no se organiza en nucleosomas para llevar a cabo funciones esenciales.

Se ha identificado que, *in vitro*, la DNMT3A muestra actividad preferencial de metilación de ese ADN que no se organiza y del ADN de las regiones de enlazamiento, frente al ADN nucleosomal, y que la DNMT3B tiene una actividad débil hacia el centro del nucleosoma. Sin embargo, *in vivo*, la metilación del ADN del nucleosoma está mucho más enriquecida que en el ADN enlazador, de acuerdo con la conclusión de que ambas, tanto la DNMT3A como la DNMT3B están firmemente ancladas a nucleosomas en lugar de estarlo al ADN enlazador. Este resultado apoya la opinión de que los nucleosomas son blanco preferente de las DNMTs *in vivo*. (Jeong et al. 2009).

II. 2. 8.- La desmetilación del ADN

En los mamíferos, la desmetilación de ADN también desempeña un papel importante en el desarrollo y la formación de tumores. La desmetilación del ADN, que se produce en las células germinales primordiales (PGC) y en el desarrollo temprano de embriones, es esencial

para que las células vuelvan a un estado pluripotente. La mayor pérdida de metilación en las PGCs se observa dentro de los intrones, en las regiones intergénicas y en las repeticiones, y después en los exones y en los genes promotores. En el cáncer, una hipometilación genómica global, ligada a la inestabilidad genómica y a la activación del oncogén, afecta a secuencias repetitivas, a genes imprintados, a genes específicos de tejidos, oncogenes y a genes asociados con invasión y metástasis (Kisseljova y Kisseljov 2005), mientras que muchos genes supresores de tumores están hipermetilados y silenciados (Feinberg et al. 2006).

Los mecanismos de la eliminación de la metilación del ADN en los mamíferos están todavía poco conocidos, aunque se han propuesto una serie de mecanismos potenciales. La desmetilación se puede llevar a cabo por citosina desaminasas, convirtiendo la 5mC a timina, seguida por una reparación T-G que reemplaza específicamente la timina por citosina.

Se demostró que la oxidación de 5mC por la familia de hidroxilasas TET también puede participar en la desmetilación (Kriaucionis y Heintz 2009; Tahiliani et al. 2009).

II. 3.- Los ARN no codificantes y el epigenoma.- Existen ARNs no codificantes de proteínas (**ncRNAs**) que también contribuyen a la regulación epigenética. Un ARN no codificante (ncRNA) es una molécula de ARN funcional, que no se traduce en una proteína.

Las moléculas de ncRNA pueden ser procesadas y participan en las vías de interferencia del ARN. Este proceso genera pequeñas moléculas de ARN que pueden inhibir la expresión génica por la interacción con la molécula de ARN diana, con el propio ADN en sí o participar en el reclutamiento de modificadores de la cromatina (Zaratiegui et al. 2007; Mattick et al. 2009).

Además, otras moléculas de ncRNA participan en numerosos tipos de eventos de silenciamiento en grandes regiones cromosómicas, incluso en cromosomas enteros, que pueden llegar a ser transcripcionalmente inactivas (Clark 2007; Yang y Kuroda 2007).

Tres clases principales de pequeños ARN no codificantes desempeñan un papel crítico en la regulación de la expresión génica en plantas y en animales. Los procesos dirigidos por estos pequeños RNAs confieren resistencia a una variedad de sucesos celulares, tales como la infección viral y la prevención de eventos de transposición al azar dentro del genoma. Adicionalmente, pequeños RNAs son factores importantes para dirigir otros procesos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de la cromatina (Mattick et al. 2009; Carthew y Sontheimer 2009; Ghildiyal y Zamore 2009; Chatterjee y Eccles 2015).

II. 3. 1.- Los ARN de interferencia (siRNAs)

En el año 2006, Craig Mello y Andrew Fire fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por el descubrimiento del ARN de interferencia. Anteriormente se había conocido que la expresión génica normal puede ser interrumpida por la introducción de ARN anti-sentido en la célula (Izant y Weintraub 1984). Estudiando el gusano *C. elegans* como un sistema modelo se observó que este proceso se ha mejorado en gran medida mediante el uso de moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) (Fire et al. 1998). Estos dsRNAs se pueden procesar en fragmentos de nucleótidos cortos. De forma que fragmentos de ARN procesados fueron identificados como precursores del ARN de interferencia (siRNAs) y se demostró que desempeñan un papel en la regulación de la expresión génica post-transcripcional (Elbashir et al. 2001). Los siRNAs se pueden derivar de fuentes tanto exógenas (como la infección viral) como endógenas de dsRNA (tales como transcripción convergente o bidireccional de transposones y elementos repetitivos) (Ghildiyal y Zamore 2009).

II. 3. 2.- Los micro ARNs (miARN)

Los micro ARNs (miRNAs) son otra clase de ARN de cadena corta que juegan un papel en la regulación de los genes (Tomari y Zamore 2005). Un **micro ARN** es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos. Cientos de genes miARN ya han sido identificados en el genoma humano. Muchas veces estos genes miARN se presentan en loci agrupados. Los miRNA son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero no son traducidas a proteínas. Se expresan en una amplia variedad de organismos, desde plantas hasta gusanos y humanos. Muchos miRNA están bien conservados entre especies y muchos componentes de la maquinaria de los miRNA se han encontrado incluso en Archaea y eubacterias, lo que revela que su origen es muy antiguo. Los miARN son transcritos por la ARN polimerasa II y el transcrito resultante se denomina miARN primario (pri-miRNA) (Carthew y Sontheimer 2009; Ghildiyal y Zamore 2009). El pri-miRNA se procesa en un fragmento de ARN que forma una horquilla estructurada conocida como la pre-miARN (Bartel 2004). Al igual que en el procesamiento de los siRNAs, los pre-miRNAs también son procesados por Dicer en dobles moléculas de ARN de cadena corta. En este caso una de las hebras se designa la hebra de miARN y el otro la hebra miARN *. Regula la actividad de muchos genes y pueden producir mutaciones en los mismos. Se sabe que los miRNAs pueden comportarse como oncogenes y genes supresores de tumores. (Negrini et al. 2009).

II. 3. 3.- Los pi ARNs (piRNAs)

Una tercera clase de RNAs también de cadena corta se llaman piRNAs. A diferencia de los miRNAs y los siRNAs, los piRNAs no interactúan ni son procesados por la proteína Dicer. Se ha demostrado que los piRNAs desempeñan un papel crítico en el silenciamiento de transposones en las células de la línea germinal. Hasta el momento, tanto la generación como el mecanismo de acción de los piRNA no se conocen muy bien (Carthew y Sontheimer 2009; Ghildiyal y Zamore 2009; Chatterjee y Eccles 2015).

Todos estos mecanismos de regulación epigenética, tanto la metilación del ADN, como la modificación de histonas y la acción de los ncARN, contribuyen al llamado **epigenoma**.

La distribución de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y la expresión de los ncRNA no sólo puede ser específica para un organismo particular, sino también, para un tejido o, incluso, para un tipo de célula particular.

El epigenoma no es estático, el epigenoma puede ser dinámico, influenciado por factores ambientales y estímulos extracelulares, y se modifica de acuerdo con la respuesta a estos factores.

III.- La herencia epigenética y la evolución: La herencia transgeneracional

No hay ninguna duda acerca del principio de que los genotipos heredados definen los fenotipos, pero la cuestión sigue siendo, sin embargo, si los fenotipos estables podría ser también heredados de los padres independientemente de la secuencia genética. Los datos recientes sugieren que las experiencias de comportamiento de los padres se pueden transmitir, a través de la exposición intrauterina del feto con el medio ambiente materno o a través de líneas germinales masculinas o femeninas. El desafío es delinear un mecanismo plausible. En la última década se ha propuesto que los mecanismos epigenéticos están implicados en la transmisión multigeneracional de fenotipos y herencia transgeneracional. La perspectiva de que experiencias ancestrales se escriben en nuestro epigenoma tiene enormes implicaciones para nuestra comprensión de la conducta humana, la salud y la enfermedad.

La herencia transgeneracional ha sido descrita tanto en animales como en plantas y se produce cuando un factor ambiental provoca un cambio permanente en el epigenoma de un gameto, este genoma modificado y sus fenotipos asociados pueden ser transgeneracionalmente transmitidos a las generaciones subsiguientes (Skinner et al. 2010). La herencia

transgeneracional describe un fenómeno por el que determinadas modificaciones y cambios, producidos como consecuencia de la acción de agentes externos sobre el individuo, son heredados por su descendencia y por las generaciones siguientes. Esta herencia depende de que los cambios afecten a las células primordiales, por lo que los estados iniciales del desarrollo son los más susceptibles.

La idea de la heredabilidad de las exposiciones ambientales de los parentales ancestrales y sus influencias sobre las características fenotípicas y el riesgo de enfermedades en la descendencia ha fascinado a muchos científicos durante décadas (Nelson y Nadeau 2010; Pembrey 2010; Soubry et al. 2014; Soubry 2015).

Los biólogos observaron por primera vez esta herencia epigenética transgeneracional en las plantas. Los tomates, por ejemplo, pasan marcas químicas que controlan la maduración a lo largo de las sucesivas generaciones.

Las raíces de la herencia pueden extenderse más allá del genoma, pero los mecanismos siguen siendo un enigma. El tema sigue siendo controvertido, en parte porque se remonta a las teorías desacreditadas de Jean-Baptiste Lamarck, el científico francés del siglo XIX que propuso que los organismos transmiten caracteres adquiridos a las generaciones futuras. Para muchos biólogos modernos, eso produce un cierto temor a continuar la investigación por esa vía.

El botánico sueco Carl Linnaeus fue uno de los primeros en detectar los cambios resultantes de este fenómeno. En la década de 1740, recibió una muestra de plantas que parecían muy similares a la especie *Linaria vulgaris*, pero con flores muy diferentes. Linneo se sorprendió porque esto desafió a su teoría de que las especies de plantas podrían ser clasificadas de acuerdo a la estructura de sus flores. A la planta la llamó *Peloria*, que podría traducirse como "monstruo".

Coen (1990) encontró que en esas plantas llamadas "monstruos", uno de los genes implicados en la estructura de la flor llamado *Lcyc*, se encontraba completamente apagado, (es decir el ADN estaba metilado) y esas marcas pasaban a través de las semillas a cuatro generaciones después.

Pero muchos científicos se mostraron escépticos y es que los estudios epidemiológicos son, con frecuencia, complicados.

La revolución de la Epigenética se inició con intensidad en la década de los 2000, cuando los científicos comenzaron a aceptar que los factores ambientales (desde la maternidad negligente a una alta contaminación ambiental o de grasas en la dieta) pueden influir en la adición o

eliminación de marcas químicas en el ADN (Hughes 2014) y estas marcas epigenéticas se transmiten de generación en generación.

Mientras que algunos estudios realizados ya en las décadas de 1930 y 70 han llevado a la sugerencia de un rol paterno en este proceso transgeneracional (Price 1939; Fabia y Thuy 1974), el foco de la mayoría de las investigaciones realizadas en los últimos años implica influencias periconcepcionales o en la exposición a través de la madre. Numerosos datos epidemiológicos sobre las madres y sus hijos han proporcionado evidencia de que, además de los daños genéticos también los rasgos epigenéticos pueden ser afectados por los cambios ambientales, dando lugar a alteraciones fenotípicas heredables que persisten a través de múltiples generaciones.

Uno de los estudios que mejor ilustran este proceso es el trabajo realizado en pacientes de estrés post-traumático, víctimas del holocausto judío. Se descubrió que el número de hijos que también sufrían este síndrome era muy elevado (Yehuda et al. 1998). En ese momento, se achacó a una herencia verbal tras toda una vida escuchando reiteradamente la historias de sufrimientos de sus padres. Sin embargo, tras analizar las generaciones posteriores se descubrió que el número de personas que sufrían estrés post-traumático era muy superior a lo esperado.

Por otro lado, se identificó un proceso similar en ratas. A ratas embarazadas se les sometió a estrés y se observó que sus crías respondían de forma diferente al estrés y presentaban síntomas de ansiedad. Pero además, se comprobó que las crías de éstas últimas, que nunca habían estado sometidas al tratamiento, también respondían de forma desigual al estrés y mostraban ansiedad (Weaver et al. 2004).

Una madre puede transmitir efectos de la exposición ambiental a un feto durante el embarazo, pero era necesario que para estudiar el fenómeno de la epigenética transgeneracional, los biólogos se centraran, también, en los parentales masculinos, y han estado buscando la forma en que el esperma puede ganar y perder las marcas epigenéticas. Sólo en los últimos años algunos investigadores han comenzado a dedicarse con mayor intensidad a las posibles contribuciones paternas en la herencia epigenética de las exposiciones ambientales.

La línea germinal masculina tiene también un papel importante, como una de las herramientas de la naturaleza, para capturar mensajes del entorno en continuo cambio y transferir esta información a las generaciones posteriores, esta información epigenética heredada del padre puede contribuir a la adaptación evolutiva (Soubry 2015).

No solo los cambios fenotípicos que los progenitores masculinos hayan sufrido por

exposición a algunas clases de elementos, como pinturas, disolventes industriales, o los productos usados en la agricultura, en la guerra o por la radiación ionizante, sino también los efectos de la dieta paterna o del estilo de vida y la contaminación del medio ambiente, presentan efectos heredables a las generaciones posteriores (Soubry et al. 2014). Las consecuencias fisiológicas en hijos e incluso en nietos, con frecuencia, se han atribuido a daños o mutaciones en el ADN de las células germinales paternas. Esta idea viene apoyada porque algunas marcas epigenéticas adquiridas durante la espermatogénesis pueden ser mantenidas a través del desarrollo embrionario. Durante la gametogénesis, las marcas epigenéticas se crean de una manera específica de sexo, a partir de las células germinales primordiales (PGC) a los espermatozoides (SZ) (Niemitz y Feinberg 2004; Marques et al. 2011).

Los genes imprintados son genes candidatos perfectos para capturar y mantener los mensajes ambientales, ya que escapan al borrado de la metilación del ADN inmediatamente después de la fertilización. Sin embargo, otros genes, aún no identificados o genes promotores, no se pueden excluir de esta protección selectiva. La modificación de las histonas y/o la retención de otras proteínas o enzimas en secuencias específicas del ADN, son los posibles mecanismos para regular la herencia de los cambios epigenéticos inducidos por el medio ambiente (Jirtle y Skinner 2007; Miller et al. 2010; Jenkins y Carrell 2012).

En el embrión las células germinales primordiales pierden su marca epigenética a medida que migran a la cresta genital, la cual es el primer esbozo de las gónadas en el que todavía no hay diferenciación morfológica entre ambos sexos. Se produce, pues, un borrado completo, incluyendo el borrado de las regiones reguladoras de la metilación. Por lo tanto, en teoría, se crea un nuevo patrón epigenético en la metilación de segunda generación y está garantizada de una forma específica del sexo (Murphy y Jirtle 2003). Sin embargo, algunos estudios indican que son posibles las alteraciones epigenéticas "permanentes" inducidas por el medio ambiente; las células germinales pueden albergar esta información ambiental ancestral, como lo son las alteraciones epigenéticas, y, posteriormente, transferirla a las generaciones siguientes (Manikkam et al. 2013; Tracey et al. 2013).

Evidencias epidemiológicas de dos estudios multigeneracionales importantes han proporcionado la perspectiva de memoria epigenética de dietas ancestrales en períodos de angustia humana. El primero dado por Pembrey et al. (2006) y Pembrey (2010) examinaron datos de registros de varias generaciones en Överkalix, en el Norte de Suecia, usando datos de nacimientos y fallecimientos. La variación en la comida durante la etapa temprana de vida de los abuelos fue asociada con variaciones en la mortalidad (y muertes por diabetes) en sus

nietos. El aporte de alimentos del abuelo paterno se asoció con la tasa de mortalidad pero solo de los nietos, mientras que la alimentación en etapa temprana de la abuela solo se asoció con la tasa de mortalidad de las nietas. Curiosamente, los efectos observados se producían sólo cuando la exposición se dio antes de la pubertad, esto apoya la hipótesis de que la reprogramación de los gametos estaba involucrada.

Un trabajo realizado con niños en Gran Bretaña, en 2005, describió que los padres que habían comenzado a fumar antes de la edad de 11 años tenían un mayor riesgo de tener hijos con sobrepeso (Szyf 2015).

Estos datos sugieren que la información del medio ambiente obtenida en la vida temprana, cuando los espermatozoides paternos se están desarrollando, puede ser almacenada y transmitida a las generaciones siguientes.

La privación periconcepcional de nutrientes, especialmente durante la hambruna, se ha asociado con un mayor riesgo de obesidad en la descendencia (Ravelli et al. 1976), de hipertensión (Roseboom et al. 1999), de perfiles elevados de lípidos (Lumey et al. 2009), de enfermedades cardiovasculares y del cáncer (Painter et al. 2006). La exposición a estas condiciones nutricionales adversas se ha relacionado con la metilación anómala en la región reguladora de la IGF2 en la descendencia, después de más de cuarenta años (Heijmans et al. 2008). Del mismo modo, un estudio en niños de Gambia mostró que la metilación del ADN en varios alelos puede ser alterada por las circunstancias nutricionales estacionales en el momento de la concepción (Waterland et al. 2010). Estudios realizados en humanos para tratar de evidenciar que un efecto epigenético es inducido paternalmente a la descendencia a través de las condiciones nutricionales o del estilo de vida (Soubry et al. 2013 a y b; Soubry 2015), encontraron diferencias significativas en la metilación del ADN de diversas regiones en los hijos, si el padre era obeso. Los datos sugirieron una influencia transgeneracional de la dieta paterna (o la falta de ejercicio) en la descendencia a través del espermatozoide.

En modelos de ratones, (Anderson et al. 2006) ya habían observado un efecto transgeneracional en parámetros metabólicos relacionados con el crecimiento en la descendencia, si a los padres se les había sometido a una privación preconcepcional de alimentos.

Carone et al. (2010) describieron que los ratones machos que habían tenido una dieta baja en proteínas desde el destete (3 semanas de edad) hasta la madurez sexual dieron lugar a una descendencia con aumento de la metilación en un potenciador para un regulador clave de la alfa-PPAR, en el hígado.

También en ratones, Lambrot et al. (2013) proporcionaron pruebas de que la deficiencia de folato puede causar alteraciones de metilación del ADN espermático. El efecto fue analizado cuando se administró una dieta baja en folato a las madres durante el embarazo y la lactancia. En la descendencia de los hijos machos se observó metilación del ADN en sus espermias, los machos habían sido expuestos durante el desarrollo en el útero, cuando los patrones epigenéticos en las células germinales se empiezan a formar.

Las ratas macho alimentadas con una dieta alta en grasas, por ejemplo, engendraban hijas con metilación anómala del ADN del páncreas (Ng et al. 2010). Ratones machos alimentados con una dieta baja en proteínas tienen una descendencia con la expresión alterada de colesterol. Y los ratones machos con pre-diabetes tienen metilación en muchos de sus espermatozoides que los hacen anómalos, y transmiten un mayor riesgo de diabetes para las próximas dos generaciones (Wei et al. 2014).

Un equipo de investigación realizó estudios exponiendo ratas preñadas a grandes dosis de pesticidas y fungicidas, lo que llevó a daños de órganos en sus hijos adultos. El esperma de los descendientes machos mostraron cambios en la metilación del ADN que persistieron durante, al menos, cuatro generaciones (Anway et al. 2005).

Una investigación realizada en ratones, por Dias y Ressler en el año 2014, pudo determinar que el miedo asociado a un olor particular, afectaba a los animales y dejaba una huella en el cerebro de sus descendientes. En dicho estudio se expusieron ratones macho a la acción de la acetofenona (un producto químico con olor a almendra) y a la vez, se sometían a un ruido estresante en la jaula. Después de la exposición a este tratamiento, los ratones se volvieron temerosos ante el olor de la acetofenona aún cuando no recibieron ningún ruido. Más tarde, se permitió a los ratones aparearse con hembras que no habían sido expuestas al tratamiento. Cuando sus descendientes crecieron, muchos de los animales eran más sensibles a la acetofenona que a otros olores, y presentaban una mayor tendencia a asustarse por un ruido inesperado durante la exposición al olor. Sus descendientes (los nietos de los ratones entrenados para temer al olor) también fueron sensibles ante la presencia de acetofenona. Además, a lo largo de tres generaciones los descendientes tenían una mayor sensibilidad de lo normal. Los autores sugirieron que esta transmisión hereditaria de la información ambiental es el resultado de la epigenética, es decir, de cambios químicos en el genoma que afectan a al modo como se empaqueta y se expresa sin alterar su secuencia de ADN.

Explicar cómo funciona la epigenética transgeneracional ha sido difícil, en parte porque la mayoría de los estudios de seguimiento de los resultados (tales como cambios en la glucosa, el colesterol y la fertilidad), pueden ser afectados por una serie de factores, por lo que es

difícil de desentrañar la causa y el efecto. Pero el trabajo con la acetofenona se aprovecha de la biología específica y es que el producto químico se une a un receptor particular en la nariz que está codificado por un solo gen, denominado *Olf151*. Una posible explicación podría ser que la información sobre el olor se mete en los testículos del ratón y se traduce en una menor metilación del gen *Olf151* en el ADN del espermatozoide. Estos mismos investigadores utilizaron la fecundación *in vitro* para asegurarse de que el padre no era de alguna manera transmisor de un miedo a la acetofenona a través de interacciones con la madre. Es posible que los receptores *Olf151* en los espermatozoides respondan a las moléculas odorantes en el torrente sanguíneo y luego cambien la metilación del gen correspondiente en el ADN de los espermatozoides. Alternativamente, después de haber sido expuesto al olor y al dolor, un ratón puede producir moléculas de ARN (quizás en el cerebro) que se abren paso en el torrente sanguíneo y luego se dirigen selectivamente al gen *Olf151* en el espermatozoide (Szyf 2015).

Muchos estudios en plantas han hecho alusión a este tipo de actuación sistemática del ARN. Moléculas de ARN expresadas en la hoja de una planta, por ejemplo, pueden viajar a través de su sistema vascular a muchos de sus otros tejidos y afectar a la expresión del gen (Dunoyer et al. 2010).

Otros ejemplos claros de la impronta genética que afecta a la línea parental se conoce bien en los bóvidos y en particular en la especie *Bos taurus*. En esta especie se han visto genes que se encuentran implicados en fenómenos de impronta en el hipotálamo: los genes *PEG3*, *MEST/PEG1* y *NECDIN4* están sometidos a expresión monoalélica, exclusivamente paterna regulada por la impronta genética y son fundamentales para el desarrollo de los centros hipotalámicos. Otro gen muy bien descrito es el gen *IGF2*, factor de crecimiento ligado a la insulina, con efectos en el crecimiento y en el desarrollo. Este gen se expresa solo por línea paterna, mientras que está imprintado por línea materna. (Postiglioni et al. 2009 y 2011).

Pero la creación de una marca epigenética en el espermatozoide es sólo el primer paso. Para pasar a través de varias generaciones, la señal necesita sobrevivir a múltiples rondas de rigor; en los mamíferos, el primero de ellos se produce apenas unas horas después de la concepción, cuando la mayoría de la metilación del ADN se elimina de los espermatozoides en el embrión unicelular. Entonces, cuando el embrión se desarrolla y se divide y las células comienzan a diferenciarse en varios tipos de tejidos, se restablece gradualmente la metilación. Pero hay marcas de silenciamiento que permanecen en el óvulo y en el espermatozoide y se conservan en el embrión. Hay un creciente consenso de que en los espermatozoides hay más regiones de lo que se pensaba que escapaban de la reprogramación.

Por otra parte, incluso si el gen *Olf151* se escapa de la reprogramación, es difícil de explicar cómo podría dar lugar a una diferencia notable en el comportamiento de la descendencia. Estos mismos autores informaron que en el esperma de muestras de ratones entrenados para temer a la acetofenona, alrededor de 86 % de los espermatozoides presentaban metilación del *Olf151*, mientras que en los ratones entrenados para temer un olor diferente era alrededor de 95 de cada 100. Esta diferencia, aunque pequeña, es estadísticamente significativa. Y sin embargo, los efectos en el comportamiento en la segunda generación fueron robustos: cerca de la mitad de la descendencia de los animales entrenados para la acetofenona mostró una mayor sensibilidad al olor.

Es posible que los resultados de metilación en el estudio de olores sean simplemente un subproducto de un mecanismo diferente. Una ruta podría ser marcas químicas en las histonas. Acetilo y grupos metilo se pueden unir a las histonas y afectar a la expresión del ADN en las inmediaciones. Pero durante la formación de las células de esperma, el ADN es despojado de la mayor parte de sus histonas (y sus marcas concomitantes) y se envuelve alrededor de protaminas. Sin embargo, alrededor del 10% de las histonas humanas (y el 1% de los ratones) se conservan. Estos sitios pueden contener información de una generación a la siguiente. En los gusanos nematodos, ciertas marcas de las histonas se correlacionan con una larga vida útil y se pueden transmitir a través de varias generaciones (Greer et al. 2015).

Sin embargo, otros estudios apuntan a un mecanismo que implica moléculas de ARN cortas que se unen al ADN y afectan a la expresión génica.

Los microRNAs se expresan de forma diferente en el esperma de los hombres que no fuman (Marczylo et al. 2012). Y estos patrones de ARN pueden persistir a través de múltiples generaciones.

Si el mecanismo implica la metilación del ADN, la modificación de histonas o los ncARNs, es probable que el tema haga un gran progreso en los próximos años. Pero si es algo completamente nuevo, tal vez será necesario que pasen décadas para averiguarlo.

Explicar cómo funciona la epigenética transgeneracional ha sido difícil, en parte porque la mayoría de los estudios de seguimiento de los resultados (tales como cambios en la glucosa, el colesterol y la fertilidad) pueden ser producidos por una serie muy amplia de factores, por lo que es difícil de desentrañar la causa y el efecto.

IV.- Efectos de la dieta y la nutrición

Muchos de los ejemplos descritos en el apartado anterior muestran claramente los efectos que la nutrición puede causar sobre el fenotipo. Estos efectos ya habían sido estudiados ampliamente con respecto a las especies de animales. No cabe la menor duda, que desde el comienzo de la domesticación de éstos, la búsqueda de una mayor producción de alimentos pronto descubrió que la buena alimentación, junto con otros factores ambientales, como la higiene o la sanidad, daban lugar a una mayor producción (leche, carne, prolificidad, etc). Desde siempre se ha tenido en cuenta que la nutrición contiene señales que pueden inducir cambios fenotípicos.

Un ejemplo igualmente bien conocido se encuentra en las abejas. La jalea real está afectando al tipo de abeja que se va a formar. La producción de abejas reinas depende casi exclusivamente de la alimentación de las larvas. Las larvas que, durante todo su desarrollo, se alimentan de jalea real, la cual contiene altas concentraciones de proteínas y secreciones de las glándulas salivales de las abejas obreras, se formarán como abejas reinas con ovarios funcionales. Por el contrario, las larvas que son alimentadas con jalea real por cortos períodos de tiempo, se convertirán en abejas obreras sin ovarios funcionales. El consumo de jalea real causa altas tasas de síntesis de la hormona juvenil (JH) en la larva. Esta hormona retrasa la metamorfosis, permitiendo que la larva se desarrolle durante más tiempo, adquiera un mayor tamaño, y desarrolle ovarios funcionales.

Se ha demostrado que el cambio en los niveles de producción de la JH está correlacionado con el silenciamiento del gen *Dnmt3*, que induce una reprogramación del transcriptoma larval. El silenciamiento de este gen se produce por alteración en los niveles de metilación, por lo que es claro que la regulación epigenética es un componente clave para controlar la división social de labores en la colonia.

V.- Efectos dependientes de temperatura

Como la actividad enzimática depende, en gran medida, de la temperatura, también se conocen numerosos ejemplos de variaciones fenotípicas dependiendo de este factor. En algunas especies de mariposas se producen cambios en la coloración de las alas de acuerdo con la estación, debido a cambios en los niveles de la hormona ecdisona durante la etapa larval; las larvas que se desarrollan durante meses fríos están expuestas a niveles más bajos de ecdisona que las que se desarrollan en meses cálidos.

También en reptiles y peces, la temperatura puede determinar incluso el sexo. Por ejemplo, en cocodrilos, las temperaturas altas producen más hembras.

En los peces, el sexo está determinado por la relación entre dos hormonas, el estrógeno y la testosterona, esta relación está controlada por la enzima aromatasa, que convierte la testosterona en estrógeno. La temperatura puede regular la aromatasa y de esta manera determinar el sexo del organismo.

VI.- Efectos de la presencia de predadores

Algunos organismos pueden detectar la presencia de moléculas secretadas por sus predadores y usarlas para activar el desarrollo de estructuras que los hagan menos susceptibles a la depredación. Es el caso de los caracoles que pueden presentar una concha más gruesa, cuando son atacados por sus predadores.

Señales para cambiar el fenotipo también pueden venir de individuos conespecíficos, o miembros de la misma especie, pues los individuos deben comportarse de manera diferente cuando están solos que cuando están rodeados de competidores. Usualmente las señales de depredadores y conespecíficos actúan de manera sinérgica para producir el fenotipo más favorable (Klug et al. 2006).

VII.- La Epigenética y el cáncer

VII. 1.- Influencias de los factores epigenéticos en el cáncer

Tal como se ha ido anunciando en páginas anteriores, el cáncer tiene una base genética y una base epigenética. Los cambios genéticos son frecuentes en los tumores y contribuyen claramente al desarrollo de leucemias y de cáncer. Sin embargo, las alteraciones directas de los genes no son el único mecanismo que conduce a patrones de expresión génica desregulada durante la carcinogénesis, ya que las alteraciones epigenéticas están omnipresentes.

El modelo de células madre del cáncer sugiere que los cambios epigenéticos son los primeros eventos en la iniciación del cáncer. Este punto de vista está fuertemente apoyado por el descubrimiento de que el silenciamiento inducido por la metilación del ADN de genes supresores de tumores, se produce en las primeras etapas de la génesis del tumor (Jin et al. 2011).

Los cambios epigenéticos anómalos pueden ocurrir en las células normales bajo condiciones de estrés, tal como la inflamación crónica, antes de que surja el tumor (Feinberg et al. 2006; Zemach et al. 2010). Estos autores sugirieron que la interrupción de las marcas epigenéticas en células progenitoras es un factor determinante no sólo de riesgo de aparición de cáncer, sino también en el progreso y la heterogeneidad tumoral.

En la actualidad, muchos tipos de cáncer están siendo analizados para encontrar las causas de su génesis y los posibles tratamientos que bloqueen su multiplicación.

VII. 1. 1.- En el diagnóstico de la Leucemia mieloide aguda (LMA)

Ya se han descrito diversas mutaciones en los modificadores epigenéticos en esta patología humana; cambios que afectan a la transcripción de genes o a su expresión, sin modificar la secuencia del ADN. Como señalan Ohgami y Arber (2015), el efecto de estos cambios se ha identificado en los mecanismos epigenéticos de la metilación e hidroximetilación del ADN y en la modificación de histonas, sobretodo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ya ha incluido algunas de estas marcas epigenéticas en su categorización para el diagnóstico (Figuroa et al. 2010; Ohgami et al. 2012; Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Respecto a la metilación del ADN, la mutación del gen que codifica para la ADN metiltransferasa 3A (*DNMT3A*), que como se ha indicado anteriormente, está involucrada en la metilación *de novo* de los sitios CpG, está presente entre un 10 a un 25 % de las Leucemias mieloides agudas. La más común de estas mutaciones se produce en R882 y da lugar a un incremento en la proliferación celular (Yan et al. 2011).

Respecto a la hidroximetilación del ADN, se han identificado mutaciones en los genes *TET2*, *IDH1* y *IDH2*. Como se ha indicado anteriormente, el gen *TET metilcitosina dioxigenasa-2* (*TET2*) codifica para una proteína que está implicada en la transformación de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina. Entre un 5 a un 25% de las LMAs tienen mutaciones somáticas en este gen dando lugar a la pérdida de función. Las mutaciones de *TET2* pueden estar involucradas en la génesis de la leucemia ya que se han identificado en las etapas iniciales de la detección de la enfermedad (Ohgami y Arber 2015). En modelos de ratón, se ha demostrado que la pérdida de la función del gen *TET2* da lugar a un incremento de la mieloproliferación y de la expansión de los precursores mieloides (Ley et al. 2010; Yan et al. 2011; Gaidzik et al. 2013).

Los genes *isocitrato deshidrogenasa-1* (*IDH1*) y *-2* (*IDH2*) codifican para las enzimas NADP + que transforman el isocitrato a alfa-cetoglutarato en el ciclo de Krebs. Las mutaciones de ambos genes se presentan de un 15 a un 30 % de las LMAs y dan lugar a una nueva función

enzimática, permitiendo la conversión anómala de alfa-cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato (2-HG), esto es, la acumulación del metabolito 2-HG que, como se ha demostrado, inhibe la función *TET2*. Por tanto, en última instancia, se produce la inhibición de la hidroximetilación del ADN.

También están actuando las modificación de las histonas. Se han identificado mutaciones en los genes *EZH2*, *MLL* y *ASXL1*. El gen *EZH2* codifica para la enzima catalizadora del complejo represor PcG2 (PRC2) y está involucrado en la metilación de las colas de histonas; un incremento de la actividad de esta proteína conduce a una mayor condensación de la cromatina y a la supresión de la expresión génica. No obstante, las mutaciones de *EZH2* son raras en LMA (menos del 5%). El gen *MLL* codifica para la proteína MLL que es un modificador epigenético de las histonas a través de la metilación. Se ha identificado en el 5-10% de las LMAs. El gen *ASXL1* da lugar a la proteína de unión a la cromatina, que funciona para metilar lisinas histonas, este gen está mutado en el 5-30% de las LMAs (Ohgami y Arber 2015).

VII. 1. 2.- La metilación del ADN en el diagnóstico del cáncer

Con respecto al cáncer se han descrito numerosas alteraciones epigenéticas en el caso de la metilación del ADN, el mecanismo más ampliamente estudiado del control epigenético de la expresión génica es la hipometilación global en las células tumorales que conduce a una inestabilidad cromosómica (del genoma), inestabilidad que es fundamental para la carcinogénesis (Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Al mismo tiempo, se ha identificado la hipermetilación de regiones promotoras en una amplia mayoría de los genes supresores de tumores, que están fuertemente asociados con el desarrollo del tumor (Grossmann et al. 2012). Las células tumorales no solo se caracterizan por presentar la metilación del ADN, sino que también por presentar la modificación en la estructura de la cromatina (Ohgami y Arber 2015).

El afianzamiento de estos estudios ha revelado que la regulación epigenética reside en el carácter reversible de los cambios epigenéticos. Por lo que éstos pueden ser controlados químicamente mediante diferentes tratamientos.

De forma más intensa se han llevado a cabo dos tipos de tratamientos: mediante inhibidores de la ADN metiltransferasa y mediante inhibidores de la histona desacetilasa (Marks et al. 2000; Whang et al. 2012; Zhu et al. 2013; Kumar et al. 2014). Algunos de ellos ya han sido aprobados para uso clínico en el tratamiento de ciertas enfermedades (por ejemplo, azacitidina, decitabine, vorinostat, romidepsine y ruxolitinib), mientras que otros tratamientos están todavía bajo investigación, en diferentes fases de estudios preclínicos y clínicos; por

ejemplo, la lisina histona acetiltransferasa, lisina histona metiltransferasa, arginina histona metiltransferasa, poli inhibidores polimerasa (ADP-ribosa) (Arber et al. 2008; Ohgami y Arber 2015).

Además del potencial terapéutico, los cambios epigenéticos también se pueden emplear en el diagnóstico del tumor, en el pronóstico y en la evaluación en curso de la terapia anti-cáncer. Por ejemplo, la detección de la hipermetilación del gen septina 9 (*SEPT9*) en sangre se ha utilizado en los análisis del carcinoma colorrectal y la detección de la hipermetilación del gen S-transferasa p1 (*GSTP1*) en orina, se ha utilizado como un biomarcador del cáncer de próstata (Grimwade et al. 2010).

VII. 2.- La vía de señalización Wnt

La mayor parte de las vías de señalización que afectan a la proliferación, migración diferenciación y apoptosis celular, juegan un papel importante en el desarrollo embrionario pero también en la iniciación y progresión de tumores.

Los genes *Wnt* codifican para las proteínas Wnt que forman parte del grupo de moléculas de señalización en procesos biológicos y del desarrollo. Se han estudiado particularmente por su relación con procesos oncológicos y diversas condiciones paraneoplásicas. El nombre es una contracción del inglés *Wingless* e *Int*, que fueron los primeros genes identificados (Coombs et al. 2008; Willert y Nusse 2012).

Las proteínas Wnt son glucoproteínas de secreción que actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señal mediadas por receptores en organismos invertebrados y vertebrados. Hasta el momento se conocen cuatro vías de señalización Wnt, la mejor conocida es la llamada vía canónica o Wnt- β -catenina muy conservada evolutivamente, cuyos componentes están epigenéticamente controlados. (Tam et al. 2009).

La actividad de esta vía depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. Lo normal es que esta proteína se mantenga en bajas concentraciones en el citoplasma, gracias a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma. La llegada del ligando Wnt activa la vía e inhibe la fosforilación de β -catenina, y por ello, su degradación por ubiquitina-proteosoma. El incremento de β -catenina citoplasmática permite su entrada al núcleo en donde activa la transcripción de un grupo de genes cuyos productos proteicos participan en procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis.

La vía se interrelaciona con un número significativo de vías de señalización celular, entre ellas la vía Notch, que también tiene como objetivo central el coordinar el desarrollo de

órganos y mantener homeostasis de ciertos tejidos. También el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el transformante beta (TGF- β) interaccionan con la vía Wnt. (Serman et al. 2014).

En particular, una gama de cánceres humanos muestra niveles elevados de β -catenina nuclear, un sello distintivo de la señalización activa Wnt/ β -catenina.

Cada vez hay más evidencia, para una variedad de tumores malignos humanos, de que una inactivación epigenética de inhibidores de la vía WNT/ β -catenina se asocia con un resultado fenotípico favorable a tumores.

La señalización de Wnt anómala se ha convertido en un sello de algunos tipos de tumores sólidos, más notablemente el cáncer colorrectal y carcinomas hepatocelulares (Serman et al. 2014). Cuadro I, (tomado de Ochoa-Hernández et al. 2012).

Cuadro I.- Genes de la vía Wnt-beta catenina y su relación con diferentes tipos de cáncer

Gen	Defecto	Enfermedad o fenotipo asociado
<i>APC</i>	Pérdida de función	Poliposis adenomatosa familiar (FAP), cáncer colorrectal esporádico
<i>AXIN1</i>	Pérdida de función	Carcinoma hepatocelular, meduloblastomas esporádicos, cáncer colorrectal esporádico, carcinomas de células escamosas esofágicas.
<i>AXIN2</i>	Pérdida de función	Agnesia dental familiar, cáncer colorrectal, carcinoma escamosas esofágicas. de células escamosas de esófago, cáncer de colon, meduloblastoma y carcinoma hepatocelular.
<i>β-catenina</i>	Mutación oncogénica	Cáncer colorrectal esporádico, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer endometrial, cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

FRPs	Metilación	Cáncer colorrectal esporádico, cáncer pancreático, carcinoma de células renales.
TCF7L2	Actividad alterada	Cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer colonorrectal
TCF1	Expresión aumentada	Leucemia linfocítica crónica.
WNT16	Expresión aumentada	Leucemia linfocítica crónica.
WNT7A	Expresión alterada	Leucemias

La mayor parte de las alteraciones sufridas en inhibidores, factores nucleares, ligandos y moléculas de adhesión epitelial que actúan en la vía Wnt, están causadas por metilación del promotor de antagonistas de dicha vía lo que da lugar a la gran gama de cánceres que afectan a tejidos y órganos de todo el organismo.

Como la desregulación epigenética de la señal WNT/ β -catenina, con frecuencia, contribuye a la patogénesis tumoral, la identificación de los eventos epigenéticos anómalos que activan la vía WNT/ β -catenina puede proporcionar biomarcadores útiles para la detección del cáncer y la predicción del pronóstico.

La creciente lista de antagonistas WNT, implicados en los cánceres humanos, silenciados epigenéticamente indica un papel importante para los eventos de inactivación epigenéticos en la iniciación y la progresión del tumor. Los cambios epigenéticos (metilación del gen promotor o metilación/desacetilación de histonas) son farmacológicamente reversibles, mediante la utilización de agentes epigenéticos, como inhibidores de la ADN metiltransferasa (la 5-aza-2'-desoxicitidina, Zebularin) e inhibidores de la histona desacetilasa (TSA, SAHA y PXD101) (Cheng et al. 2004; Tao y Chang 2007).

Ya se han descrito un buen número de agentes experimentales que se han evaluado en su capacidad para inhibir la vía de señalización Wnt. Un ejemplo de ello es una acetil transferasa unida a la membrana que inhibe la actividad de porcupine, molécula decisiva para la síntesis de Wnt. Una segunda molécula inhibe la destrucción de axina, molécula que funciona como un supresor natural de la señalización Wnt. Otra molécula, ICG-001, inhibe selectivamente la vía de señalización Wnt bloqueando la unión de B-catenina a la proteína de unión del elemento de respuesta al AMP cíclico. El tratamiento con el ICG-001 en líneas celulares de cáncer de colon se resolvió en apoptosis (Serman et al. 2014). También se ha observado que los antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina y el sulindaco,

inhiben la actividad de la ciclooxigenasa, por lo que algunos experimentos y estudios epidemiológicos sugieren que la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroides tienen efectos quimioprotectores contra el cáncer de colon. En estudios preclínicos se han ensayado otros compuestos, usando como blanco el dominio PZD de la proteína Dishevelled; entre ellos están las moléculas NSC668036 y FJ9. Dishevelled es una proteína clave en la vía de señalización Wnt porque conduce señales extracelulares. Otros mecanismos utilizados son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas Wnt y contra los receptores Fzd (Ochoa-Hernández et al. 2012).

VII. 3.- La vía de transducción de señales Notch

El desarrollo de un organismo pluricelular después de la fusión de los gametos y de la aparición de las tres capas germinales del embrión, está controlado por la vía de transducción de señales Notch, la cual se encuentra evolutivamente conservada (Bravo y Baizabal 2005). La activación de esta vía se inicia cuando interactúan ciertas proteínas de membrana de dos células adyacentes. Se ha demostrado que esta interacción coordina una amplia variedad de procesos durante el desarrollo temprano y tardío del embrión, principalmente en la citodiferenciación y la organogénesis (Artavanis-Tsakonas et al. 1999), tales procesos dan origen a un organismo complejo y funcional con células altamente especializadas.

Además, Notch participa en el funcionamiento fisiológico adecuado del organismo, desde la etapa de feto hasta la de adulto (Gerhart 1999; Mumm y Kopan 2000), coordinando las funciones de las células diferenciadas. Esto sugiere que la respuesta celular mediada por Notch depende del entorno celular en que se recibe el estímulo.

Las proteínas que componen la vía Notch se pueden clasificar en dos grupos. En el primero, se ubican las proteínas que funcionan como ligandos, receptores, represores, corepresores y factores de la transcripción, las cuales constituyen el núcleo de la vía y son las que transducen la señal. En el segundo grupo, se incluyen las proteínas reguladoras que modulan la respuesta celular e influyen en la duración de la señal recibida, modificando de manera directa las proteínas integrantes del primer grupo por medio de las actividades de las enzimas glucosiltransferasa, proteasa, metaloproteasa y ubiquitina-ligasa (Baron et al. 2002; Baron 2003).

La ruta de señalización Notch que está involucrada, por tanto, en el desarrollo y en la renovación de tejidos, juega un papel en la proliferación del cáncer. Recientemente se han desarrollado estudios en *Drosophila* que han permitido comprender mejor la relación de

Notch y la formación de tumores. Merced a estos estudios se ha podido determinar que los receptores de Notch en los mamíferos y los ligandos de Delta están involucrados en la formación de tumores. Una activación aberrante del receptor NOTCH1 está relacionada con el 50% de los tipos de leucemia linfoblástica aguda de células T (Bravo y Baizabal 2005).

Si se inactiva la vía de transducción de Notch se incrementa la formación de tumores, ya que se ha visto que en ciertos contextos Notch puede ser un supresor de tumores.

Sin embargo, aún no se tiene un conocimiento muy claro de cómo actúa Notch *in vivo* en la formación del cáncer. Por esta razón los estudios se están enfocando en la identificación de los oncogenes y los supresores tumorales que interactúan con las vías de Notch.

La regulación y actuación de los eventos epigenéticos se ha observado en varios tipos de cáncer y en otras enfermedades humanas.

La comprensión de cómo el epigenoma contribuye a la regulación de genes dará, en un futuro no muy lejano, una mayor comprensión de las enfermedades humanas.

VIII.- Biomarcadores epigenéticos

Los conocimientos que sobre Epigenética se van adquiriendo, además de ir engrandeciendo el saber de la Ciencia, también se aplican en beneficio de todos, como decía nuestro gran Premio Nobel, Severo Ochoa: *“La Ciencia vale la pena porque, además, tarde o temprano sus descubrimientos siempre se aplican”*.

De aquí la importancia de ir identificando biomarcadores epigenéticos. La palabra biomarcador hace referencia a cualquier tipo de variación que ocurra en el material genético.

Para la detección de modificaciones epigenéticas se han desarrollado marcadores que se encargan de detectar moléculas que se relacionen con un estado particular de activación o inactivación de un gen. Por ejemplo, la detección de una alta cantidad de moléculas de metilo, indica un estado de inactivación del gen.

Tras el conocimiento de la implicación de las variaciones epigenéticas en numerosas patologías, se ha dirigido la atención hacia el desarrollo de nuevos marcadores para su detección. En esta dirección se están desarrollando numerosas investigaciones y ensayos con el fin de detectar los cambios en la metilación del ADN, en la modificación de histonas o la presencia de los ncARNs, relacionados con las patologías. Del conjunto de biomarcadores que se están desarrollando destacan en primer lugar los que exploran en sangre o saliva u otros fluidos corporales, la presencia de metabolitos relacionados con los cambios epigenéticos.

La mayoría de los biomarcadores desarrollados inicialmente se refieren a las alteraciones de la metilación del ADN, que pueden implicar a un número importante de genes. Dada su estabilidad, la metilación de las islas CpG constituye un biomarcador epigenético muy favorable, lo que permite diseñar métodos para detectar las señales del ADN metilado de regiones específicas del genoma usualmente no metiladas.

En principio se han diseñado tres tipos de marcadores, como señala Juvé de la Barreda (2010): a) el análisis basado en la acción de endonucleasas de restricción sensibles a la metilación; b) el análisis basado en la acción del bisulfito; y c) el análisis de SNUPE (= Single Nucleotide Primer Extension) o método modificado de la acción del bisulfito.

Una metodología diseñada para analizar el ADN genómico metilado es la PCR específica para este tipo de ADN (MSP = Methylation Specific PCR) (Campan 2009).

En la metodología del bisulfito de sodio, residuos de citosina no metilada se convierten en uracilo (desaminación oxidativa), que posteriormente se reconoce como timina, mientras que la citosina metilada se mantiene como 5-metilcitosina. La secuencia diana es entonces amplificada con cebadores de PCR específicos para el método bisulfito modificado (Frommer et al. 1992).

Por ejemplo, en nuestro grupo de investigación estamos interesados en la especie bovina (*Bos taurus*). En esta especie, la anomalía cromosómica estructural denominada translocación robertsoniana 1/29, se forma cuando dos cromosomas autosómicos, el cromosoma 1 y el 29, están fusionados a nivel del centrómero, sin pérdida aparente de material cromosómico, pero causante de un descenso considerable de la fertilidad en los portadores. Esta anomalía se presenta con una alta frecuencia en la mayoría de las razas bovinas existentes en todo el mundo (Gustavsson, 1964; Arruga et al. 1983; Arruga 1987; Arruga y Zarazaga 1987; Ducos et al. 2008). Muchas investigaciones han sido llevadas a cabo, con el objetivo de conocer la causa de la misma e identificar la existencia de algún marcador que pudiera estar implicado en su elevada frecuencia. Con este objetivo, nuestro grupo comenzó el estudio de identificar posibles marcadores epigenéticos en alguno de los dos cromosomas afectados por la translocación. Nos centramos en uno de los genes implicados en la síntesis del colágeno, el gen tipo *VIII- α 1* (*Col8A1*) situado en el cromosoma 1, en concreto en la región cromosómica BTA1q45. Para ello, se realizó un estudio "in silico" para la detección de islas CpG en el promotor de este gen y así identificar supuestos objetivos de metilación. Se utilizó el método de modificación del bisulfito (las citosinas no metiladas son convertidas a uracilo) y después se realizó una amplificación de la secuencia específica de metilación mediante PCR, seguida de secuenciación (MSP) para comparar los patrones de metilación diferencial en el promotor

Col8A1 bovino, en animales control, sin la translocación, y en animales portadores de la translocación. Nuestros resultados descartaron la presencia significativa de marcas epigenéticas de metilación en los animales portadores con relación a los animales normales, pero sirvió también para detectar las marcas epigenéticas de metilación del ADN en este cromosoma bovino. Este estudio deberá continuar con la búsqueda de otros marcadores que señalen la causa y la resolución de esta alteración. (Postiglioni et al. 2009 y 2011).

Estos objetivos de conocer e identificar la situación de las marcas epigenéticas no han hecho más que comenzar. Nuevos y mejores métodos están siendo desarrollados con este fin. Varias empresas del sector ofrecen microarrays para los análisis de las secuencias metiladas en humana, incluyendo gran número de regiones del genoma que abarca 385.000 secuencias, con las regiones promotoras de múltiples genes candidatos (Jouvé de la Barreda 2010), o el detectar diferencias en la metilación en los sitios específicos CpG con una resolución de una sola base nucleotídica para lo que hay numerosos kit específicos, desarrollados por diferentes empresas comerciales.

En el caso del cáncer los biomarcadores pueden ser útiles no sólo para identificar la presencia de un tumor sino también para determinar su estado, subtipo y la capacidad de respuesta a determinadas terapias.

Así, por ejemplo, las modificaciones epigenéticas del promotor de los genes implicados en la síntesis de los inhibidores de kinasa dependientes de ciclinas *p15*, *p16* y *RASSF1A*, que funcionan como genes supresores, son biomarcadores potencialmente muy valiosos para el diagnóstico precoz y preclínico del carcinoma hepatocelular (Herath et al. 2006; Rivenbark y Coleman 2007).

La búsqueda de biomarcadores epigenéticos capaces de detectar alteraciones epigenéticas en genes relacionados con enfermedades, debidas a efectos del ambiente, está siendo cada día más ampliada. Un campo de investigación de gran trascendencia es el relativo al equilibrio fisiológico interno en el claustro materno-fetal durante la gestación. Se está desarrollando un biomarcador epigenético, detectable en tejidos fetales, asociado al riesgo de asma en niños nacidos tras una gestación en zonas altamente contaminadas. El biomarcador podría detectar la alteración epigenética del ADN en la sangre, debida a la metilación del gen *ACSL3*, que está implicado en el metabolismo de los ácidos grasos catalizado por la enzima acetil coenzima-A sintetasa. La alteración epigenética de este gen durante la gestación se debe a una exposición a niveles por encima de lo normal de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs). Este contaminante ambiental se produce por la combustión incompleta de fuel y está presente en las zonas de tráfico elevado (Jouvé de la Barreda 2010; Perera et al. 2012).

El segundo tipo de modificaciones epigenéticas que ha motivado la búsqueda de biomarcadores son las que afectan a las histonas. Todas las histonas (H3, H4, H2A, H2B y H1) se pueden aislar con HPLC, y se pueden analizar las fracciones por diferentes métodos cromatográficos y espectrofotométricos.

Actualmente el método más utilizado es el uso de *chips* con anticuerpos contra modificaciones específicas de las histonas. Mediante modificaciones de esta tecnología se han llegado a analizar hasta cien tipos de células diferentes con una aplicación particular en el diagnóstico del cáncer (O'Neill et al. 2006).

También se han elaborado biomarcadores epigenéticos para la detección y monitorización temprana de la enfermedad lupus (Juvé de la Barreda 2010). Como es sabido, es una patología autoinmune crónica en la que las células B del sistema inmunológico desarrollan anticuerpos que atacan a los órganos y tejidos del propio paciente.

Los niveles de metilación de determinados genes están asociados con la aparición del lupus (Richardson 2007). Los pacientes de lupus presentaban un conjunto de 40 micro-ARNs con una sobreexpresión de 1,5 veces con respecto a los individuos sanos. Las variaciones en la presencia de los micro-ARN en estos enfermos están asociadas a la presencia de enzimas desacetilasas que promueven la desacetilación de las histonas que se asocian a los genes que intervienen en el lupus. Debido a ello se está ensayando la utilización de inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDI) para su tratamiento. Se diseñaron dos fármacos: Trichostatin A (HDI-TSA) y el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), con resultados positivos (Juvé de la Barreda 2010).

Estos y otros muchos ejemplos se están desarrollando actualmente y no cabe la menor duda de que los objetivos de conocimiento y aplicación de los mismos en beneficio de la humanidad, se lograrán en un futuro próximo.

Un factor clave en este campo es la heredabilidad de la marca epigenética de una generación a otra, lo que permite aumentar el éxito de las terapias génicas.

Estos últimos descubrimientos han llevado a considerar no sólo la expresión de los genes, sino también la manera en que dicha expresión puede ser modificada por factores ambientales. Esta interacción genes – ambiente es necesaria para que actúen los mecanismos que regulan y producen un fenotipo normal y equilibrado, pero también, como se ha señalado, son el origen de muchas patologías. La regulación epigenética se hace por medio de cambios, como es la adición de metilos, la modificación de histonas o los efectos de los ncARNs. Todo ello puede llevar a que se den alteraciones en los lugares de acción de las enzimas, y como resultado, se

pueden tener pérdidas en la estabilidad de dichas regiones. Por lo tanto, estas regiones se vuelven más sensibles a que en ellas se den variaciones cromosómicas o que se llegue a transformar la célula por pérdidas en el mecanismo de control de crecimiento o por activación de la apoptosis y dar lugar a cambios en el fenotipo y a una alta posibilidad del desarrollo de anomalías y por ende también a enfermedades.

El futuro está abierto.

Como dijo Louis Pasteur: *“La Ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”*.

La Epigenética no se opone a la Genética, sino que discurre paralela a ella. Sin Genética, no hay Epigenética; y ésta no puede sustituir a la primera. Oponer Epigenética a Genética es un absurdo: la mutación de un gen que codifica una ADN metilasa modificada y las marcas epigenéticas son un evento genético.

No es una respuesta contundente contra los que apoyan el determinismo genético, y echa por tierra todo el conocimiento anteriormente alcanzado. Lo que sabemos es que el genoma no es el único actuante; como hemos ido viendo en numerosos ejemplos, y otros muchos más que se conocen, hay mucho más que la simple información de bases nitrogenadas del ADN en la expresión de los genes. El reto ahora, es llegar a conocer con claridad cómo interactúan los genes entre sí y con el ambiente y cómo y por qué se crean las marcas epigenéticas que se heredan a las generaciones siguientes sin modificar el ADN.

La Epigenética también lleva la esperanza de ver abolida la distinción estricta establecida por Descartes entre alma y cuerpo, materia y espíritu; y el olvido de la pérdida progresiva del control de nuestro cuerpo por nuestra mente y nuestra voluntad que ha acompañado el desarrollo de la neurobiología. Los títulos y la presentación de las obras recientes dedicadas a la epigenética son reveladores. Como Zammatteo (2014) explora en su libro: *El Impacto de las emociones sobre el ADN*, o como Church (2013) afirma que "los genes se activan o inactivan de acuerdo con nuestras creencias, nuestras emociones y actitudes".

El psicoanálisis y la psicosomática han buscado durante décadas demostrar la influencia de la "psíquis" en la evolución de las enfermedades. Lo que faltaba era un mecanismo que la Epigenética parece poder ofrecer. La Epigenética parece, así, ser portadora de una revolución en materia de salud y bienestar. En particular, muchas enfermedades que nos afectan durante la vida serían la consecuencia de eventos precoces que dejaría sobre el cuerpo su firma epigenética.

Y como todo en Ciencia, se abren nuevos horizontes que a su vez, cuando éstos se logren, volverán a abrirse otros nuevos. Esta es la grandeza y el reto que significa hacer Ciencia y esto es lo que señala la enorme magnitud del pensamiento y la razón humana que desea con todas su fuerzas ir avanzando y profundizando en el saber y el conocer, en definitiva en hacer Ciencia.

Y terminamos como hemos comenzado, con un pensamiento de Aristóteles: “*La esperanza es el sueño del hombre despierto*”, como despiertos hemos de estar los hombres y las mujeres de Ciencia.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185–188.
- Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. 2006. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* 22:327-331.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308(5727):1466-1469.
- Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A, Thiele J, Bloomfield CD. 2008. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, (eds). Geneva, Switzerland. WHO Press:110–123.
- Arruga MV, Zarazaga I, Vallejo M. 1983. Anomalías estructurales en cromosomas de ganado vacuno: Fusión céntrica 1/29 e inv (25). *Anal Fac Vet Zaragoza XVIII-XIX (18-19):*163-164.
- Arruga MV. 1987. Chromosome analysis of 27 cattle breeds in Spain. *J Dairy Sci*: 70 (suplem. 1):237.
- Arruga MV, Zarazaga I. 1987. La translocación Robertsoniana 1/29 en el ganado vacuno. Su incidencia en las razas vacunas españolas. *Genét Ibér* 39 (1-2):61-75.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal

- integration in development. *Science* 284:770-776.
- Baron M, Aslam H, Flasz M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB. 2002. Multiple levels of Notch signal regulation. *Molec Membrane Biol* 19:27-38.
- Baron M. 2003. An overview of the Notch signaling pathway. *Sem Cell Devel Biol* 14:113-119.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Bell JT, Spector TD. 2011. A twin approach to unravelling epigenetics. *Trends Genet* 27(3):116-125.
- Bender J. 2001. A vicious cycle. RNA silencing and DNA methylation in plants. *Cell* 106:129-132.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23:781-783.
- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells: the carboxylterminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203(4):971-83.
- Bestor TH, Tycko B. 1996. Creation of genomic methylation patterns. *Nat. Genet.* 12:363-367.
- Bestor TH. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402.
- Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. 2010. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463(7284):1042-1047.
- Bird A, Wolffe AP. 1999. Methylation-induced repression- Belts, braces and chromatin. *Cell* 99:451-454.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gen Develop* 16:6-21.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.
- Bonenfant D, Towbin H, Coulot M, Schindler P, Mueller DR, van Oostrum J. 2007. Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 6(11):1917-1932.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. 2001. Dnmt3L and the establishment of

- maternal genomic imprints. *Science* 294(5551):2536-2539.
- Bousiges O. et al. 2010. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 35(13):2521-2537.
- Bravo A, Baizabal VM. 2005. La vía de señalización NOTCH y el desarrollo embrionario animal *REB* 24(3,4):87-96.
- Campan M, Weisenberger DJ, Trinh B, Laird PW. 2009. MethyLight. *Methods Mol Biol* 507:325-337.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368:2059–74.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ. 2010. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143:1084-1096..
- Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.
- Cedar H, Bergman Y. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10(5):295-304.
- Cerutti H, Casas-Mollano JA. 2009. Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects? *Epigenetics* 4(2):71–75.
- Church D. 2013. Le génie dans vos genes: médecine épigénétique et nouvelle biologie de l'intention, Dangles.
- Crouse HV. 1960. The controlling element in sex chromosome behavior in *Sciara*. *Genetics* 45:1429-1443.
- Chan MF, van Amerongen R, Nijjar T, Cuppen E, Jones PA, Laird PW. 2001. Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in dnmt1-deficient embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21:7587–7600.
- Chatterjee A, Eccles M. 2015. DNA methylation and epigenomics: new technologies and emerging concepts. *Genom Biol* 16:103.
- Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. 2001. Deficiency of methyl-CpG binding

- protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27:327–331.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395:89–93.
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G. 2004. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 6:151-158.
- Cheng X, Kumar S, Posfai J, Pflugrath JW, Roberts RJ. 1993. Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74(2):299–307.
- Chi P, Allis CD, Wang GG. 2010. Covalent histone modifications: miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 10(7):457-469.
- Chim CS, Chan WW, Pang A, Kwong YL. 2006. Preferential methylation of Wnt inhibitory factor-1 in acute promyelocytic leukemia: an independent poor prognostic factor. *Leukemia* 20:907-909.
- Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV. 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* 466(7304):388-392.
- Clark SJ. 2007. Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 1:88-95.
- Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R. 1990. *Floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63:1311-1322.
- Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. 1996. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA–DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 15:3153–3163.
- Coombs GS, Covey TM, Virshup DM. 2008. Wnt signaling in development, disease and translational medicine. *Curr Drugs Targets* 9 (7):513–531.
- Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, Muegge K. 2001. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genomewide methylation. *Gen Dev* 15:2940–2944.
- Dias BG, Ressler KJ. 2014. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* 17(1):89-96.
- Ducos A, Pinton A, Garnier-Bonnet A, Molteni I, Slota E, Switonski M, Kovacs A, Hidas A, Revay T, Arruga MV, van Haeringen WA, Nicolae I, King WA, Iannuzzi I. 2008. Large scale chromosomal screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet*

Genome Res 120 (1-2):26-41.

- Dunoyer P, Schott G, Himber CH, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O. 2010. Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science* 328(5980):912-916
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200.
- Epigenomics Help. Bethesda (MD). 2014. National Center for Biotechnology Information (US). 2010 Sep 2 (Actualizado el 2 de junio de 2014).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45786/?report=reader>
- Fabia J, Thuy TD. 1974. Occupation of father at time of birth of children dying of malignant diseases. *Br J Prev Soc Med* 28:98-100.
- Fan Y, Nikitina T, Zhao J, et al. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123(7):1199-1212.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7(1):21-33.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92.
- Figuroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Grealley JM, Valk PJ, Lowenberg B, Delwel R, Melnick A. 2010. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 17:13-27.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-811
- Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stolzle A, Spath D, Kuendgen A, von Lilienfeld-Toal M, Brugger W, Derigs HG, Kremers S, Greil R, Raghavachar A, Ringhoffer M, Salih HR, Wattad M, Kirchen HG, Runde V, Heil G, Petzer AL, Girschikofsky M, Heuser M, Kayser S, Goehring G, Teleanu MV, Schlegelberger B, Ganser A, Krauter J, Bullinger L, Dohner H, Dohner K. 2013. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML study group (AMLSG). *Blood* 121:4769-4777.
- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in

- mammals. *Nat. Genet.* 18:56-59.
- Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham T, Schilling E, Klug M, Andreessen R, Rehli M. 2006. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. *Cancer Res* 66:6118-6128.
- Gerhart J. 1999. Signaling pathways in development. *Teratology* 60:226-239.
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10:94-108.
- Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. 2000. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 24:368-371.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. 2006. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311(5759):395-398.
- Gräff J. and Mansuy IM. 2009. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci* 30(1):1-8.
- Graves JA. 1982. 5-Azacytidine-induced re-expression of alleles on the inactive X chromosome in a hybrid mouse cell line. *Exp Cell Res* 141:99-105.
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizabal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He Ch, Shi Y. 2015. DNA methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell* 161:1-11.
- Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, Schmid C, Wendtner CM, Staib P, Serve H, Kreuzer KA, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. 2012. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 120:2963-2972.
- Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. 2007. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721-33.
- Gustavsson I, Rockborn G. 1964. Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. *Nature* 203:990-990.
- Hansen RS, Stoger R, Wijmenga C, Stanek AM, Canfield TK, Luo P, Matarazzo MR, D'Esposito M, Feil R, Gimelli G. 2000. Escape from gene silencing in ICF syndrome: Evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet* 9:2575-2587.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey

- LH. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci* 105:17046-17049.
- Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A. 2001. Closely related proteins Mbd2 and Mbd3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 15:1613–1618.
- Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. 2006. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 21:15-21.
- Holliday R, Pugh JE. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 186:226-232.
- Hsieh CL. 1999. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 19:8211-8218.
- http://www.sebbm.es/archivos_tinymce/septiembre2010_teresaroldan.pdf
- <http://www.roadmapepigenomics.org>
- Hughes V. Epigenetics: The sins of the father. 2014. *Nature*. 507(7490):22-24.
- Issa JP. 2000. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 249:101-118.
- Izant JG, Weintraub H. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36:1007-1015.
- Jaenisch R, Harbers K, Jahner D, Stewart C, Stuhlmann H. 1982. DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *J Cell Biochem* 20:331–336.
- Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledeist F, Fischer A, Viegas-Pequignot E. 1993. An embryoniclike methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2:731-735.
- Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ. 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SW12/SNF2-like protein. *Nat Genet* 22:94-97.
- Jenkins TG, Carrell DT. 2012. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 143:727-734.
- Jeong S, Liang G, Sharma S. 2009. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol* 29(19):5366-5376.
- Jin B, Li Y, Robertson D. 2011. DNA methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?. *Gen Cancer* 2(6):607-617.

- Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8:253-262.
- Jones PA, Taylor SM. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogues and DNA methylation. *Cell* 20:85-93.
- Jones PA. 1999. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 15(1):34-37.
- Juvé de la Barreda N. 2010. Biomarcadores epigenéticos. 3. Monografías de la Real Academia de Farmacia. Pags: 85-112.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Gen Dev*. 6: 705-714.
- Keohane AM, O'Neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. 1996. X-inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* 180:618-630.
- Kisseljova NP, Kisseljov FL. 2005. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 70(7):743-752.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer ChA. 2006. *Conceptos de Genética*. Ed. Pearson. Prentice Hall.
- Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M. 2000. Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: Hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet* 9:597-604.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Kress C, Thomassin H, Grange T. 2001. Local DNA demethylation in vertebrates: How could it be performed and targeted? *FEBS Lett* 494:135-140.
- Kriaucionis S, Heintz N. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324(5929):929-930.
- Kumar P, Tripathi S, Pandey KN. 2014. Histone Deacetylase Inhibitors Modulate the Transcriptional Regulation of Guanylyl Cyclase/Natriuretic Peptide Receptor-A Gene. Interactive roles of modified histones, histone acetyltransferase, p300, and Sp1. *J Biol Chem* 289 (10):6991-7002.
- Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, Suderman M, Hallett M, Kimmins S. 2013. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun* 4:2889.

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363:2424-2433.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
- Linnaeus C. 1740. *Systema Naturae*. Estocolmo, 2^a ed.
- Liu WM, Marais RJ, Rubin CM, Schmid CW. 1994. Alu transcripts: Cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 22:1087-1095.
- Lock LF, Takagi N, Martin GR. 1987. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* 48:39-46.
- Lumey LH, Stein AD, Kahn HS, Romijn JA. 2009. Lipid profiles in middle aged men and women after famine exposure during gestation: the Dutch Hunger Winter Families Study. *Am J Clin Nutr* 89:1737-1743.
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R. 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408: 538-540.
- MacLeod D, Clark V, Bird A. 1999. Absence of genomewide changes in DNA methylation during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Nat. Genet.* 23: 139-140.
- Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One* 8:55387.
- Marczylo E, Amoako AA, Konje JC, Gant TW, Marczylo TH. 2012. Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: a potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics* 7:432-439.

- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. 2000. Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J Natl Cancer Inst* 92(15):1210-1216.
- Marques CJ, Joao Pinho M, Carvalho F, Bieche I, Barros A, Sousa M. 2011. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 6:1354-1361.
- Martienssen RA, Colot V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293:1070-1074.
- Mateen S, Raina K, Agarwal Ch, Chan D, Agarwal R. 2013. Silibinin Synergizes with Histone Deacetylase and DNA Methyltransferase Inhibitors in Upregulating E-cadherin Expression Together with Inhibition of Migration and Invasion of Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 345:206-214.
- Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. 2009. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays* 31:51-59.
- Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. 2001. RNA: Guiding gene silencing. *Science* 293:1080-1083.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501-502.
- Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR. 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med* 13:269-277.
- Miao VP, Freitag M, Selker EU. 2000. Short TpA-rich segments of the region induce DNA methylation in *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* 300:249-273.
- Miller C.A, Sweatt DJ. 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53:857-869.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. 2010. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139: 287-301.
- Miniou P, Jeanpierre M, Blanquet V, Sibella V, Bonneau D, Herbelin C, Fischer A, Niveleau A, Viegas-Pequignot E. 1994. Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 3:2093-2102.
- Mohn F, Weber M, Rebhan M. 2008. Lineagespecific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30(6):755-766.

- Mumm JS, Kopan R. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228:151-165.
- Murphy SK, Jirtle RL. 2003. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 25:577-588.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292: 110-113.
- NCBI. 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics/?term=MyCollection>
- Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. 2009. MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 21:470-479.
- Nelson VR, Nadeau JH. 2010. Transgenerational genetic effects. *Epigenomics* 2:797-806.
- Nestler EJ. 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 76 Pt B:259-268.
- Ng RK, Gurdon JB. 2008. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* 7:1173-1177.
- Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. 2010. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467:963-966.
- Ng SF, Lin RC, Maloney CA, Youngson NA, Owens JA, Morris MJ. 2014. Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J*. 28:1830-1841.
- Niemitz EL, Feinberg AP. 2004. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* 74:599-609.
- Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. 2012. La vía de señalización Wnt-y su relación con el cáncer. *Cir Cir* 80:389-398.
- O'Neill T, Penm J, Penm J. 2008. Breast Cancer Diagnosis by using a Subset Neural Networks Approach. in TJ O'Neill, JPenm, RD Terrell (ed.), *Collaborative Research in Electronic Healthcare - Bioinformatics, Pharmacy Informatics and Computing*, Evergreen Publishing, Canberra Australia. 18pp.
- Ohgami RS, Arber DA. 2015. The diagnostic and clinical impact of genetics and epigenetics in acute myeloid leukemia. *Int Jnl Lab Hem* 37 (Supl. 1):122-132.
- Ohgami RS, Ma L, Ren L, Weinberg OK, Seetharam M, Gotlib JR, Arber DA. 2012. DNA methylation analysis of ALOX12 and GSTM1 in acute myeloid leukaemia identifies

- prognostically significant groups. *Br J Haematol* 159:182-190.
- Ohm JE, Baylin SB. 2007. Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle* 6(9):1040-1043.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257.
- Okano M, Xie S, Li E. 1998. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 26:2536-2540.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, et al. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448(7154):714-717.
- Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, Simmers TA, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP, Roseboom TJ. 2006. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 84:466-467.
- Peixoto L, Abel T. 2013. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* 38(1):62-76.
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J. 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14:159-166.
- Pembrey ME. 2010. Male-line transgenerational responses in humans. *Hum. Fertil* 13:268-271.
- Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, Calafat AM, Xiong W, Rauh V, Wang S. 2012. Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environ Health Perspect* 120:1190-1194.
- Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA. 2006. Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* 313:533-536.
- Pollack Y, Stein R, Razin A, Cedar H. 1980. Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:6463-6467.
- Popp C, Dean W, Feng S, et al. 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463(7284):1101-1105.
- Portoso M, Cavalli G. 2008. The Role of RNAi and Noncoding RNAs in Polycomb Mediated Control of Gene Expression and Genomic Programming". In Morris KV. *RNA and the Regulation of Gene Expression: A Hidden Layer of Complexity*. Caister Academic Press.

- pp. 29–44. ISBN 978-1-904455-25-7.
- Postiglioni A, García CB, Rincón G, Arruga MV. 2009. ¿Qué es la impronta genética?. *Albeitar* 130:42-43.
- Postiglioni A, García CB, Rincón G, Arruga MV. 2011. Methylation specific PCR analysis in *COL8A1* promoter in Creole cattle carrier of rob (1;29). *Electron J Biotechnol* 14 (3): <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue3-fulltext-12>
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. 1999. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274:33002-33010.
- Price WA. 1939. *Nutrition and Physical Degeneration*, 21 ed. Price-Pottenger Nutrition Foundation.
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:192-206.
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. 2001. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15(13):1613-1618.
- Proyecto Genoma Humano. 2004. *Nature* 431:931-945.
- Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, et al. 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123(2):233-248.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP. 2009. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(3):671-678.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295:349-353.
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093.
- Richardson B. 2007. Primer: epigenetics of autoimmunity. *Nat Clin Rheumatol* 3:521-527.
- Riggs AD. 1975. X-inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14:9-25.
- Rivenbark AG, Coleman WB. 2007. The use of epigenetic biomarkers for preclinical detection of hepatocellular carcinoma: potential for noninvasive screening of high-risk populations. *Clin Cancer Res* 13(8):2309-2312.

- Roldán T. 2010. Epigenética: entre la estabilidad del genotipo y la plasticidad del fenotipo. Monografías de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. <http://www.sebbm.es>.
- Roloff TC, Nuber UA. 2005. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J Cell Biol* 84:123–35.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, van Montfrans GA, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. 1999. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. *J Hypertens* 17:325-330.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. 1996. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Segal E, Widom J. 2009. What controls nucleosome positions? *Trends Genet* 25(8):335-343.
- Selker EU. 1999. Gene silencing: Repeats that count. *Cell* 97:157-160.
- Serman L, Martić TN, Serman A, Vranic S. 2014. Epigenetic alteration on the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci* 14(4):191-194.
- Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. 2010. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab* 21(4):214-222.
- Soubry A, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK. 2014. A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *Bioessays* 36:359-371.
- Soubry A, Murphy SK, Wang F, Huang Z, Vidal AC, Fuemmeler BF, Kurtzberg J, Murtha A, Jirtle RL, Schildkraut JM, Hoyo C. 2013a. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int J Obes (Lond.)* <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2013.193>.
- Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, Huang Z, Bernal A, Kurtzberg J, Jirtle RL, Murphy SK, Hoyo C. 2013b. Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med* 11:29.
- Soubry A. 2015. Epigenetic inheritance and evolution: A paternal perspective on dietary influences. *Progress Bioph Mol Biol* 3:1-7.
- Stancheva I, Meehan RR. 2000. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Gen Dev*. 14: 313-327.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41-45.
- Szyf M. 2015. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in Mol Med*

21(2):134-144.

- Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. 1997. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*. 16: 6510-6520.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324(5929):930-935.
- Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, Cortes J, Lynn A, Keating MJ, Thomas DA, Pierce S, Kantarjian H, Verstovsek S. 2009. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood* 113:4171-4178.
- Tao Q, Chan AT. 2007. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med* 9:1-24.
- Tomari Y, Zamore PD. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19:517-529.
- Tracey R, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. 2013. Hydrocarbons (jet fuel JP-8) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol* 36:104-116.
- Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. May 14;26(22):3240-3253.
- Turker MS. 1999. The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin Cancer Biol* 9:329-337.
- Turner BM. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* 12:110-112.
- Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, Li K. 2003. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res* 63:4547-4551.
- Valinluck V, Sowers LC. 2007. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67(3):946-950.
- Vaquero A, Loyola A, Reinberg D. 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ* 14:RE4.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M,

- Evans CA, Holt RA. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Viegas-Pequignot, E. and Dutrillaux, B. 1976. Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine). *Hum. Genet.* 34: 247-254.
- Waddington CH. 1939. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 25:299-307.
- Waddington CH. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1:18-20.
- Wallace DC. 2010. Bioenergetics and the epigenome: interface between the environment and genes in common disease. *Dev Disabil Res Rev* 16:114-119.
- Walsh CP, Bestor TH. 1999. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* 13:26–34.
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20:116–117.
- Wang W, Pan K, Chen Y, Huang Ch, Zhang X. 2012. The acetylation of transcription factor HBP1 by p300/CBP enhances p16INK4A expression. *Nucleic Acids Research* 40(3):981-995.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.
- Waterland RA, Kellermayer R, Laritsky E, Rayco-Solon P, Harris RA, Travisano M, Zhang W, Torskaya MS, Zhang J, Shen L, Manary MJ, Prentice AM. 2010. Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles. *PLoS Genet* 6:1001252.
- Watson JD, Crick FHC. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid *Nature* 171:737-738.
- Weake VM, Workman JL. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29(6):653-663.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D’Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. 2004. Epigenetic programming by maternal behaviour. *Nat Neurosci* 7:847-854.
- Wei Y, Yang CR, Wei YP, Zhao ZA, Hou Y, Schatten H, Sun QY. 2014. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci* 111:1873-1878.

- Widom J. 2001. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics. *Q Rev Biophys* 34(3):269-324.
- Wigler M, Levy D, Perucho M. 1981. The somatic replication of DNA methylation. *Cell* 24:33-40.
- Willert K, Nusse R. 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a007864.
- Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. 1997. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272:7810-7816.
- Wutz A, Jaenisch R. 2000. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* 5:695-705.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402:187-191.
- Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. 2011. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 43:309-315.
- Yang PK, Kuroda MI. 2007. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128:777-786.
- Yates PA, Burman RW, Mummaneni P, Krussel S, Turker MS. 1999. Tandem B1 elements located in a mouse methylation center provide a target for de novo DNA methylation. *J Biol Chem* 274:36357-36361.
- Yehuda R, McFarlane AC, Shalev AY. 1998. Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biol Psychiatry* 44(12):1305-1313.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.
- Zammatteo, D. 2014. L'impact des émotions sur l'ADN, Éditions Quintessence.
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. 2007. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 128:763-776.
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. 2010. Genome-wide evolutionary analysis of

eukaryotic DNA methylation. *Science* 328(5980):916-919.

Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ. 2013. Defining the Role of Histone Deacetylases in the Inhibition of Mammary Carcinogenesis by Dietary Energy Restriction (DER): Effects of Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) and DER in a Rat Model. *Cancer Prev Res* 6(4):290-298.