

# ENFERMEDADES EPIGENÉTICAS: DESDE EL CÁNCER HASTA LA SORDERA

LUIS FRANCO VERA\*

\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia. luis.franco@uv.es

## ESTRUCTURA DE LA CROMATINA; CONCEPTO DE EPIGENÉTICA

La descripción de la estructura de doble hélice del DNA (Watson y Crick, 1953a) y la de sus implicaciones funcionales (Watson y Crick, 1953b) constituyen los dos trascendentales hitos que sentaron las bases moleculares de la Genética moderna e hicieron posible que el propio Crick (1958) formulara el *dogma central* de la Biología Molecular, según el cual la información genética contenida en el DNA determina la estructura de las proteínas en un proceso en que el RNA desempeña un papel intermediario. Hoy en día, gracias a un ingente trabajo realizado por miles de investigadores, se conocen con extraordinario detalle los mecanismos que aseguran la transmisión de la información genética. El desciframiento del código genético, por citar un importante ejemplo, permitió conocer, dada la secuencia de un gen, la estructura primaria de la proteína codificada<sup>1</sup>. El imparable progreso de las técnicas de análisis y secuenciación del DNA permite en la actualidad detectar mutaciones en un determinado gen y, en el caso de enfermedades monogénicas<sup>2</sup>, establecer un diagnóstico mucho antes de que se presenten los síntomas de la enfermedad.

Pero es evidente que ese conocimiento, aún siendo de enorme importancia, no basta. Un sencillo ejemplo puede poner de manifiesto esa insuficiencia. El cuerpo humano adulto está formado por entre 10 y 100 billones de células que pertenecen a 250 tipos celulares dis-

tintos. Todas ellas derivan del cigoto inicial y poseen, en principio, el mismo genoma. Los alrededor de 30000 genes del organismo humano se hallan presentes en todas sus células, pero es evidente que cada una expresa una combinación singular de ellos, que la hace pertenecer a uno de esos 250 tipos diferentes. La situación viene a ser semejante, si vale la comparación, a la de esas pantallas formadas por un conjunto de luces en las que según se enciendan unas u otras se leen cada uno de los números o de las letras del alfabeto. Evidentemente la situación real es mucho más compleja que la del ejemplo, porque en vez de unas decenas de luces hay unos 30000 genes y en vez de resultar los 10 números o las 27 letras del alfabeto castellano han de resultar 250 tipos celulares.

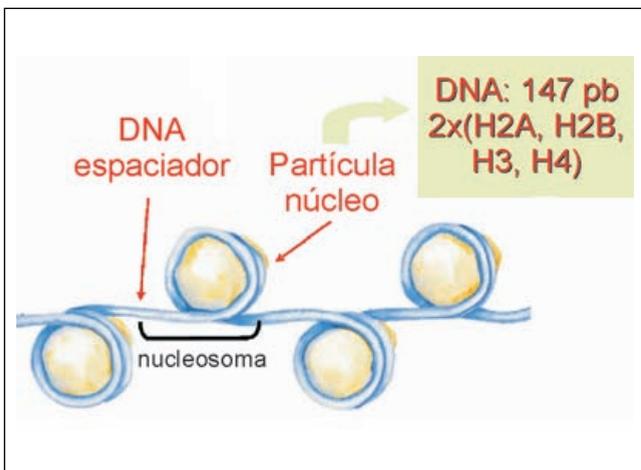
¿Qué es lo que hace que se exprese en cada tejido una singular y específica combinación de sus genes? La respuesta inmediata es que los diferentes mecanismos de regulación permiten la expresión génica selectiva y específica. Pero la comprensión de esos mecanismos de regulación no constituye, ni de lejos, una tarea fácil. Es cierto que los trabajos pioneros realizados en procariontes (Jacob y Monod, 1961) sentaron las bases de la regulación génica, pero habrían de pasar aún muchos años hasta que se empezara a vislumbrar el alcance de la regulación genética en eucariotas. En los albores de la Biología Molecular, a mediados del siglo XX, ya se sabía que el DNA se encontraba en estos organismos formando un material complejo, denominado cromatina, en el que unas proteínas

<sup>1</sup> Se puede encontrar una breve revisión acerca de la historia del descubrimiento del código genético en Franco (2008).

<sup>2</sup> Las enfermedades genéticas se deben a las alteraciones hereditarias de uno o varios genes, que dan lugar a una disfunción patológica. En las enfermedades monogénicas sólo se altera la secuencia de un único gen.

básicas, las histonas, eran sus principales acompañantes. La primitiva idea de que las histonas serían represores específicos de la expresión génica abrió las puertas a la caracterización de este grupo de proteínas, para encontrar que sólo hay cinco clases de ellas que, con la nomenclatura actual, se designan como H1 (o su equivalente, H5, en algunos tipos celulares), H2A, H2B, H3 y H4. Esta limitada heterogeneidad y la extraordinaria conservación evolutiva de las histonas hicieron pensar que las histonas más que represores serían simplemente proteínas estructurales. Esta consideración abrió el camino al estudio de la estructura de la cromatina.

Tras unos años de incierta investigación, a partir de 1974 se aceptó el modelo nucleosomal para la estructura de la cromatina (Kornberg, 1974). Actualmente se sabe que un nucleosoma consta de una partícula núcleo y un DNA espaciador. Éste es de longitud variable, pero todas las partículas núcleo de todas las células eucarióticas son idénticas. Están constituidas por un octámero de histonas —dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4— alrededor del cual se enrollan 147 pares de bases de DNA describiendo una superhélice (Fig. 1). Tras varios intentos infructuosos, se llegó a conocer con



**Figura 1.** Representación esquemática de un filamento de nucleosomas. El nucleosoma, la unidad fundamental de la cromatina, está compuesto por una partícula núcleo y una longitud variable de DNA, el DNA espaciador. La partícula núcleo contiene un octámero formado por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 alrededor del cual se enrollan 147 pb de DNA describiendo 1,75 vueltas de superhélice. Una quinta histona, que puede ser H1 o H5, se une, en algunos nucleosomas, fundamentalmente al DNA espaciador y no está representada en la figura.

precisión la estructura del octámero de histonas, gracias al trabajo del grupo de Moudrianakis (Arents et al., 1991) que, incluso llegó a predecir cuál sería el recorrido del DNA por la superficie del octámero (Arents y Moudrianakis, 1993). Cuando, años más tarde, la difracción de rayos X de cristales de partículas núcleo permitió describir con una resolución de 2,8 Å la estructura de la partícula núcleo (Luger et al., 1997) se comprobó que las predicciones del grupo de Moudrianakis eran esencialmente correctas.

Desde esa fecha, ha aumentado precisión con la que se conoce la estructura de la partícula núcleo, especialmente en lo que se refiere a la trayectoria del DNA (Richmond y Davey, 2003; Ong *et al.* 2007), pero siguen siendo muy numerosos los interrogantes que se plantean a la hora de describir cómo se pliegan los filamentos de nucleosomas hasta lograr el grado de compactación requerido para empaquetarse en el núcleo celular o el grado aún mayor que implica la organización de los cromosomas metafásicos (véase, por ejemplo, Daban y Bermúdez, 1998; Dorigo *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2006; Eltsov *et al.*, 2008). En cualquier caso, es evidente que la organización de la cromatina supone un obstáculo para la funcionalidad nuclear, ya que el DNA debe mantenerse accesible para el desarrollo de múltiples procesos. Por sólo citar uno de ellos, piénsese que la transcripción exige que la RNA polimerasa recorra una de las cadenas del DNA, lo que, a su vez, implica que ambas cadenas se separen. Esta separación constituye una tarea formidable si el DNA está enrollado alrededor de los octámeros de histonas y los filamentos de nucleosomas superenrollados sobre sí mismos. Además, para que la RNA polimerasa actúe, se requiere el concurso de numerosas proteínas: factores transcripcionales basales, activadores, coactivadores, mediadores, etc., que han de interactuar, bien con secuencias específicas del DNA, bien con otros factores.

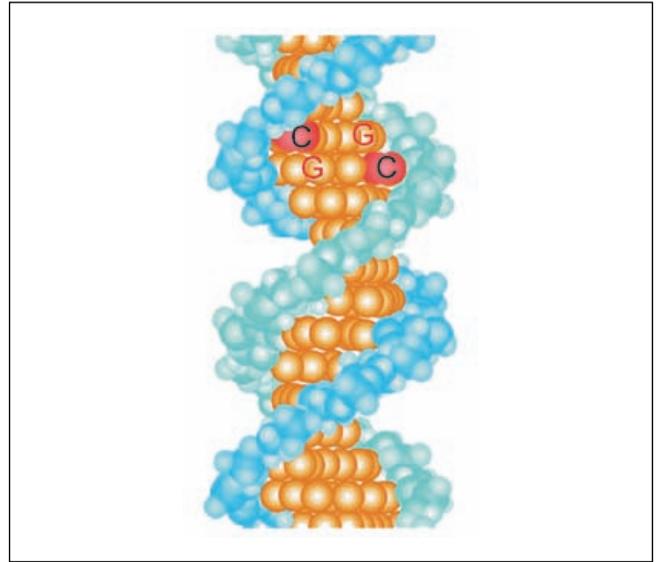
¿Qué acontecimientos hacen posible que la RNA polimerasa y los demás factores puedan acceder a un gen para transcribirlo a pesar del obstáculo que supone la organización de la cromatina? Y esta pregunta enlaza con la que se formuló más arriba, ¿cómo se seleccionan los genes que en un momento dado se tienen que transcribir en una célula? Para dar una respuesta a estas preguntas, no basta el conocimiento *genético*, es decir, el aportado por la secuencia de los

genes, porque la de un gen concreto es común en todas las células del organismo y en unas no se transcribe, mientras que en otras lo hace; y en éstas, no lo hace continuamente. Ha de haber alguna información superpuesta a la genética que determine esa selectividad transcripcional. Esa información superpuesta es, en gran medida, la información *epigenética*. Epigenética es un término acuñado hace alrededor de 70 años por Conrad Waddington, que la definió como «la rama de la Biología que estudia las interacciones causales entre los genes y su entorno que conducen a la existencia del fenotipo» (Waddington, 1942). Como esas interacciones modifican la estructura del material genético sin producir cambios en la secuencia del DNA, alternativamente se suele definir la Epigenética como «el estudio de los cambios —hereditarios o, al menos, potencialmente heredables— experimentados por el material genético y no debidos a alteraciones en la secuencia del DNA» (Jiang *et al.*, 2004).

Lo que caracteriza a una determinada célula, lo que la encuadra dentro de un tipo celular es su proteoma, el conjunto de sus proteínas constituyentes. Éste, a su vez, viene determinado por su transcriptoma, es decir, por el conjunto de los RNA mensajeros característicos de esa célula. Y son, en definitiva, los factores epigenéticos los que hacen posible que, teniendo el mismo genoma todas las células de un organismo humano —con la evidente excepción de los linfocitos B y T—, tengan un transcriptoma y un proteoma específico del tipo a que pertenecen. Si se tiene en cuenta que el DNA genómico se encuentra en un entorno definido por la estructura de la cromatina, el genotipo puede dar lugar al fenotipo solamente a través del epigenotipo. En este contexto Jiang *et al.* (2004) han comparado certeramente el epigenotipo con las variaciones del tipo de letra que pueden añadirse a un texto primario.

## FACTORES EPIGENÉTICOS

Llegados a este punto, es inmediato preguntarse cuáles son los factores epigenéticos que pueden condicionar la expresión de los diferentes genes. En líneas generales, puede decirse que son dos: los que, sin alterar su secuencia como queda dicho, repercuten directamente en el DNA y los que afectan a los otros componentes de la cromatina. Dentro de estos últimos



**Figura 2.** Región de una molécula de DNA en la que se ha producido la metilación simétrica de una secuencia CpG. Se destacan dos pares de bases C≡G en los que las citosinas están metiladas. La metilación se simboliza con el color rojo de las citosinas.

se han considerado clásicamente las modificaciones de las histonas, pero en los últimos años está recibiendo especial atención el papel que desempeñan ciertas moléculas de RNA no codificante. En las líneas siguientes se comentarán estos factores y, al final de este apartado, se añadirá un comentario sobre un fenómeno, el de la impronta genómica, que aunque no implique la existencia de factores epigenéticos adicionales, desempeña un destacado papel en la regulación epigenética de la expresión de algunos genes de gran importancia funcional.

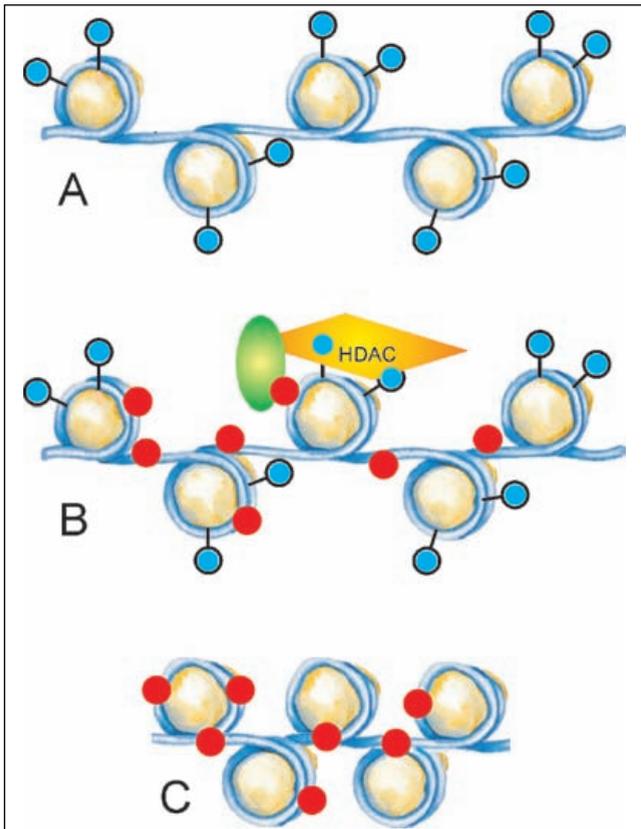
## Modificaciones epigenéticas del DNA

El único factor epigenético que modifica directamente el DNA en mamíferos es la metilación del carbono 5 del anillo de citosina (Fig. 2) en los dinucleótidos simétricos CpG (Bird, 2002), modificación que afecta a una pequeña proporción —algo superior al 1%— de los restos de ácido citidílico (Vanyushin *et al.*, 1970), pero que implica que el 70-80% de los dinucleótidos CpG están metilados (Ehrlich, 1982). El grupo metilo se incorpora a partir de la S-adenosilmetionina, el donador universal de estos grupos, en una reacción enzimática catalizada por las DNA-metiltransferasas (Bird, 2002).

En las células normales la metilación del DNA ocurre fundamentalmente en las secuencias repetitivas, incluido el DNA satélite, que no se transcriben (véase la revisión de Robertson, 2005). De hecho, hace tiempo que, gracias a los estudios sobre la inactivación del cromosoma X humano, se sabe que existe una relación causal entre metilación de DNA y silenciamiento de genes (Mohandas *et al.*, 1981). Pero para comprender el significado real de la metilación de DNA hay que considerar que la distribución de los dinucleótidos CpG en el genoma de los vertebrados no ocurre al azar, puesto que existen unas regiones, denominadas *islas CpG*, en las que la presencia de estos dinucleótidos es mucho más abundante. Estas regiones se encuentran preferentemente en los extremos 5' del 60% de los genes humanos y su patrón de metilación difiere sus-

tancialmente del de la media del genoma. Mientras que la presencia de citosina metilada en el conjunto del genoma es proporcional a la abundancia de CpG, la mayoría de las islas CpG, por ejemplo las que se encuentran en los promotores de genes constitutivos (Li y Bird, 2006), no están metiladas. Por el contrario, la metilación de las islas CpG se relaciona con la represión transcripcional (Goll y Bestor, 2005).

Se han descrito dos tipos de mecanismos mediante los cuales la metilación del DNA provoca la represión transcripcional. El primero implica la inhibición del reclutamiento de factores transcripcionales por la metilación del DNA (Bird, 2002). El segundo, más complejo (Fig. 3), se puso de manifiesto gracias a unos decisivos experimentos realizados en 1998, en los que se comprobó que existe una relación entre metilación de DNA y desacetilación de histonas (Eden *et al.*, 1998). Más adelante se mencionará que, mientras que la acetilación de histonas está relacionada con la activación transcripcional, la desacetilación lo está con la represión. En ese momento, se comentarán las bases de este segundo mecanismo por el que la metilación del DNA conduce a la represión de la transcripción.



**Figura 3. Relación entre la metilación del DNA y la desacetilación de histonas.** (A) Región de cromatina con histonas hiperacetiladas (representadas por los círculos azules) en conformación desplegada de filamento de nucleosomas. (B) La metilación del DNA provoca que las metilcitosinas (círculos rojos) recluten histona desacetilasas (HDAC) a través de las proteínas que reconocen el grupo metilo (representadas por la elipse verde en la figura). (C) Tras la actuación de las histona desacetilasas, la acetilación de histonas desaparece, con lo que la cromatina pasa a una conformación compacta.

¿Cómo se produce la metilación del DNA en los sitios requeridos? La respuesta tiene un elemento relativamente fácil de contestar y otro en el que aún se presentan problemas muy importantes pendientes de solución. El primero hace referencia a las enzimas de las que depende la metilación de las citosinas en el DNA. Desde hace tiempo se sabe que existen dos tipos fundamentales de DNA metiltransferasas (DNMT). La enzima DNMT1 cataliza la metilación de CpG cuando en la hebra complementaria del DNA se encuentra metilada la citosina, como sugirió inicialmente Bestor (1992) y fue comprobado posteriormente por Pradhan *et al.* (1999). De esta manera, DNMT1 es capaz de metilar un DNA previamente hemimetilado y, por tanto, tiene la función de mantener el estado de metilación de un DNA tras la replicación. Por el contrario, DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas *de novo*, que catalizan la incorporación de restos metilo en dinucleótidos CpG cuya pareja en la hebra complementaria no está metilada (Okano *et al.*, 1999). La naturaleza de las enzimas capaces de convertir la 5-metilcitosina en citosina, es decir, de desmetilar el DNA, sigue siendo objeto de controversia, pero hoy en día se sabe que tanto DNMT3A como DNMT3B

poseen actividad de DNA desmetilasa *in vitro* y se acepta que pueden actuar también *in vivo* (Kim *et al.*, 2009). De hecho, recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de una rápida metilación-desmetilación de DNA en lugares específicos de promotores concretos (Métivier *et al.*, 2008; Kangaspeska *et al.* 2008), que sólo se explica por la existencia de DNA desmetilasas, para las cuales incluso se ha descrito un posible mecanismo (Ooi y Bestor, 2008).

Está claro, pues, que el estado de metilación del DNA depende de la actividad relativa de las DNA metiltransferasas y desmetilasas y que su mantenimiento en la división celular es posible gracias a la acción de la DNMT1, pero los mecanismos que aseguran la especificidad de los sitios de metilación, aunque se han discutido ampliamente (Bird, 2002; Li y Bird, 2006) siguen presentando muchos puntos oscuros. Recientemente se ha descrito que DNMT1 a su vez se regula por metilación de una de sus lisinas (Wang *et al.*, 2009), lo que establece un complejo diálogo entre la modificación del DNA y la modificación de proteínas, diálogo al que será preciso aludir más adelante.

## **Modificación de histonas y remodelación de la cromatina**

La existencia de una modificación de las histonas que tiene lugar después de la traducción se puso de manifiesto en 1964, al encontrar que las histonas pueden acetilarse reversiblemente, una reacción que afecta a algunas cadenas laterales de lisina, con la conversión del grupo amino, cargado positivamente a pH fisiológico, en un resto de acetamida carente de carga eléctrica (Allfrey *et al.*, 1964). La bioquímica de la acetilación de histonas se ha estudiado profusamente desde hace tiempo y su relación con la activación transcripcional está bien establecida (Franco, 2000). La incorporación de restos acetilo en las cadenas laterales de lisina tiene lugar, a expensas de acetil-CoA, mediante una reacción catalizada por las histona acetiltransferasas (HATs). Por su parte, las histona desacetilasas (HDACs) son capaces de eliminar, en una reacción de hidrólisis, el resto acetilo, con lo que la acetil-lisina revierte a su estado original. Pero la acetilación no es la única modificación que pueden sufrir las histonas. La metilación de lisinas se descubrió al mismo tiempo que la acetilación (Allfrey *et al.*, 1964), aunque

su interés funcional sólo se ha comprendido en los últimos años y se ha revisado recientemente (Cloos *et al.*, 2008). Además de la acetilación y la metilación, las histonas pueden modificarse reversiblemente mediante fosforilación, ubicuitilación y sumoilación (Bernstein *et al.*, 2007).

Como se había supuesto desde el descubrimiento de la acetilación de histonas y se corroboró tras la clonación de los genes de HATs y HDACs, esta modificación está relacionada con la activación transcripcional (Franco, 2000), mientras que la metilación puede desempeñar un doble papel. Así, la metilación en la lisina 4 de H3 y en las argininas 17 de H3 y 3 de H4 está relacionada con la activación de la transcripción, mientras que la metilación de las lisinas 9 y 27 de H3 y 20 de H4 se relaciona con la represión o silenciamiento de genes (Peterson y Laniel, 2004; Martin y Zhang, 2005).

En realidad, esta diferencia de comportamiento funcional entre las metilaciones en distintos aminoácidos de las histonas es consecuencia de una característica de la modificación de histonas que había sido prevista por Allis unos años antes. Este autor había emitido en 2000 la hipótesis del ‘código de las histonas’, según la cual “una múltiple modificación de histonas, que actúa de un modo combinatorio o secuencial, especifica funciones singulares subsiguientes” (Strahl y Allis, 2000). Los datos experimentales disponibles en el momento de emitir la hipótesis eran muy limitados e inciertos, pero pronto se fueron acumulando resultados en su apoyo y hoy se admite que existe un *código epigenético*, por utilizar la terminología de Turner (2000), que no se contrapone, sino que se superpone al código genético inscrito en el DNA, poniendo de manifiesto las potencialidades contenidas en los restantes componentes de la cromatina. En realidad, no sólo las modificaciones de las histonas, sino también la metilación del DNA, formarían parte de este código epigenético.

Un código, para que sea funcional, debe poder interpretarse. Para leer el código epigenético harán falta moléculas capaces de distinguir unas modificaciones de otras. Era, pues, lógico que Strahl y Allis, tras enunciar su hipótesis, se plantearan dos preguntas, que constituyen otros tantos epígrafes de su artículo: “How is the histone code read?” y “Who reads the

code?" (Strahl y Allis, 2000). Las respuestas iniciales tenían que ser, por fuerza, provisionales, pero el tiempo ha confirmado que estaban bien encaminadas. Hoy se sabe que existen determinados módulos en las proteínas capaces de interactuar específicamente con acetil-lisina o metil-lisina. Son los conocidos, respectivamente, como bromodominios o cromodominios (Marmorstein, 2001).

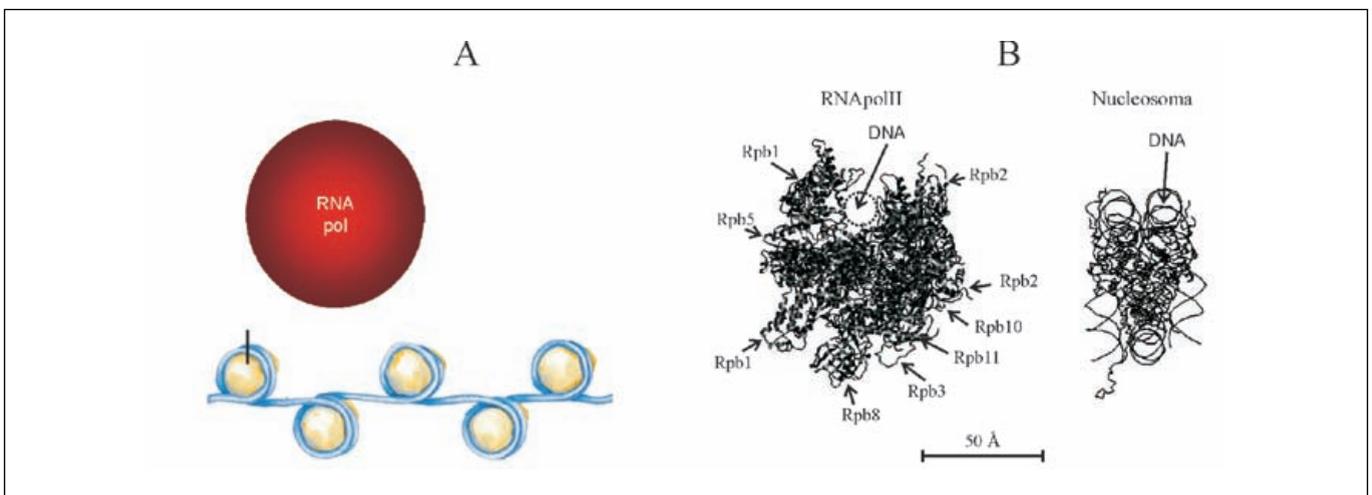
Una particularidad del código epigenético es la interrelación entre las diversas modificaciones de histonas y del DNA. Existe un extenso *diálogo* entre unas modificaciones y otras. Por ejemplo, la metilación del DNA está relacionada con la desacetilación de histonas, gracias a la existencia de proteínas capaces de reconocer la metilcitosina y que, a su vez, reclutan histona desacetilasas (véase, por ejemplo, Ballestar *et al.*, 2001). Esta interrelación es especialmente importante, por cuanto es la causa fundamental del silenciamiento de los genes cuyos promotores están hipermetilados y está implicada en la represión de genes supresores de tumores, que tanta importancia tiene en el desarrollo del cáncer (Vaissière *et al.*, 2008). Además de estas relaciones entre las modificaciones de histonas y las del DNA se ha descrito una extensa red de intercomunicaciones entre las diversas modificaciones que puede sufrir una misma histona (Zhang y Reinberg,

2001) y también las que existen entre las modificaciones de una histona y las de otra del mismo o distinto nucleosoma (Fingerman *et al.*, 2008). Evidentemente, todas estas intercomunicaciones son posibles gracias a los módulos de reconocimiento de las modificaciones a los que se ha aludido antes.

La estructura nucleosomal representa un obstáculo, no sólo para el ensamblaje de la maquinaria transcripcional (Fig. 4) sino, en general, para el desarrollo del conjunto de operaciones nucleares. Para que éstas se lleven a cabo, es preciso eliminar, desplazar o alterar la estructura de los nucleosomas. Este es el proceso que se denomina *remodelación de la cromatina*. En él están implicados unos complicados complejos de remodelación que, con la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, son capaces de realizar ese cambio endergónico que supone la reestructuración de los nucleosomas.

## RNA no codificante

A medida que ha ido avanzando la secuenciación de genomas eucarióticos se han observado dos hechos. Por una parte, la abundancia de regiones que no codifi-



**Figura 4.** La transcripción no puede iniciarse sobre un nucleosoma. (A) Esquema de una región de un gen, en la que el sitio de iniciación de la transcripción (barra vertical) se encuentra precisamente en un nucleosoma. Resulta imposible formar el complejo de preiniciación que, entre otros factores, exige el ensamblaje de la RNA polimerasa II. En esta parte de la figura los nucleosomas y la polimerasa no están dibujados a la misma escala. (B) Estructuras de la RNA polimerasa II y de un nucleosoma a escala. Como modelo estructural de polimerasa se ha escogido la RNA polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* (Cramer *et al.*, 2001) y para construir la figura del nucleosoma se han tomado los datos de Luger *et al.* (1997). Tanto la RNA polimerasa como el nucleosoma se han representado con el programa RasMol 2.7.3.1 a partir de los archivos pdb mencionados en los respectivos artículos. El nucleosoma se representa con el eje de la superhélice horizontal de izquierda a derecha, de modo que se aprecie la sección del DNA.

can proteínas aumenta en complejidad con la evolución, mientras que el número de genes con información para proteínas se mantiene relativamente constante (Mattick, 2004; Taft *et al.*, 2007). En segundo lugar, se ha demostrado que existen abundantes RNAs no codificantes, que se suelen designar con la abreviación ncRNA. Ya en 2003 se propuso que esos RNAs podían desempeñar un importante papel en la regulación de la expresión génica (Mattick, 2003) y en los años posteriores se han acumulado datos que corroboran esa propuesta, de modo que hoy se acepta que los ncRNAs pueden desempeñar un papel en la estructura y función de la cromatina, con lo que constituyen un factor epigenético adicional a los considerados hasta ahora.

Particular interés revisten los RNAs pequeños, asociados al sistema de interferencia de RNA (RNAi). Este sistema, que se vislumbró en plantas como un mecanismo de defensa frente a virus y, en general, frente a la invasión por parte de material genético exógeno, posee una función mucho más general, como demostraron Fire y Mello, que obtuvieron por ello el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2006 (Fire *et al.*, 1998). El sistema RNAi es capaz de convertir RNA de doble cadena en fragmentos pequeños, de unos 20 nucleótidos, denominados siRNA (*small interfering RNA*) y miRNA (*micro RNA*). Los miRNAs poseen numerosas funciones reguladoras. Pueden alterar la estabilidad del mRNA o provocar su destrucción, con los consiguientes resultados en el control de la traducción, pero también, a través de su interacción con regiones del genoma asociadas con la oncogénesis, pueden actuar a modo de supresores de tumores o de oncogenes (Zhang *et al.*, 2007). Está también demostrado el papel de los siRNAs en el establecimiento de la heterocromatina (Martienssen y Moazed, 2006).

El modo de acción de los miRNAs y siRNAs en la cromatina se debe a su capacidad de interactuar, por una parte con el DNA debido a la complementariedad de bases, por otra con numerosas proteínas, entre las que se encuentran enzimas modificadoras de las histonas, y componentes de complejos de remodelación

(Mehler, 2008). Esta es la base de su consideración como factores epigenéticos, aunque muchos aspectos de la función de estos ncRNAs se desconozcan todavía.

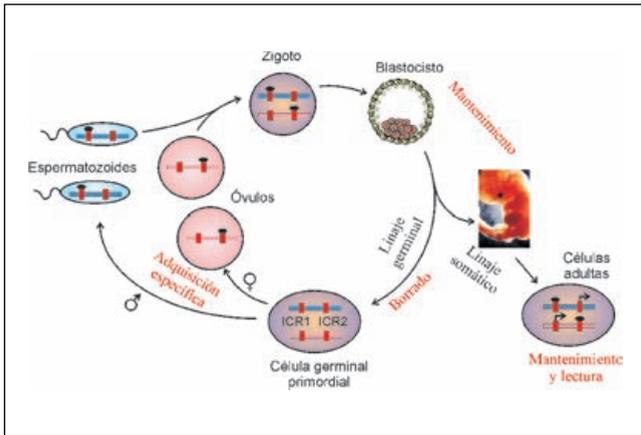
## Impronta genómica

Hasta la década de 1980 se admitía implícitamente que las dos copias, paterna y materna, de los cromosomas autosómicos<sup>3</sup> eran funcionalmente equivalentes. Pero esta idea cambió como consecuencia de los ya clásicos estudios realizados con embriones de ratón (Barton *et al.*, 1984; McGrath y Solter, 1984), que dieron origen al descubrimiento de la impronta genómica<sup>4</sup>. La impronta genómica se puede definir como un fenómeno epigenético en el cual la actividad de un gen se modifica reversiblemente en función del sexo del progenitor que lo transmite. Da lugar a una expresión diferenciada de los alelos paterno y materno en un *locus* diploide. Algunos genes se expresan sólo cuando se heredan por línea materna y otros cuando lo hacen por línea paterna. En cierto modo se puede decir que los genes sometidos a impronta “recuerdan” su origen parental. En el hombre y en el ratón se estima que el número de esos genes es sólo de 80-100, pero la mayoría de ellos tienen funciones importantes, tanto en el crecimiento y en la diferenciación embrionaria y fetal, como en el crecimiento y función de la placenta. Por tanto, del funcionamiento correcto de estos genes depende, en muchos casos, la viabilidad fetal y, al menos, el progreso normal de la gestación. Por otro lado, también varios genes sometidos a impronta están relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central y su funcionamiento normal asegura las correctas funciones cognitivas.

La causa de la distinta expresión de los dos alelos es epigenética. Li *et al.* (1993) identificaron la metilación del DNA en unas regiones concretas como una de las causas de ese marcaje diferencial, pero posteriormente se ha encontrado que las modificaciones epigenéticas de las histonas también pueden provocar la impronta de determinados genes (véase, por ejemplo,

<sup>3</sup> Se denominan cromosomas autosómicos o simplemente autosomas a los cromosomas no sexuales. Toda célula somática posee una copia paterna y una materna de los cromosomas autosómicos.

<sup>4</sup> El término inglés *genomic imprinting* se traduce aquí como impronta genómica.



**Figura 5. Mecanismo esquemático de la impronta genómica.** Se señalan, como rectángulos rojos, dos ICRs arbitrarias, ICR1 e ICR2, sobre un hipotético cromosoma. Las improntas se señalizan como pequeñas elipses negras en la parte superior de las ICRs. ICR1 tiene una impronta de origen paterno, mientras que la de ICR2 deriva de la madre. El cromosoma heredado de la madre está coloreado en rosa, mientras que el paterno aparece en azul. Las improntas se adquieren durante el desarrollo de la línea germinal a partir de las células primordiales germinales, que no están marcadas.

Umlauf *et al.*, 2004). Esas secuencias modificadas epigenéticamente, contiguas a los genes, se conocen como regiones de control de impronta (ICR, *imprinting control regions*).

La impronta genómica varía de forma sustancial a lo largo del ciclo vital y en la figura 5 se esquematiza este proceso. Las improntas se adquieren durante el desarrollo de la línea germinal a partir de las células primordiales germinales, que no están marcadas. Tras la fecundación esas improntas se mantienen durante el desarrollo embrionario y fetal de los linajes somáticos hasta llegar intactas a los tejidos adultos. Su reconocimiento da lugar a la expresión monoalélica selectiva de los genes controlados por ambas ICRs. Por el contrario, durante el desarrollo de las células de la línea germinal la impronta se borra y así los genes de las células primordiales germinales están desprovistos de impronta. Los mecanismos por los que se producen los fenómenos antedichos son complejos y muchos de sus mecanismos no se conocen aún con precisión.

Una vez adquirida, la impronta se mantiene tras la fecundación a lo largo del desarrollo de las líneas somáticas. Aunque también hay aspectos oscuros en el mecanismo de tal mantenimiento, está claro que inter-

viene la DNMT1 que, como se ha comentado anteriormente, es capaz de metilar la cadena no modificada del DNA hemimetilado. Más interrogantes se plantean en cuanto al proceso de borrado durante el desarrollo de las células de la línea germinal.

La impronta tiene que “leerse”, es decir, tiene que existir un mecanismo de reconocimiento de la marca correspondiente. No se plantean problemas especiales cuando la impronta consiste en la metilación del DNA y la ICR coincide con el promotor de un gen, ya que operan los mecanismos que se han esbozado anteriormente. Pero en el caso frecuente de que la ICR no coincida con el promotor, los mecanismos de reconocimiento son más complejos y pueden implicar ncRNAs.

## ENFERMEDADES EPIGENÉTICAS

Desde hace mucho tiempo se conoce la existencia de enfermedades genéticas. Es fácil comprender que algunas mutaciones pueden dar lugar a un fenotipo alterado que tenga consecuencias patológicas. Pero, habida cuenta de la influencia de los factores epigenéticos en la expresión de los genes, se puede concluir que el fenotipo puede también resultar alterado como consecuencia de errores epigenéticos. No obstante, las lesiones epigenéticas son más difíciles de delimitar que las genéticas; mientras que es fácil precisar la naturaleza y alcance de un error genético, las alteraciones del epigenotipo son más difíciles de advertir y la predicción de sus consecuencias puede ser imposible *a priori*.

Un caso paradigmático de la influencia de factores epigenéticos en la patología es el descrito por Korenke *et al.* (1996). Dos hermanos gemelos monozigóticos poseían la misma mutación en el gen *ALD*, un gen localizado en el cromosoma X, cuya defectuosa expresión causa la adrenoleucodistrofia. Se trata de una enfermedad rara, que se caracteriza principalmente por la progresiva y letal degeneración neurológica, provocada por la pérdida de mielina. Uno de los hermanos desarrolló los síntomas típicos de la enfermedad, mientras que el otro permaneció sano. Al describir el caso, los autores concluyeron que “algunos factores no genéticos podían ser importantes para los diferentes fenotipos adrenoleucodistróficos”. El pro-

greso en el estudio de las modificaciones epigenéticas, ha confirmado la interpretación de los autores y ha permitido apuntar las causas del comportamiento diferencial de los dos hermanos. Hoy se sabe, por ejemplo, que los gemelos monozigóticos, a pesar de su idéntico genoma, desarrollan a lo largo de su vida claras diferencias epigenéticas, tanto en la metilación del DNA, como en la modificación de las histonas (Fraga *et al.*, 2005a), que pueden dar lugar a un patrón disimilar de expresión génica.

Para explicar mejor esta cuestión, un ejemplo fácil, apoyado en cuestiones descritas en este artículo, puede ayudar a centrar el alcance de los cambios epigenéticos. Supóngase que en una célula normal el gen A debe expresarse, mientras que el B ha de permanecer silencioso. Es natural que el promotor de A se encuentre hipometilado y, teniendo en cuenta lo comentado al tratar de la modificación de histonas, es también razonable que las histonas de los nucleosomas que cubren el gen se encuentren hiperacetiladas, con lo cual el gen adoptará una conformación abierta. También es lógico que estén metiladas la lisina 4 de H3 y las argininas 17 de H3 y 3 de H4, ya que todas estas son marcas que, según el código de las histonas, corresponden a genes transcripcionalmente activos. Por el contrario, es probable que el promotor de B esté hipermetilado, con lo que se habrán reclutado histona desacetilasas que mantendrán al gen en un estado de hipoaacetilación, con una conformación condensada. También será lógico encontrar en el gen B las marcas características de genes silenciados, como son las metilaciones en las lisinas 9 y 27 de H3. Posiblemente, todas estas modificaciones del DNA y de las histonas definirían el epigenotipo de la célula en cuanto se refiere a los genes A y B. Pero un error en las maquinarias enzimáticas que se encargan de mantener el epigenotipo mencionado puede alterar el fenotipo de la célula. Por ejemplo, una hipermetilación errónea del promotor de A, puede conducir al silenciamiento de este gen, como una deficiente metilación del promotor de B puede conducir a su expresión. Aunque no sea fácil predecir las consecuencias de estas alteraciones, puede admitirse que cambios epigenéticos pueden dar

lugar a patrones aberrantes de expresión génica. Si el gen A fuera un supresor de tumores y el gen B un oncogén<sup>5</sup>, las alteraciones epigenéticas que se acaban de apuntar conducirían a la expresión del segundo y al silenciamiento del primero, con la consiguiente transformación neoplásica.

¿Tienen realmente lugar alteraciones como las que se acaban de postular? La respuesta es afirmativa, aunque no se den todas las circunstancias que, a modo hipotético, se han apuntado. La primera evidencia experimental se obtuvo cuando se comprobó la existencia de cambios en la metilación del DNA en algunos casos de cáncer (Feinberg y Vogelstein, 1983). Desde entonces se han acumulado muchos datos sobre la activación por hipometilación de genes promotores de crecimiento (Feinberg, 2007). El silenciamiento epigenético por hipermetilación también está documentado, especialmente en las etapas tempranas de la progresión tumoral (Baylin y Jones, 2006). La alteración de la metilación del DNA es, pues, un mecanismo epigenético de transformación neoplásica, pero, además, otras marcas epigenéticas están asociadas con los procesos tumorales. Por ejemplo, se ha descrito la pérdida de acetilación en la lisina 16 de la histona H4 y la deficiente trimetilación de la lisina 20 de la misma histona. Estas marcas epigenéticas están asociadas a la hipometilación de secuencias repetitivas de DNA (Fraga *et al.*, 2005b).

Aunque las alteraciones epigenéticas estén presentes en muchos tipos de cáncer, el conjunto de enfermedades que se pueden catalogar como epigenéticas cubre un amplio espectro. En primer lugar, hay que señalar que se puede hablar de enfermedades epigenéticas *puras* y de enfermedades *mixtas* genéticas-epigenéticas (Zoghbi y Beaudet, 2006). Las primeras se deben tan sólo a un defecto en la introducción de marcas epigenéticas. Un caso típico es el de las enfermedades relacionadas con defectos en la impronta genómica. Como se ha descrito en la sección anterior, en cada generación las marcas específicas del progenitor deben borrarse, restablecerse y mantenerse a lo largo del desarrollo. Esto hace que los *loci* sujetos a

---

<sup>5</sup> Una descripción completa de la función de los oncogenes y de los genes supresores de tumores cae fuera del alcance de este artículo. Puede bastar comentar que los primeros normalmente codifican factores que promueven la proliferación celular, mientras que los segundos tienen el efecto contrario. De forma gráfica, se han comparado a veces los oncogenes con el acelerador de un coche y los genes supresores con el freno.

impronta sean vulnerables a errores. Y como el mantenimiento del epigenotipo no está asegurado por tantos mecanismos de control como el del genotipo, el resultado es que las alteraciones epigenéticas pueden surgir con más probabilidad que las genéticas.

Las enfermedades mixtas genéticas-epigenéticas se deben a una mutación genética que tiene efectos epigenéticos en *trans* o en *cis*. La etiología de las primeras consiste en que una mutación genética afecta a la función de una proteína que se encarga de transmitir una marca epigenética. Por ejemplo, una mutación en la proteína MeCP2, que se encarga de reconocer las citosinas metiladas en las islas CpG y reclutar las histona desacetilasas, es la causa fundamental del síndrome de Rett<sup>6</sup> (Amir *et al.*, 1999), pero también se han descrito enfermedades por mutación de enzimas que modifican histonas e incluso por alteraciones en los sistemas de remodelación de la cromatina (Ausió *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2008). Cuando se dice que la mutación genética tiene efectos en *cis*, se entiende que la mutación afecta a una región no codificante del DNA, pero que tiene importancia en la organización de la cromatina y, por tanto, en la transcripción de uno o varios genes. Ejemplos típicos de estas enfermedades son las talasemias, que se deben a mutaciones en la región de control que regula la organización de la cromatina de los genes de las globinas (Zoghbi y Beaudet, 2006). Finalmente, se dan casos de enfermedades causadas por un defecto genético que afecta a un proceso complejo en el que intervienen modificaciones epigenéticas. Esas enfermedades se encuentran en el límite de las que se pueden considerar enfermedades epigenéticas. Un caso de estas enfermedades complejas, con implicaciones epigenéticas, es el de la ataxia-telangiectasia.

Como se ha apuntado antes, muchos tipos de cáncer pueden clasificarse como enfermedades epigenéticas,

aunque raras veces la etiología proceda exclusivamente de causas epigenéticas, pues el cáncer es, de ordinario, una enfermedad multifactorial. Así a las causas genéticas, que incluyen, por ejemplo, mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores, se añaden las alteraciones en patrones de metilación del DNA o en la modificación de las histonas. Esteller ha recopilado una extensa lista de genes cuya mutación modifica las marcas epigenéticas de la cromatina y conduce a la aparición de enfermedades cancerosas o, al menos, coopera con su desarrollo. En esa lista de genes se incluyen los que codifican enzimas implicadas en la metilación del DNA, en la acetilación o desacetilación de histonas, en la metilación de histonas, en la remodelación de la cromatina y en el reconocimiento de algunas de las anteriores marcas epigenéticas (Esteller, 2006).

El síndrome de Beckwith-Wiedemann constituye un excelente modelo para el estudio de las enfermedades epigenéticas. Se trata de un trastorno que afecta a uno entre 12000 nacidos vivos. Los síntomas principales son macroglosia<sup>7</sup>, macrosomía<sup>8</sup>, defectos de la pared abdominal, como el onfalocele<sup>9</sup>, citomegalia de la corteza adrenal, hiperplasia de las células de Leydig<sup>10</sup>, displasia de la médula renal, visceromegalia hiperplástica, hemihiperplasia. Además, se caracteriza por la predisposición al cáncer infantil. Otras anomalías minoritarias asociadas con el síndrome de Beckwith-Wiedemann son hipoglucemia neonatal, nevus flammeus<sup>11</sup>, y alteraciones en la gestación, como el engrosamiento de placenta o cordón umbilical y polihidramnios<sup>12</sup>. Esta última circunstancia está relacionada con la elevada proporción de partos pretérmino en el caso de niños afectados por el síndrome de Beckwith-Wiedemann, así como de la hipertensión frecuentemente padecida por sus madres durante el embarazo (Wangler *et al.*, 2005). Los pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann que

<sup>6</sup> El síndrome de Rett es una enfermedad neurodegenerativa ligada al cromosoma X. Sus primeras manifestaciones en niñas tienen lugar después de los 6 meses de edad y comprenden deficiencia mental severa, ataxia, microcefalia y pérdida progresiva del uso de las manos, que realizan movimientos repetitivos y descontrolados.

<sup>7</sup> Lengua excesivamente grande.

<sup>8</sup> Tamaño excesivo del cuerpo.

<sup>9</sup> Defecto congénito que implica la protrusión de las vísceras a través del ombligo.

<sup>10</sup> Células localizadas en los testículos.

<sup>11</sup> Manchas de color vino tinto que aparecen en la piel como consecuencia de una malformación vascular.

<sup>12</sup> Cantidad excesiva de líquido amniótico.

llegan a la edad adulta siguen teniendo un elevado riesgo de cáncer, pero además se ponen de manifiesto otras alteraciones, como disfunción testicular (Greer *et al.*, 2008).

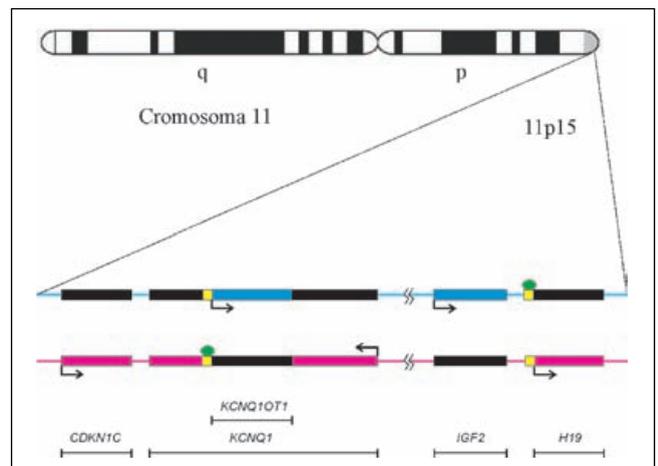
La predisposición a los tumores merece un comentario adicional. Aunque los datos varían mucho de unos autores a otros (véase, por ejemplo, la revisión de Rump *et al.*, 2005), se acepta que el 7,5% de los enfermos contraen algún tipo de tumor (Cohen, 2005), si bien el riesgo es muy diferente según el subgrupo molecular en el que se encuadre la enfermedad, como se discutirá más adelante. Tras un estudio exhaustivo, Lapunzina (2005) concluyó que de un total de 115 tumores malignos detectados en enfermos del síndrome de Beckwith-Wiedemann, el mayoritario era el tumor de Wilms<sup>13</sup> (43%), seguido del hepatoblastoma (20%) y, a más distancia, del carcinoma adrenocortical, rhabdomyosarcoma<sup>14</sup> y neuroblastoma.

Los síntomas del síndrome de Beckwith-Wiedemann que se han mencionado no se presentan en todos los individuos afectados. Es más, mientras que algunos fallecen en el periodo perinatal, otros llegan a la edad adulta. Esta variabilidad fenotípica sugiere que se trata de una enfermedad compleja desde un punto de vista genético, suposición confirmada por la existencia de casos de gemelos monozigóticos discordantes (Cohen, 2005). Los primeros estudios genético-moleculares permitieron concluir que el síndrome de Beckwith-Wiedemann es un desorden multigénico causado por alteraciones en los genes reguladores del crecimiento localizados en el cromosoma 11p15 (Li *et al.*, 1998). Pero las alteraciones moleculares en 11p15 se han observado sólo en un 75-80% de los individuos afectados, por lo que se puede concluir que otros *loci* genómicos están también implicados en la etiología del síndrome (Blik *et al.*, 2009).

En el cromosoma 11p15 (Figura 6), yendo desde el centrómero hacia el telómero, el primer gen que interesa considerar es *CDKN1C*, también conocido como *p57<sup>KIP2</sup>*, que codifica un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclinas<sup>15</sup>. La acción de la proteína codificada es, por tanto, de inhibidor del creci-

miento y, en este sentido, se puede decir que *CDKN1C* es un gen supresor de tumores. El siguiente gen, *KCNQ1*, codifica una subunidad de un canal de potasio regulado por voltaje; se transcribe en el sentido telómero-centrómero. *KCNQ1OT1* se encuentra en el interior de *KCNQ1* y se transcribe en sentido contrario (hacia el telómero). Su promotor se encuentra situado en un intrón de *KCNQ1* y el gen codifica un RNA no traducible, antisentido del mRNA de *KCNQ1*, con lo que su expresión anula la aparición del producto de *KCNQ1*. Todos estos genes, junto con otros que no son relevantes para entender la etiología molecular del síndrome de Beckwith-Wiedemann, constituyen el dominio 2 de 11p15. Este dominio posee una ICR en el extremo 5' del gen *KCNQ1OT1*.

El dominio 1, situado en el extremo telomérico del *locus*, contiene dos genes relevantes para el síndrome de Beckwith-Wiedemann. El gen *IGF2* codifica un factor de crecimiento fetal relacionado con la insulina y el gen *H19*, situado en el extremo distal del *locus*, codifica un ncRNA que puede actuar como supresor de tumores, puesto que regula la traducción del mensajero de *IGF2*. Además, en 3' de *H19* se encuentran elementos potenciadores requeridos para la expresión de



**Figura 6.** Representación esquemática del cromosoma 11 humano. Se esquematiza la organización del *locus* subtelomérico 11p15, en el que sólo se han representado los genes relevantes para la enfermedad de Beckwith-Wiedemann. Las flechas acodadas indican el sentido de la transcripción. Véase el texto para una descripción de los diferentes detalles.

<sup>13</sup> El tumor de Wilms es un tipo de cáncer renal.

<sup>14</sup> El rhabdomyosarcoma es un tumor que afecta a tejidos blandos, generalmente durante la infancia.

<sup>15</sup> El papel de las quininas dependientes de ciclinas como promotoras de la proliferación celular se ha revisado en otro lugar (Franco, 2007).

*IGF2*. La expresión de los genes *IGF2* y *H19* está regulada de forma coordinada por la ICR del dominio, situada justo en 5' de *H19*. Esta ICR, en adelante llamada ICR1, es simultáneamente el sitio de unión de CTCF, una proteína aisladora que impide la intercomunicación de *IGF2* con sus elementos potenciadores. Cuando ICR1 no está metilada se transcribe el gen *H19*, pero al unirse CTCF, el gen *IGF2* permanece silente. Por el contrario, si ICR1 está metilada no se transcribe *H19*, ya que las proteínas que reconocen metilcitosina reclutan histona desacetilasas. Pero a la ICR1 metilada no puede unirse CTCF, con lo que se establece la comunicación entre *IGF2* y sus potenciadores y este gen se transcribe.

En la copia paterna del *locus* se encuentra metilada la ICR1, mientras que la ICR2 lo está en la copia materna. Como consecuencia de esta impronta, en el dominio 1 se expresa el alelo materno de *H19*. Por otro lado, al estar metilada ICR1 en la copia paterna, la proteína CTCF no se une a esa secuencia y los elementos potenciadores 3' pueden actuar, con la consiguiente expresión del alelo paterno de *IGF2*. La presencia simultánea del regulador, producto de *H19*, controla la expresión del factor de crecimiento IGF2, con lo que, en situaciones normales, no se produce un crecimiento incontrolado durante el desarrollo fetal y neonatal.

La ICR2, por el contrario, está normalmente metilada en la copia materna y desmetilada en la paterna. Para comprender el alcance de esta impronta, hay que tener en cuenta que ICR2 se encuentra en el promotor de *KCNQ1OT1*, por lo que al estar desmetilada el gen se transcribe y el ncRNA producido anula la expresión del gen *KCNQ1*, pero también la de los genes situados inmediatamente aguas arriba en este dominio (Arnaud y Feil, 2005). En consecuencia, de los genes *KCNQ1* y *CDKN1C* sólo se expresa el alelo materno.

En el 50% de los pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann se da una pérdida esporádica de metilación en ICR2 (Weksberg *et al.*, 2009), lo que da lugar a la ausencia total de *KCNQ1* y *CDKN1C*. La desaparición de esta última proteína, que como se ha dicho antes actúa como inhibidora del crecimiento, es

la causante de los síntomas de sobrecrecimiento, como la macroglosia y el onfalocele; produce también un cierto riesgo, ordinariamente bajo, de tumoración, y no aparece el tumor de Wilms. Otro defecto epigenético de la impronta es la adquisición de metilación en la ICR1 materna, que se da entre el 2 y el 7% de los pacientes del síndrome. En este caso, se expresan tanto el alelo materno como el paterno de *IGF2* y la ausencia simultánea del regulador producido por *H19* conduce a la presencia de una cantidad extra de IGF2. Por este motivo, los individuos que presentan este defecto epigenético tienen un riesgo muy elevado de padecer un tumor pediátrico, especialmente el de Wilms.

Además de servir de modelo para la investigación de mecanismos epigenéticos, el estudio del síndrome de Beckwith-Wiedemann ha permitido profundizar en aspectos de la reprogramación epigenética en las etapas iniciales del desarrollo embrionario al establecer una conexión entre su manipulación y las variaciones en la impronta genómica. En 2002 se publicó el primer estudio clínico que sugería la existencia de una conexión entre las técnicas de reproducción asistida y un síndrome causado por defectos en la impronta genómica, concretamente el síndrome de Angelman<sup>16</sup> (Cox *et al.*, 2002). Un año más tarde se planteó la misma sugerencia en relación al síndrome de Beckwith-Wiedemann (DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003). Como se trata, sin duda, de una cuestión de hondo interés científico y social, puesto que entre el 1 y el 3% de los nacimientos en países desarrollados se produce actualmente tras el empleo de técnicas de reproducción asistida, se ha investigado profusamente en los años transcurridos desde entonces y el tema ha sido objeto de numerosas revisiones (Allen y Reardon, 2005; Amor y Halliday, 2008; Arnaud y Feil, 2005; Hazout *et al.*, 2008; Lucifero *et al.*, 2004; Maher, 2005; Manipalviratn, 2009; Paoloni-Giacobino, 2007; Shiota y Yamada, 2005; Weksberg *et al.*, 2005; 2009; Wrenzycki *et al.*, 2005).

Es evidente que una revisión exhaustiva de los resultados obtenidos a lo largo de estos años estaría aquí fuera de lugar, pero vale la pena señalar algunos de los datos publicados. Si bien las sugerencias ini-

<sup>16</sup> El síndrome de Angelman es un trastorno neurológico que provoca retraso mental, ataxia, y muy frecuentemente microcefalia, convulsiones, hiperactividad y risa incontrolada.

ciales publicadas en 2003 sobre la conexión entre el síndrome de Beckwith-Wiedemann y las técnicas de reproducción asistida se habían basado en un número relativamente pequeño de casos, un año más tarde Halliday *et al.* (2004) publicaron un extenso estudio de caso y control en el que compararon 14.894 niños nacidos mediante técnicas de reproducción asistida con 1.316.500 nacidos tras concepción natural. Frente a los 37 casos de síndrome de Beckwith-Wiedemann detectados entre estos últimos (frecuencia del 0,00281%) entre los primeros encontraron 4 casos (0,0269%), una proporción 9 veces superior a la de la población general. En general, se han descrito tres estudios de cohorte entre 2005 y 2007. En dos de ellos no se detectó ningún caso de síndrome de Beckwith-Wiedemann entre 6.052 y 16.280 niños nacidos tras fecundación asistida, mientras que en el tercero se detectó un caso entre 1.524 nacidos. Por el contrario, en los 7 estudios realizados entre 2003 y 2007 entre pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann se ha encontrado que entre el 2,9 y el 10,8% fueron concebidos mediante técnicas de reproducción asistida (véase la revisión de Manipalviratn *et al.*, 2009). Parece claro, pues, que hay una correlación entre la utilización de técnicas de reproducción asistida y la aparición del síndrome de Beckwith-Wiedemann.

El espectro de las enfermedades epigenéticas es extraordinariamente amplio y el propio título de este artículo indica que su gravedad es muy diferente de unos casos a otros. Se ha comentado cómo el cáncer puede tener en muchas ocasiones un fuerte componente epigenético y se ha contemplado con cierto detalle una enfermedad epigenética típica, como el síndrome de Beckwith-Wiedemann. En las líneas que siguen se consideran otras patologías epigenéticas muy diversas. En primer lugar, se puede reseñar que se ha postulado un origen epigenético mixto para algunas sorderas sensorineurales<sup>17</sup>. Guenther *et al.* (2000) aislaron a partir de células HeLa un complejo que contiene el correpresor SMRT junto con la histona desacetilasa HDAC3 y TBL1, una proteína semejante a la transducina  $\beta$ . El gen que codifica esta proteína está mutado en algunos casos de sordera sensorineural, lo que llevó a los autores a postular que la deficiencia de TBL1, que interacciona directamente con la cro-

matina, dificulta el reclutamiento del complejo que contiene desacetilasa, con la consiguiente alteración en el estado de acetilación de las histonas en los promotores correspondientes. Aunque está por determinar cuál de los genes regulados por este complejo está implicado en la transmisión del impulso nervioso, los resultados sugieren efectivamente un origen genético, con consecuencias epigenéticas para este tipo de sorderas.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la implicación de las histona desacetilasas en la adquisición de la memoria. Utilizando un modelo animal, Guan *et al.* (2009) han mostrado que la sobreexpresión de la histona desacetilasa HDAC2 en neuronas conduce a la disminución del número de sinapsis y de la plasticidad sináptica y a dificultades en la adquisición de la memoria. Curiosamente, la sobreexpresión de HDAC1 no ejerce ninguno de esos efectos. Los autores postulan que las enfermedades que cursan con trastornos de la memoria pueden estar causadas por un exceso de actividad de HDAC2, por lo que la inhibición de esta enzima podría representar una diana terapéutica en tales enfermedades.

Evidentemente, la recopilación de enfermedades epigenéticas que se acaba de hacer es sólo una muestra de la extensión de una clase de patologías a cuya etiología se había prestado hasta hace poco una insuficiente atención. Algunos tipos de leucemia están producidos por translocaciones cromosomales que afectan a los genes de histona acetiltransferasas o histona metilasas. Enfermedades como el ya mencionado síndrome de Angelman o el síndrome de Prader-Willi se originan también por alteraciones epigenéticas en la impronta genómica. El síndrome de Rubinstein-Taybi se produce por mutaciones en la histona acetiltransferasa CBP. Algunos autores, por fin, incluyen algunas enfermedades mentales, como la esquizofrenia, la ansiedad o la depresión entre las que pueden tener un componente epigenético. El artículo ya citado de Zoghbi y Beaudet (2006) contiene una revisión sistemática de enfermedades epigenéticas.

Para concluir este apartado, cabe mencionar que está demostrado que el medio ambiente puede alterar

<sup>17</sup> Se denominan sensorineurales aquellos tipos de sordera cuya causa se encuentra en una deficiente transmisión del impulso nervioso a través del nervio vestibulococlear o nervio auditivo.

el epigenoma, con el consiguiente riesgo patogénico potencial. De hecho agentes medioambientales como las radiaciones, la contaminación, etc. pueden afectar también el genoma, pero, como se ha comentado más arriba, los organismos tienen mecanismos de reparación que corrigen gran parte de las alteraciones genómicas, mientras que no se han descrito mecanismos para reparar el epigenoma. Esto explica que la exposición al humo de tabaco, el alcoholismo crónico o la alimentación se hayan descrito entre los factores que pueden alterar el epigenoma, con el riesgo patogénico asociado (Zoghbi y Beaudet, 2006).

## MEDICAMENTOS EPIGENÉTICOS

De la misma manera que se puede hablar con toda propiedad de enfermedades epigenéticas, desde hace algunos años se ha comenzado a hablar de *terapia epigenética*, término acuñado por Baylin y Jones (2006). Si muchas enfermedades epigenéticas tienen como causa una aberrante metilación del DNA o una modificación errónea de histonas, un medicamento que corrigiera esos defectos moleculares podría llamarse legítimamente un *medicamento epigenético*. Hasta ahora se han utilizado fundamentalmente inhibidores de la metilación del DNA y de la desacetilación de histonas, con los que se han llegado a hacer numerosos ensayos clínicos. A finales de agosto de 2009 había 20 ensayos clínicos activos que utilizan inhibidores de histona desacetilasas para tratar tumores y policitemia y para eliminar el virus de la inmunodeficiencia humana latente. Otros 20 ensayos clínicos activos están encaminados a reducir la hipermetilación del DNA<sup>18</sup>.

Los inhibidores de la metilación del DNA que se usan con finalidad terapéutica son, fundamentalmente, la 5-azacitidina, la 5-aza-2'-desoxicitidina y la zebularina (1-β-D-ribofuranosil-2(1H)-pirimidinona), que pueden incorporarse a las células tumorales. En ellas se convierten en los correspondientes trifosfatos, que pueden actuar como sustratos de las DNA polimerasas. Una vez incorporados al DNA, interaccionan con las DNA metilasas que quedan covalentemente unidas a estos análogos, con lo que se inhibe la metilación del DNA en las siguientes rondas de replicación.

Por lo que se refiere a la inhibición de las histona desacetilasas, se suelen emplear derivados del butirato, un conocido inhibidor de estas enzimas, ácidos hidroxámicos, como el SAHA (ácido suberoanilida-hidroxámico) y algunos depsipéptidos. El inconveniente que presentan estas moléculas es que inhiben todas las desacetilasas de forma inespecífica, con lo que resulta difícil predecir los efectos secundarios, que hay que establecer de forma empírica (Baylin y Jones, 2006). En cualquier caso, los fármacos epigenéticos constituyen hoy en día una prometedora vía terapéutica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN, C. Y REARDON, W. (2005) Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG* **112**, 1589-1594.
2. ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. Y MIRSKY, A. E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786-794.
3. AMIR, R. E., VAN DEN VEYVER, I. B., WAN, M., TRAN, C. Q., FRANCKE, U. Y ZOGHBI, H. Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* **23**, 185-188.
4. AMOR, D. J. Y HALLIDAY, J. (2008) A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.* **23**, 2826-2834.
5. ARENTS, G., BURLINGAME, R. W., WANG, B. -C., LOVE, W. E., Y MOUDRIANAKIS, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10148-10152.
6. ARENTS, G. Y MOUDRIANAKIS, E. N. (1993) Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10489-10493.
7. ARNAUD, P. Y FEIL, R. (2005) Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Def. Res. (Part C)* **75**, 81-97.
8. AUSIÓ, J., LEVIN, D. B., DE AMORIM, G. V., BAKKER,

<sup>18</sup> Datos obtenidos en la fecha indicada de [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

- S. Y MACLEOD, P. M. (2003) Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin. Genet.* **64**, 83-95.
9. BALLESTAR, E., PILE, L. A., WASSARMAN, D. A., WOLFFE, A. P. Y WADE, P. A. (2001) A *Drosophila* MBD family member is a transcriptional corepressor associated with specific genes. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5397-5406.
  10. BARTON, S. C., SURANI, M. A. Y NORRIS, M. L. (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**, 374-376.
  11. BAYLIN, S. B. Y JONES, P. A. (2006) Epigenetic determinants of cancer, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 457-476, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
  12. BERNSTEIN, B. E., MEISSNER, A. Y LANDER, E. S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
  13. BESTOR, T. H. (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* **11**, 2611-2617.
  14. BIRD, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
  15. BLIEK, J., VERDE, G., CALLAWAY, J. MAAS, S. M., DE CRESCENZO, A., SPARAGO, A., CERRATO, F., RUSSO, S., FERRAIUOLO, S., RINALDI, M. M., FISCHETTO, R., LALATTA, F., GIORDANO, L., FERRARI, P., CUBELLIS, M. V., LARIZZA, L., TEMPLE, I. K., MANNENS, M. M., MACKAY, D. J. Y RICCIO, A. (2009) Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including *PLAGL1* and *GNAS* loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 611-619.
  16. CLOOS, P. A. C., CHRISTENSEN, J., AGGER, K. Y HELIN, K. (2008) Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Gen. Develop.* **22**, 1115-1140.
  17. COHEN, M. M. JR. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr. Dev. Pathol.* **8**, 287-304.
  18. COX, G. F., BÜRGER, J., LIP, V., MAU, U. A., SPERLING, K., WU, B. L. Y HORSTHEMKE, B. (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 162-164.
  19. CRAMER, P., BUSHNELL, D. A. Y KORNBERG, R. D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science* **292**, 1863-1876.
  20. CRICK, F. H. C. (1958) On protein synthesis. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 138-163.
  21. DABAN, J. R. Y BERMÚDEZ, A. (1998) Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry* **37**, 4299-4304.
  22. DEBAUN, M. R., NIEMITZ, E. L. Y FEINBERG, A. P. (2003) Association of *in vitro* fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 156-160.
  23. DORIGO, B., SCHALCH, T., KULANGARA, A., DUDA, S., SCHROEDER, R. R. Y RICHMOND, T. J. (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* **306**, 1571-1573.
  24. EDEN, S., HASHIMSHONY, T., KESHET, I., CEDAR, H., THORNE, A. W. (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature* **394**, 842.
  25. EDWARDS, S. J. L., LILFORD, R. J., BRAUNHOLTZ, D. Y JACKSON, J. (1997) Why "underpowered" trials are not necessarily unethical. *Lancet* **350**, 804-807.
  26. EHRLICH, M. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2709-2721.
  27. ELTSOV, M., MACLELLAN, K. M., MAESHIMA, K., FRANGAKIS, A. S. Y DUBOCHET, J. (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19732-19737.
  28. ESTELLER, M. (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Brit. J. Cancer* **94**, 179-183.
  29. FEINBERG, A. P. (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**, 433-440.
  30. FEINBERG, A. P. Y VOGELSTEIN, B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92.
  31. FINGERMAN, I. M., DU, H. N. Y BRIGGS, S. D. (2008) Controlling histone methylation via trans-histone pathways. *Epigenetics* **3**, 237-242.
  32. FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M., KOSTAS, S., DRIVER, S. Y MELLO, C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
  33. FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., PAZ, M. F., ROPERO, S., SETIEN, F., BALLESTAR, M. L., HEINE-SUÑER, D., CIGUDOSA, J. C., URIOSTE, M., BENITEZ, J., BOIX-CHORNET, M., SANCHEZ-AGUILERA, A., LING, C., CARLSSON, E., POULSEN, P., VAAG, A., STEPHAN, Z., SPECTOR, T. D., WU, Y. Z., PLASS, C. Y ESTELLER, M. (2005a) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10604-10609.
  34. FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., VILLAR-GAREA, A., BOIX-CHORNET, M., ESPADA, J., SCHOTTA, G., BONALDI, T., HAYDON, C., ROPERO, S., PETRIE, K., IYER, N. G., PÉREZ-ROSADO, A., CALVO, E., LOPEZ, J. A., CANO, A., CALASANZ, M. J., COLOMER, D., PIRIS,

- M. A., AHN, N., IMHOF, A., CALDAS, C., JENUWEIN, T. Y ESTELLER, M. (2005b) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* **37**, 391-400.
35. FRANCO, L. (2000) Histone acetylation and the regulation of gene expression, en *V Workshop on "Methionine Metabolism: Molecular and Clinical Implications"*, pp. 105-120. Universidad de Navarra.
36. FRANCO, L. (2007) ¿Por qué proliferan las células? *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **101**, 111-126.
37. FRANCO, L. (2008) El código genético cumple 40 años. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **102**, 201-213.
38. GICQUEL, C., GASTON, V., MANDELBAUM, J., SIFFROI, J. P., FLAHAULT, A. Y LE BOUC, Y. (2003) In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1338-1341.
39. GOLL, M. G. Y BESTOR, T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481-514.
40. GREER, K. J., KIRKPATRICK, S. J., WEKSBURG, R. Y PAULI, R. M. (2008) Beckwith-Wiedemann syndrome in adults: Observations from one family and recommendations for care. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 1707-1712.
41. GUAN, J-S., HAGGARTY, S. J., GIACOMETTI, E., DANNENBERG, J. H., JOSEPH, N., GAO, J., NIELAND, T. J., ZHOU, Y., WANG, X., MAZITSCHKE, R., BRADNER, J. E., DEPINHO, R. A., JAENISCH, R., TSAI, L. H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**, 55-60.
42. GUENTHER, M. G., LANE, W. S., FISCHLE, W., VERDIN, E., LAZAR, M. A. Y SHIEKHATTAR, R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev.* **14**, 1048-1057.
43. HALLIDAY, J., OKE, K., BREHENY, S., ALGAR, E. Y AMOR, D. (2004) Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 526-528.
44. HAZOUT, A., MENEZO, Y., MADELENAT, P., YAZBECK, C., SELVA, J. Y COHEN-BACRIE, P. (2008) Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynéc. Obstét. Fertil.* **36**, 1109-1117.
45. JACOB, F. Y MONOD, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.
46. JIANG, Y. H., BRESSLER, J. Y BEAUDET, A. L. (2004) Epigenetics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 479-510.
47. KANGASPESKA, S., STRIDE, B., MÉTIVIER, R., POLYCARPOU-SCHWARZ, M., IBBERSON, D., CARMOUCHE, R. P., BENES, V., GANNON, F. Y REID, G. (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**, 112-115.
48. KIM, J. K., SAMARANAYAKE, M. Y PRADHAN, S. (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 596-612.
49. KO, M., SOHN, D. H., CHUNG, H. Y SEONG, R. H. (2008) Chromatin remodeling, development and disease. *Mutat. Res.* **647**, 59-67.
50. KORENKE, G. C., FUCHS, S., KRASEMANN, E., DOERR, H. G., WILICHOWSKI, E., HUNNEMAN, D. H. Y HANEFELD, F. (1996) Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann. Neurol.* **40**, 254-257.
51. KORNBERG, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.
52. LAPUNZINA P. (2005) Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am. J. Med. Genet.* **137C**, 53-71.
53. LI, E., BEARD, C. Y JAENISCH, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365.
54. LI, E. Y BIRD, A. (2006) DNA methylation in mammals, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 341-356, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
55. LI, M., SQUIRE, J. A. Y WEKSBURG, R. (1998) Molecular genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **79**, 253-259.
56. LUCIFERO, D., CHAILLET, J. R. Y TRASLER, J. M. (2004) Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum. Reprod. Update* **10**, 3-18.
57. LUGER, K., MÄDER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. Y RICHMOND, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
58. MAHER, E. R. (2005) Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum. Mol. Genet.* **14**, R133-R138.
59. MAHER, E. R., BRUETON, L. A., BOWDIN, S. C., LUHARIA, A., COOPER, W., COLE, T. R., MACDONALD, F., SAMPSON, J. R., BARRATT, C. L., REIK, W. Y HAWKINS, M. M. (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.* **40**, 62-64.
60. MANIPALVIRATN, S., DECHERNEY, A. Y SEGARS, J. (2009) Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* **91**, 305-315.

61. MARMORSTEIN, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 422-432.
62. MARTIENSSEN, R. Y MOAZED, D. (2006) RNAi and heterochromatin assembly, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 151-166, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
63. MARTIN, C. Y ZHANG, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 838-849.
64. MATTICK, J. S. (2003) Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* **25**, 930-939.
65. MATTICK, J. S. (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 316-323.
66. MCGRATH, J. Y SOLTER, D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179-183.
67. MEHLER, M. F. (2008) Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog. Neurobiol.* **86**, 305-341.
68. MÉTIVIER, R., GALLAIS, R., TIFOUCHE, C., LE PÉRON, C., JURKOWSKA, R. Z., CARMOUCHE, R. P., IBBERSON, D., BARATH, P., DEMAY, F., REID, G., BENES, V., JELTSCH, A., GANNON, F. Y SALBERT, G. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45-50.
69. MOHANDAS, T., SPARKES, R. S. Y SHAPIRO, L. J. (1981) Reactivation of an inactive human X-chromosome. Evidence for X-inactivation by DNA methylation. *Science* **211**, 393-396.
70. OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A., AND LI, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
71. ONG, M. S., RICHMOND, T. J. Y DAVEY, C. A. (2007) DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core. *J. Mol. Biol.* **368**, 1067-1074.
72. OOI, S. K. Y BESTOR, T. H. (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**, 1145-1148.
73. PAOLONI-GIACOBINO, A. (2007) Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr. Res.* **61**, 51R-57R.
74. PETERSON, C. L. Y LANIEL, M. A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546-R551.
75. PRADHAN, S., BACCOLLA, A., WELLS, R. D. Y ROBERTS, R. J. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 33002-33010.
76. RICHMOND, T. J. Y DAVEY, C. A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145-150.
77. ROBERTSON, K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597-610.
78. ROBINSON, P. J., FAIRALL, L., HUYNH, V. A. Y RHODES, D. (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6506-6511.
79. RUMP, P., ZEEGERS, M. P. Y VAN ESSEN, A. J. (2005) Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet.* **136A**, 95-104.
80. SHIOTA, K. Y YAMADA, S. (2005) Assisted reproductive technologies and birth defects. *Congen. Anom.* **45**, 39-43.
81. STRAHL, B. D. Y ALLIS, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
82. TAFT, R. J., PHEASANT, M. Y MATTICK, J. S. (2007) The relationship between non-protein coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* **29**, 288-299.
83. TURNER, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **22**, 836-845.
84. UMLAUF, D., GOTO, Y., CAO, R., CERQUEIRA, F., WAGSCHAL, A., ZHANG, Y. Y FEIL, R. (2004) Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* **36**, 1296-1300.
85. VAISSIÈRE, T., SAWAN, C. Y HERCEG, Z. (2008) Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* **659**, 40-48.
86. VANYUSHIN, B. F., TKACHEVA, S. G. Y BELOZERSKY, A. N. (1970) Rare bases in animal DNA. *Nature* **225**, 948-949.
87. WADDINGTON, C.H. (1942) The epigenotype. *Endeavour* **1**, 18-20.
88. WANG, J., HEVI, S., KURASH, J. K., LEI, H., GAY, F., BAIKO, J., SU, H., SUN, W., CHANG, H., XU, G., GAUDET, F., LI, E. Y CHEN, T. (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* **41**, 125-129.
89. WANGLER, M. F., CHANG, A. S., MOLEY, K. H., FEINBERG, A. P. Y DEBAUN, M. R. (2005) Factors associated with preterm delivery in mothers of children with Beckwith-Wiedemann syndrome: A case cohort study from the BWS registry. *Am. J. Med. Genet.* **134A**, 187-191.
90. WATSON, J. D. Y CRICK, F. H. C. (1953a) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
91. WATSON, J. D. Y CRICK, F. H. C. (1953b) Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**, 964-967.

92. WEKSBERG, R., SHUMAN, C. Y BECKWITH, J. B. (2009) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* [Epub ahead of print]
93. WEKSBERG, R., SHUMAN, C. Y SMITH, A. C. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **137C**, 12-23.
94. WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., GEBERT, C., KORSawe, K., LEMME, E., CARNWATH, J. W. Y NIEMANN H. (2005) Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Def. Res.* **75C**, 1-9.
95. ZHANG, B., PAN, X., COBB, G. P. Y ANDERSON, T. A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **302**, 1-12.
96. ZHANG, Y. Y REINBERG, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.
97. ZOGHBI, H. Y. Y BEAUDET, A. L. (2006) Epigenetics and human disease, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 435-456, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.