

# LA EPIGENÉTICA



# PROYECTO GENOMA HUMANO

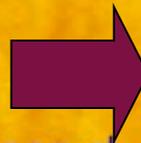
- OBJETIVO

IDENTIFICAR GENES QUE SE TRADUCEN EN PROTEÍNAS

SE PUBLICÓ EN ABRIL DEL 2003 LA SECUENCIA DEL ADN DE *Homo sapiens*.

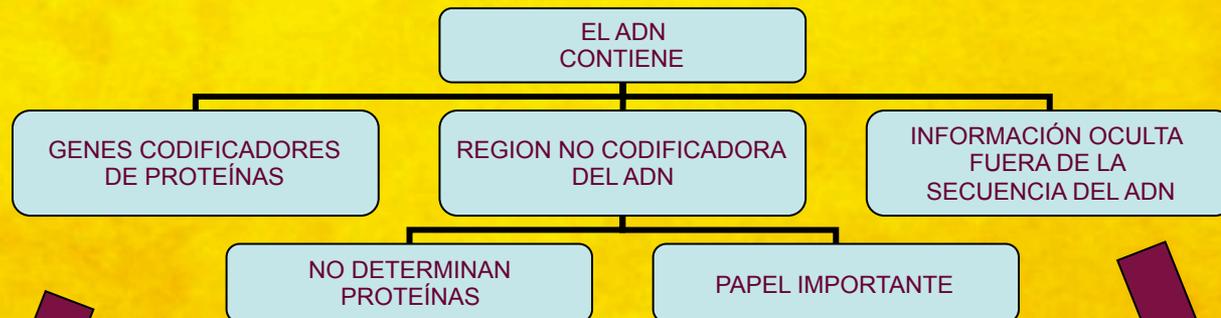
SE CREE QUE EN SUS 3000 MILLONES DE BASES ESTÁN LOS PLANOS DE LA VIDA.

¿ES EL GENOMA ALGO ESTÁTICO Y TRASMISIBLE?



MÁQUINA BIOQUÍMICA CON ELEMENTOS QUE INTERACTÚAN

# MECANISMO GENÓMICO



SON LAS ESTRUCTURAS MEJOR CONOCIDAS <2% ADN TOTAL



DAN LUGAR A ARN ACTIVOS QUE MODIFICAN EL COMPORTAMIENTO DE LOS GENES CODIFICADORES



CAPA EPIGENÉTICA



# CAPA EPIGENÉTICA

- SON PROTEÍNAS Y METABOLITOS QUE SE ADHIEREN AL ADN
- NO ALTERAN LA SECUENCIA DEL ADN
- PUEDEN AFECTAR A LA SALUD Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS
- ALGUNOS PASAN DE PADRES A HIJOS
- PARECEN TENER UN PAPEL ESENCIAL EN EL DESARROLLO, EL ENVEJECIMIENTO Y EL CÁNCER
- LAS EPIMUTACIONES CONTRIBUYEN A LA DIABETES, ESQUIZOFRENIA, TRASTORNO BIPOLAR Y OTRAS ENFERMEDADES COMPLEJAS.



# METILOS EPIGENÉTICOS

EL METILO TIENE AFINIDAD ESPECIAL POR LAS CITOSINAS

CUANTO MÁS METILADA ESTA UNA HEBRA DE ADN MENOR ES LA PROBABILIDAD DE TRANSCRIBIRSE EN ARN

LA METILACIÓN DEL ADN DEFIENDE EL GENOMA DE LOS TRANSPOSONES YA QUE LOS BLOQUEA



# ¿QUÉ SON LOS TRANSPOSONES?

- SON LOS TAMBIEN LLAMADOS GENES SALTARINES
- SON GENES QUE SE AUTOCLONAN
- SE INSERTAN EN REGIONES DISTANTES DEL GENOMA
- CONSTITUYEN EL 45% E LA SECUENCIA DEL GENOMA¿...?



# FUNCIÓN DE LOS TRANSPOSONES

- UNAS VECES SUPERACTIVAN GENES
- OTRAS VECES LOS DESACTIVAN



# ¿QUÉ OCURRE CUÁNDO FALLAN LAS DEFENSAS METÍLICAS?

Se han realizado experimentos con células madres embrionarias, y mediante técnicas de ingeniería genética se bloquearon las enzimas que añadían los grupos metilos.

**¿Cuál fue el resultado?**



## ¿QUÉ OCURRE CUANDO FALLAN LAS DEFENSAS METÍLICAS?

- Se activan muchos transposones y la tasa de mutaciones en el ADN se decuplicó.

## ¿EXISTE ALGUNA RELACIÓN ENTRE ANOMALÍAS EPIGENÉTICAS Y EL DESCONTROL GENÉTICO QUE CONDUCE AL CÁNCER?

- Las células tumorales tienen su genoma escasamente metilado y algunos genes altamente metilados para evitar que las células dañadas se vuelvan malignas



## ¿POR QUÉ SE PRODUCE ESA DESMETILACIÓN?

- No se sabe.
- No se han identificado enzimas desmetilantes.
- Se sospecha que los cromosomas pobres en metilo funcionan peor durante la división celular.

## CONCLUSIÓN

- La idea de que la carencia de metilos en el ADN desemboque en un cáncer es solo una hipótesis, sin embargo muchas células tumorales poseen genes oncosupresores con secuencias normales de ADN pero inoperantes por un exceso de metilación.



## ¿QUÉ DIRIGE A LAS ENZIMAS METILANTES HACIA ESOS GENES SUPRESORES DE TUMORES?

- La metilación no silencia los genes, sino que fija su estado latente.
- Las enzimas metilantes actúan según ordenes de alguna otra parte.
- La reprogramación epigenética fracasa en clones obtenidos al sustituir por ADN de una célula adulta el ADN de un óvulo fecundado. Estos clones tienen patrones anormales de metilación y de expresión génica.



¿POR QUÉ EL RIESGO DE PADECER CÁNCER CRECE CON LA EDAD?

EN LOS CROMOSOMAS EXISTEN

```
graph TD; A([EN LOS CROMOSOMAS EXISTEN]) --> B[ZONAS MUY CONDENSADAS Y ALTAMENTE METILADAS]; A --> C[ZONAS NO METILADAS]; B --> D[SON SILENCIOSAS]; C --> E[SON MUY ACTIVAS]; F[ESAS BARRERAS SE DESINTEGRAN CON EL PASO DE LOS AÑOS A MEDIDA QUE LAS CÉLULAS SE DIVIDEN O ENVEJECEN];
```

ZONAS MUY CONDENSADAS  
Y ALTAMENTE METILADAS

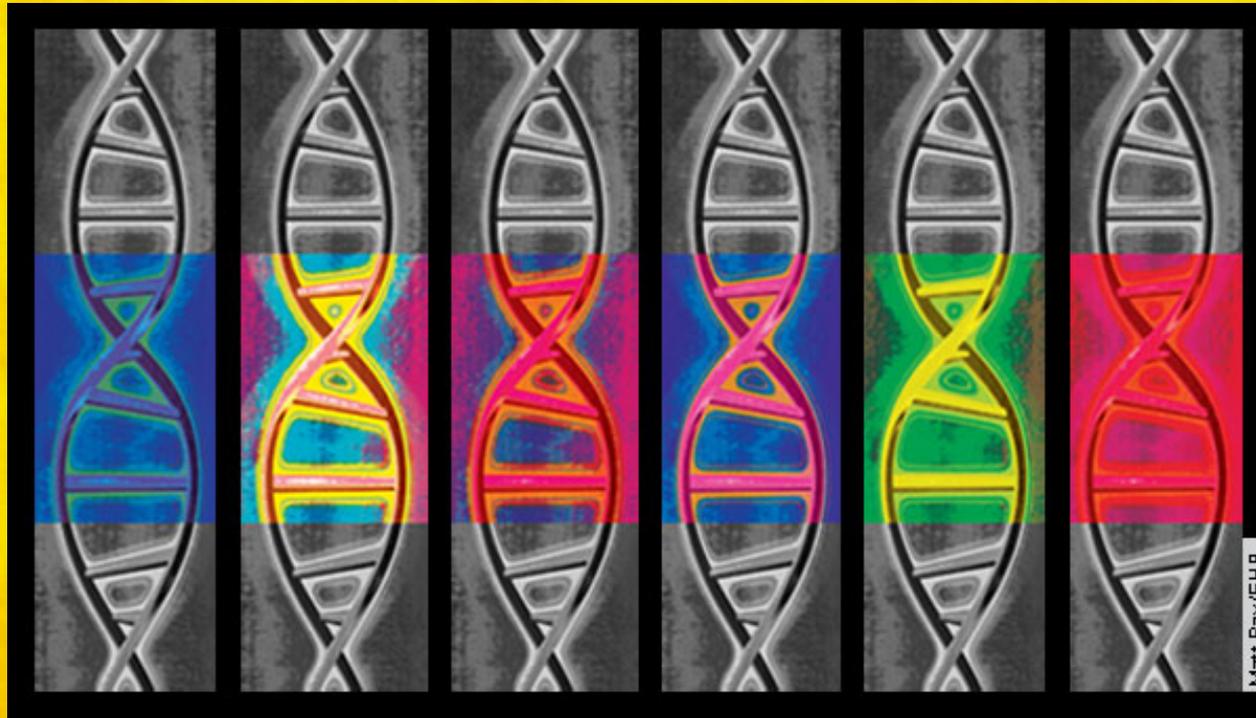
ZONAS NO METILADAS

SON SILENCIOSAS

SON MUY ACTIVAS

ESAS BARRERAS SE DESINTEGRAN CON EL PASO DE LOS AÑOS A MEDIDA QUE LAS CÉLULAS SE DIVIDEN O ENVEJECEN

# EPIGENÉTICA



## METILACIÓN Y CÁNCER



# PRESENTACIÓN

- Definición de epigenética y mecanismos
- Técnicas
- Ámbitos de aplicación
  - Metilación de DNA y cáncer
    - Concepto
    - Utilidades
    - Aplicación en cáncer de pulmón (proyecto)
- Conclusiones

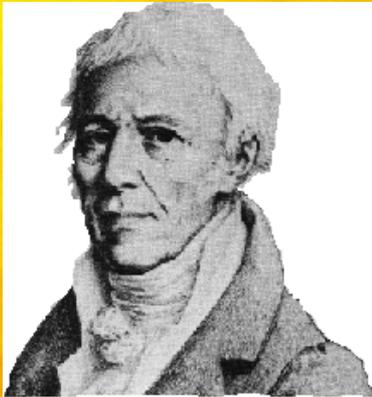


# EPIGENÉTICA

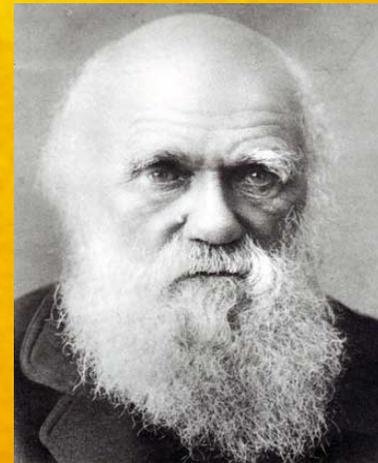
- **Epigenética:** cambios heredables en la expresión génica que no van acompañados de cambios en la secuencia de DNA
- Modificación por el entorno: edad, dieta, tabaco...



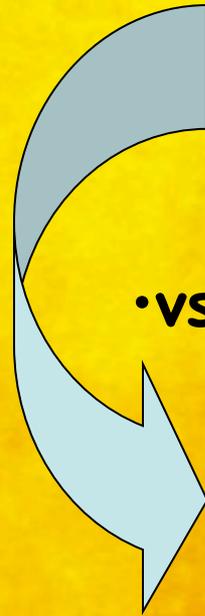
# EPIGENÉTICA



• LAMARCK



• DARWIN



•VS

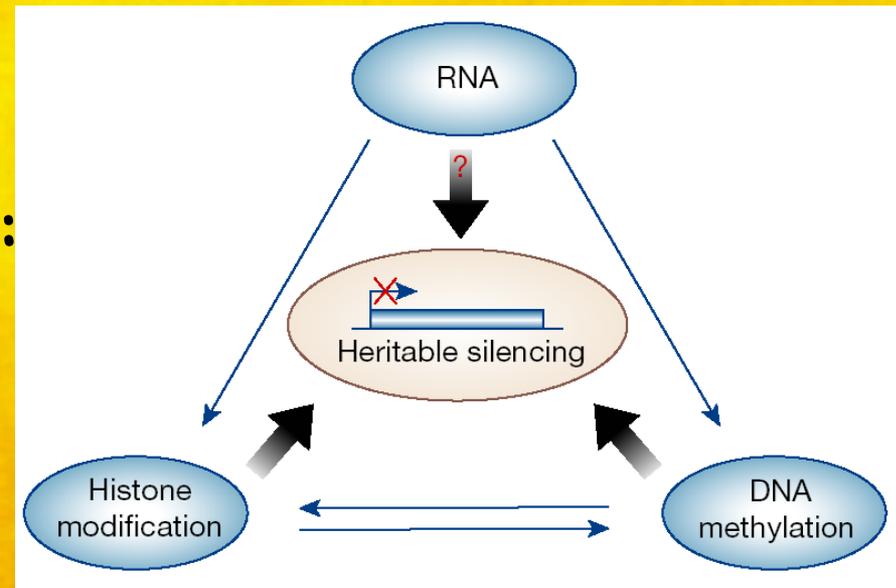


# EPIGENÉTICA

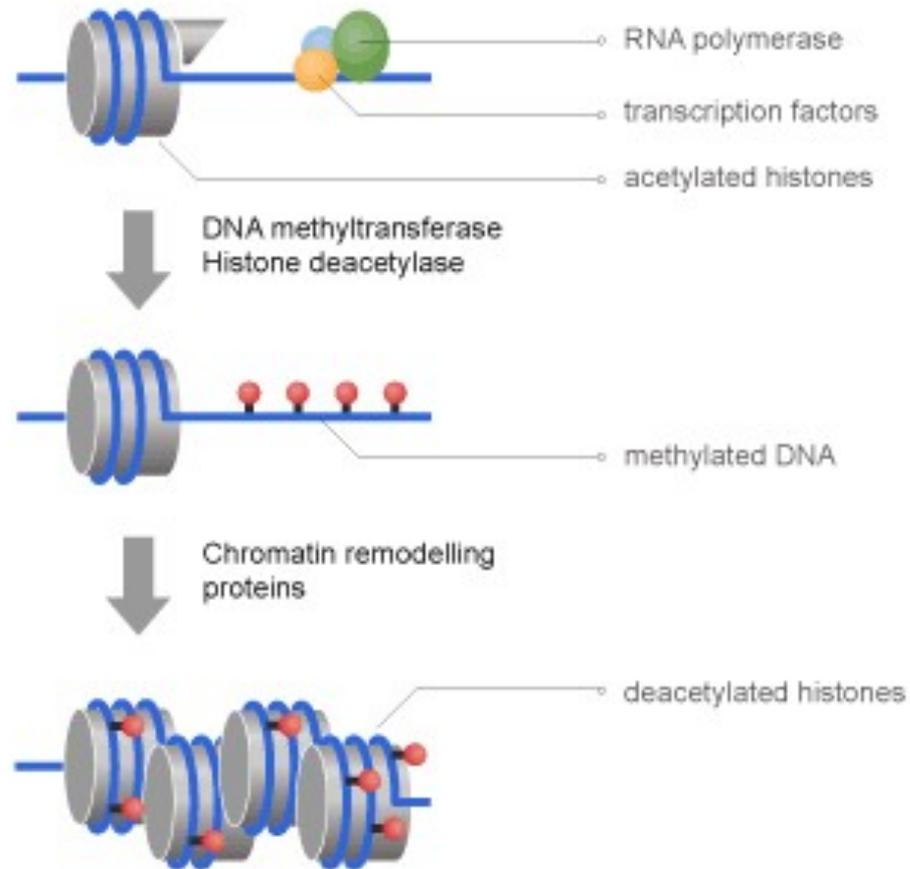
• Mecanismos silenciadores

• Comprende:

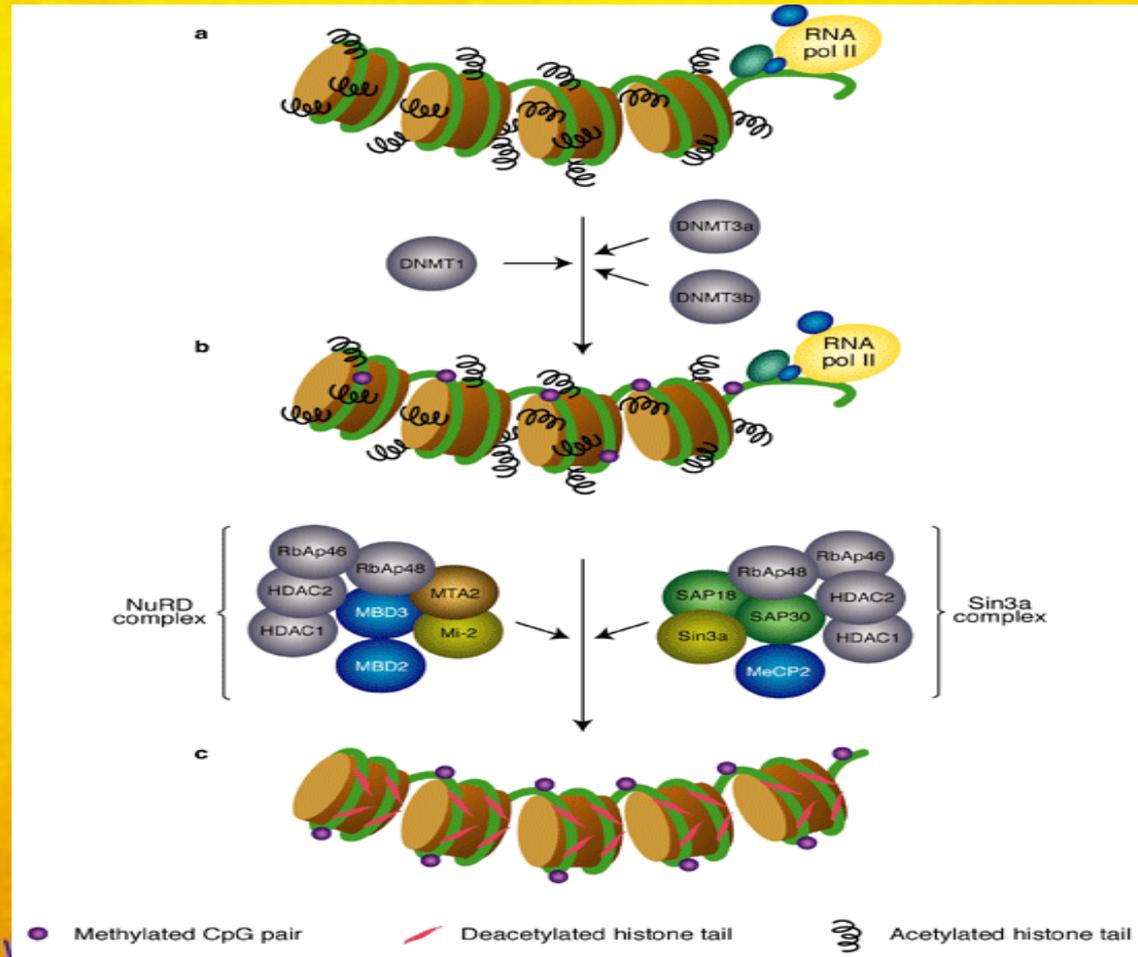
- Metilación de DNA
- Modificación de histonas:
  - Deacetilación
  - Metilación
- RNA de interferencia



# EPIGENÉTICA

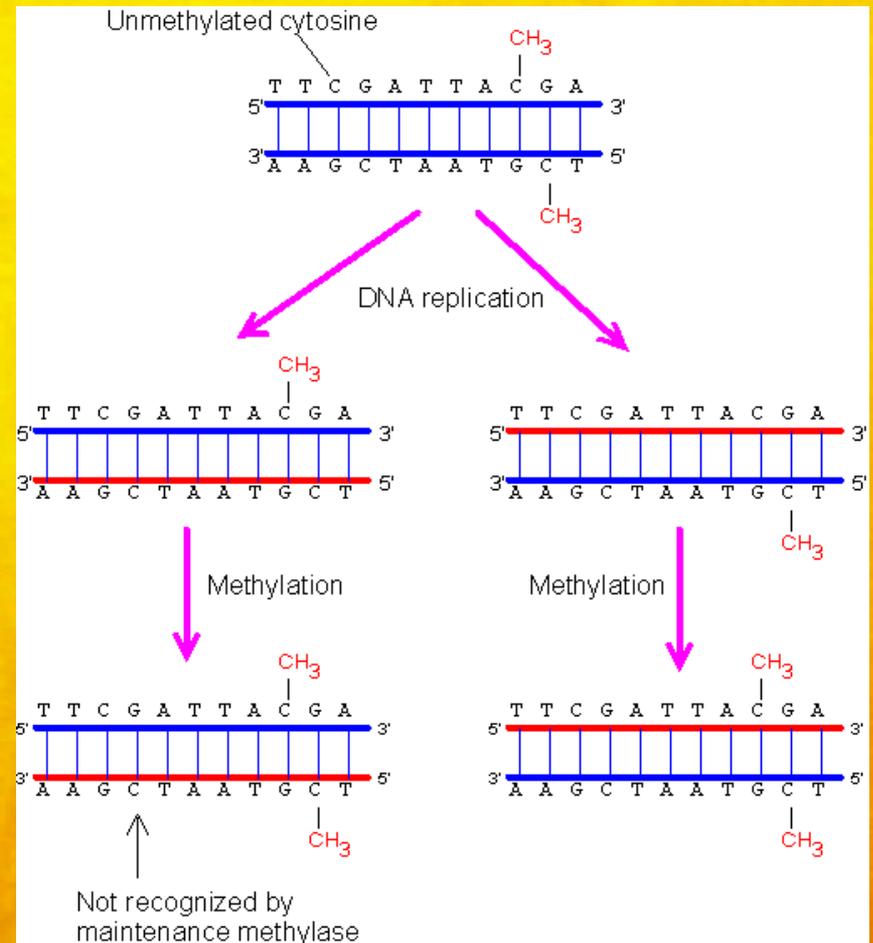


# EPIGENÉTICA

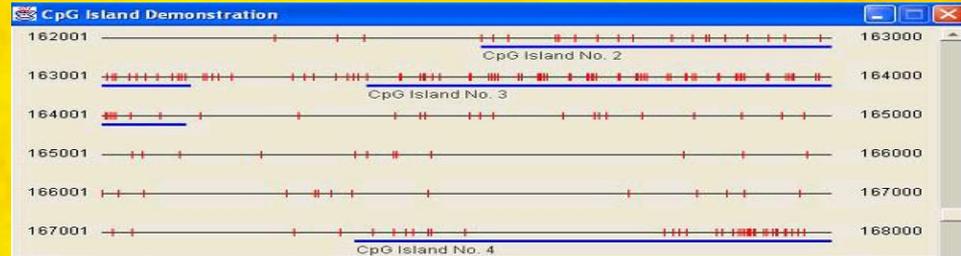


# EPIGENÉTICA

- La metilación tiene lugar en las citosinas de los dinucleótidos CpG
- Herencia conservada a través de DNMTs
- Interés basado en las islas CpG, zonas de alta densidad de dinucleótidos localizadas en promotores



# EPIGENÉTICA



- Islas CpG:
  - Regiones de entre 0.5 y 5Kb con un contenido en dinucleótidos G:C de al menos un 55%
  - Suponen un 1% del genoma
  - La mayoría no están metiladas
  - En condiciones normales no juegan un papel importante en la regulación génica
- Aproximadamente el 70% de las parejas CpG del genoma se encuentran metiladas (intrones, transposones)



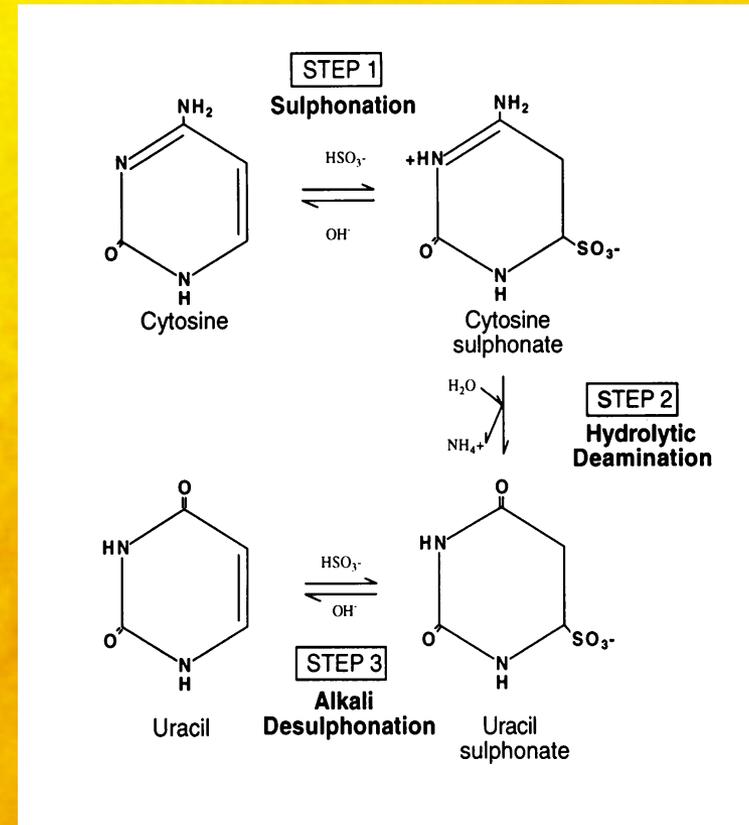
# ROLES DE LA EPIGENÉTICA

- La epigenética participa en:
  - Desarrollo embrionario
  - Diferenciación tisular
  - “Imprinting” génico
  - Inactivación del cromosoma X
  - Represión de DNA parásito (transposones)
  - Papel menor en la regulación génica (islas CpG normalmente no metiladas), pero importante en patología

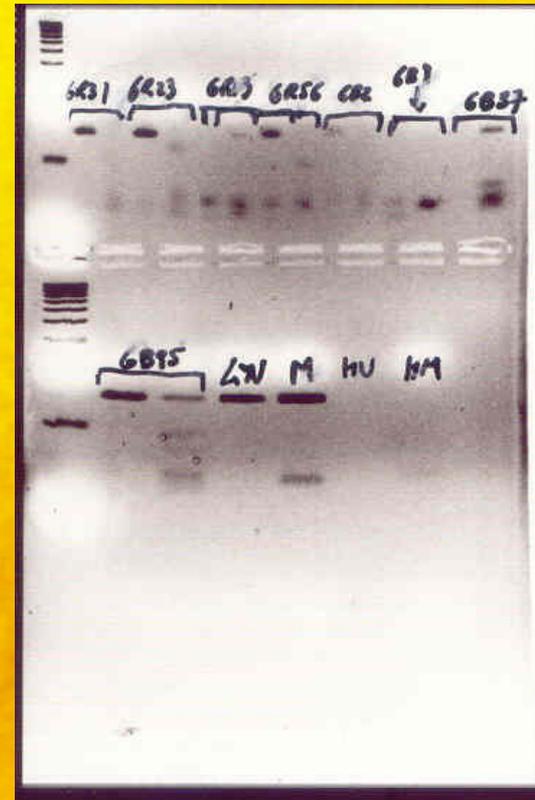
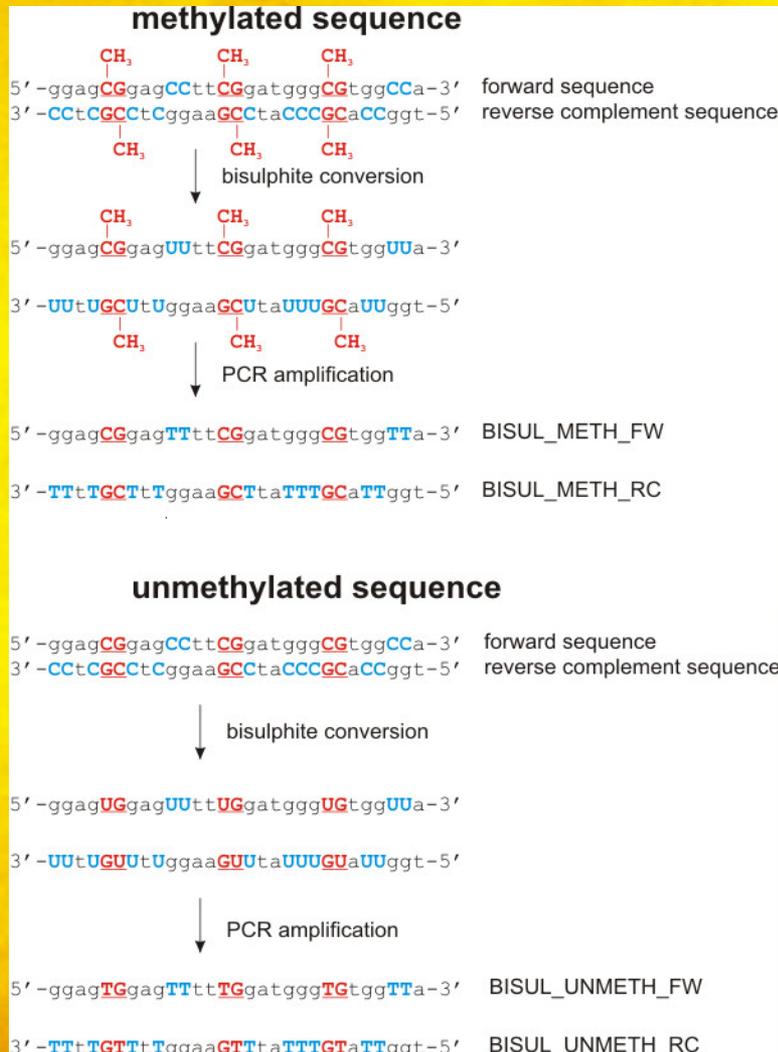


# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: TÉCNICAS

- **MSP (methylation specific PCR)**
  - Conversión de las muestras con bisulfito
    - Paso de las citosinas no metiladas a uracilo (las metiladas se mantienen por impedimento estérico)
    - PCR por duplicado con primers para muestras metiladas y no metiladas (sustitución de uracilos por timinas)
    - Sensibilidad: 1 de cada 10.000 (50.000 en caso de usar nested, con primers externos)
    - Problema de falsos positivos: inclusión de controles metilados y no metilados en cada proceso



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: TÉCNICAS



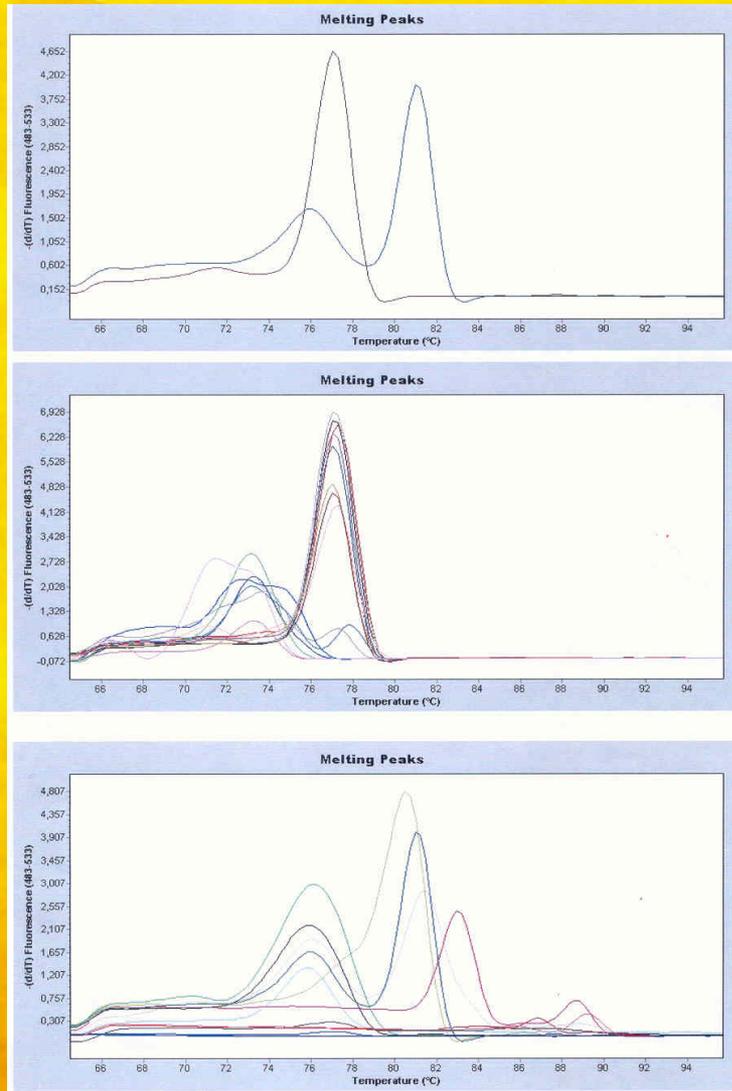
# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: TÉCNICAS

- **Light cycler:**

- Basado en PCR a tiempo real e incorporación de fluoróforos
- Curvas Melting: liberación del fluoróforo a una determinada temperatura una vez completada la reacción
- Diferentes temperaturas debido a los enlaces entre pares de bases:
  - T-G (2 enlaces)
  - C-G (3 enlaces)
- Uso de primers
  - MSP
  - Externos
- Ventajas:
  - Mayor sensibilidad y rapidez
  - Posibilidad de cuantificación



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: TÉCNICAS



→ •Controles

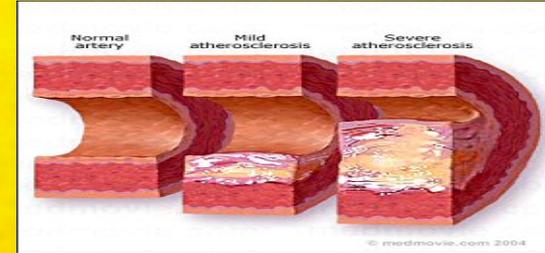
→ •Muestras no metiladas

→ •Muestras metiladas

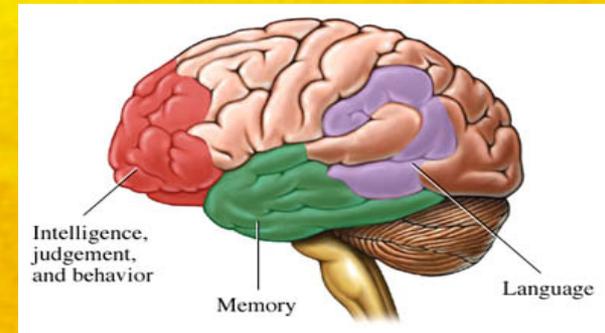


# ALGUNAS APLICACIONES INCIPIENTES

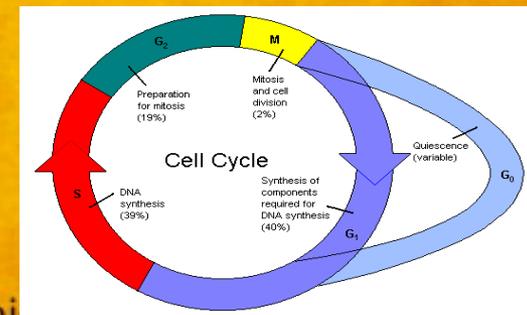
- Ateroesclerosis →



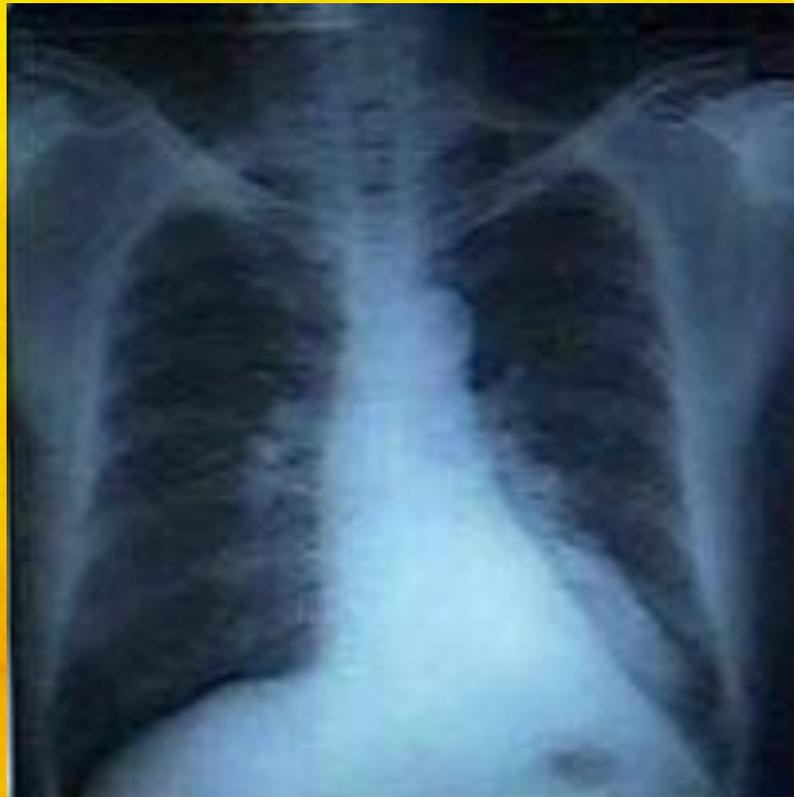
- Alzheimer-Parkinson y otras alteraciones del sistema nervioso →



- Cáncer →



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER

- Las células malignas van acompañadas de una hipometilación global (20-60%) y una hipermetilación local (islas CpG) y ambos sucesos son graduales

## – Hipometilación

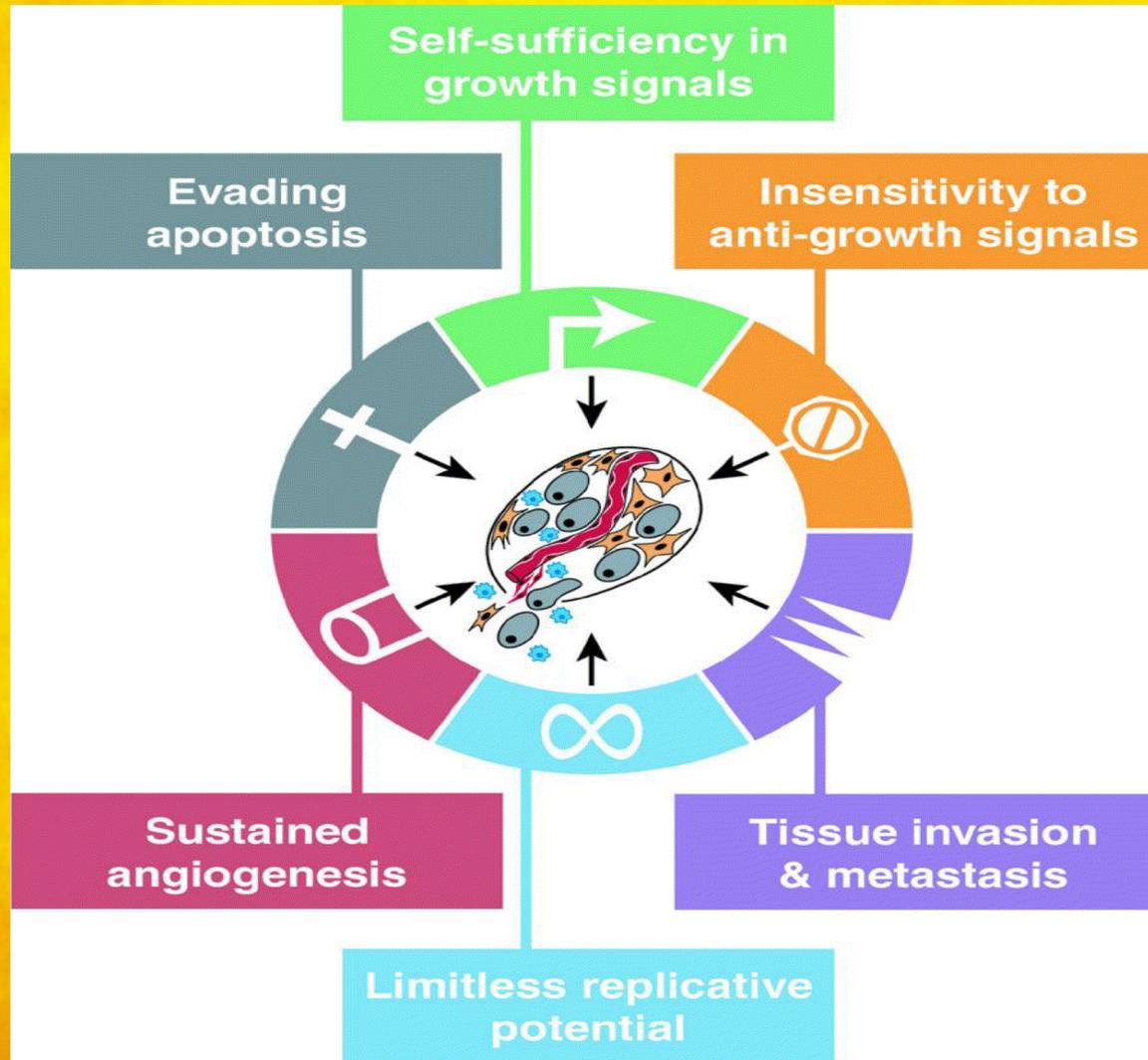
- Inestabilidad cromosómica
- No papel en activación de oncogenes

## – Hipermetilación

- Genes supresores de tumores
  - Multitud de candidatos



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER

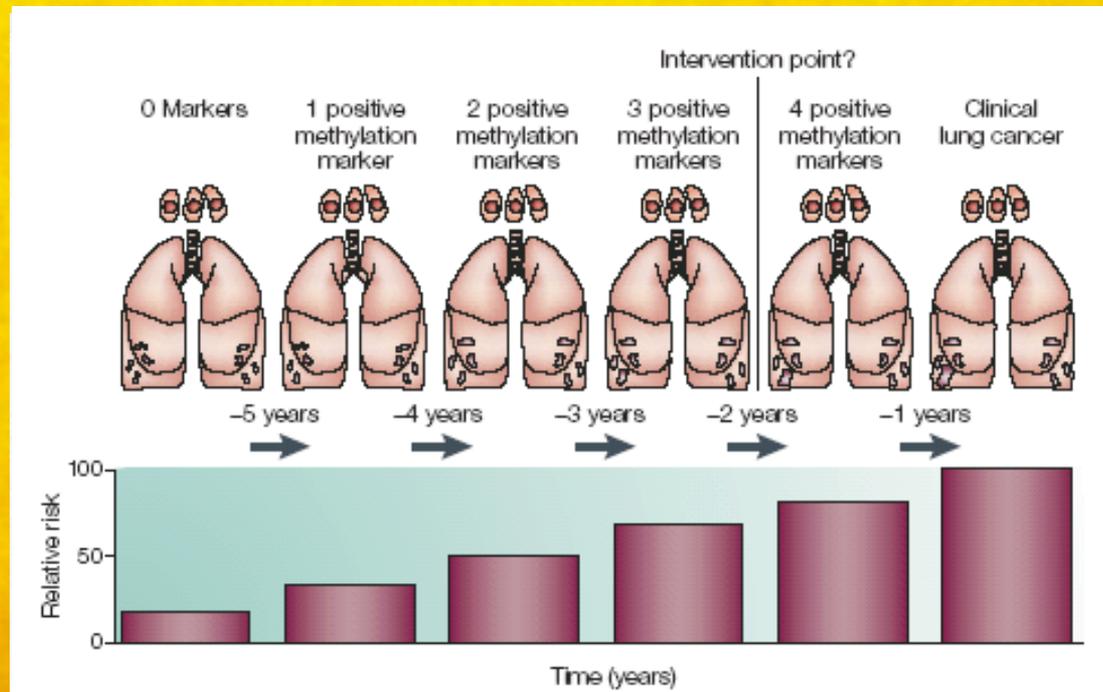
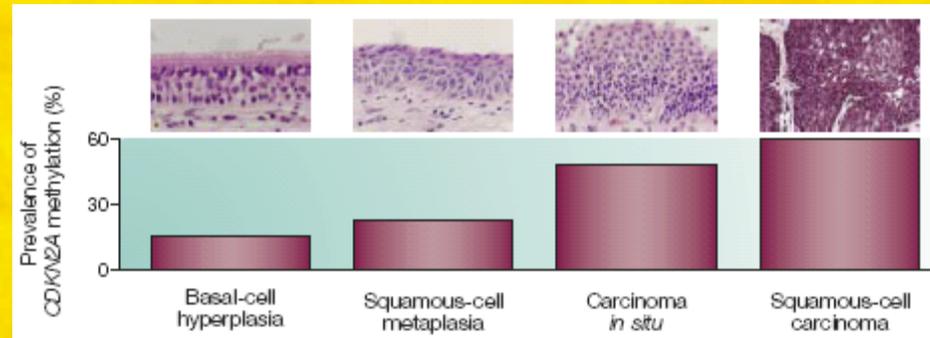
- **DIAGNÓSTICO:**

- Ventajas:

- Detección precoz, en muchos casos bastante anterior a la aparición de mutaciones somáticas
    - Posibilidad de hallar combinaciones específicas de marcadores para cada tumor
    - Accesibilidad a través de casi cualquier tipo de muestra:
      - Biopsia
      - Punción
      - Esputo
      - Jugo pancreático
      - Heces
      - Suero (DNA libre)



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER



• Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):707-17.

# EPIGENÉTICA Y CÁNCER

- **Marcador pronóstico:**
  - Ej: hipermetilación de p16 y DAPK como factor de agresividad en tumores pulmonares y colorrectales
- **Predictor de respuesta a tratamiento:**
  - Ej: hipermetilación de MGMT como factor de buen pronóstico en terapias alquilantes
- **Diana de tratamiento:**
  - Agentes demetilantes (Decitabine)
    - Aprobado para sd. mielodisplásico y leucemia mieloide aguda
    - Riesgo de alteración global



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

- Cáncer de pulmón:
  - 30% del total de muertes por cáncer
  - 86% debido a tumor irresecable
  - Supervivencia a 5 años 4-6 veces inferior respecto a mama, colon o próstata
  - Tumores inferiores a 1cm: tasa de recurrencia inferior a 50%
  - Introducción de TAC espiral: 3-9 veces más eficaz que rayos-X y/o citología esputo. Problema de falsos positivos (nódulos benignos)
  - **NECESIDAD DE NUEVAS HERRAMIENTAS**



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

- Marcadores epigenéticos: revisión bibliográfica:

21 muestras de pacientes ingresados por posible cáncer de pulmón y 123 libres de cáncer

“Puede ser detectada una metilación aberrante en los promotores de los genes p16 y MGMT en el DNA de esputo del 100% de pacientes con cáncer de pulmón tipo escamoso hasta 3 años antes del diagnóstico clínico”

(25% en caso de individuos libres de enfermedad pero de alto riesgo, lo que coincide con el riesgo preestablecido)

*Palmisano WA et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5954-8.*

75 parejas de NSCLCs con sus correspondientes tejidos pulmonares no neoplásicos:

“La combinación de la metilación de p16, RASSF1A y RUNX3 era la más específica de cáncer y puede ser utilizada como marcador de NSCLCs”

*Yanagawa N et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. Cancer Sci. 2003 Jul; 94(7):589-92.*



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

247 pacientes con sospecha de cáncer de pulmón investigados retrospectivamente

“Un panel con APC, p16 y RASSF1A apareció como la mejor combinación. Detectó metilación aberrante en el 63% de aspirados bronquiales. Sólo uno de 102 pacientes mostró un resultado falso positivo”

*Schmiemann V et al. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. Clin Cancer Res. 2005 Nov 1;11(21): 7728-34.*

“Un test con más del 90% de sensibilidad y un 40% de especificidad incrementaría el número de neoplasias pulmonares diagnosticadas en estadios tempranos de un 15 a un 50%”

*Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2004 Sep;4(9):707-17.*

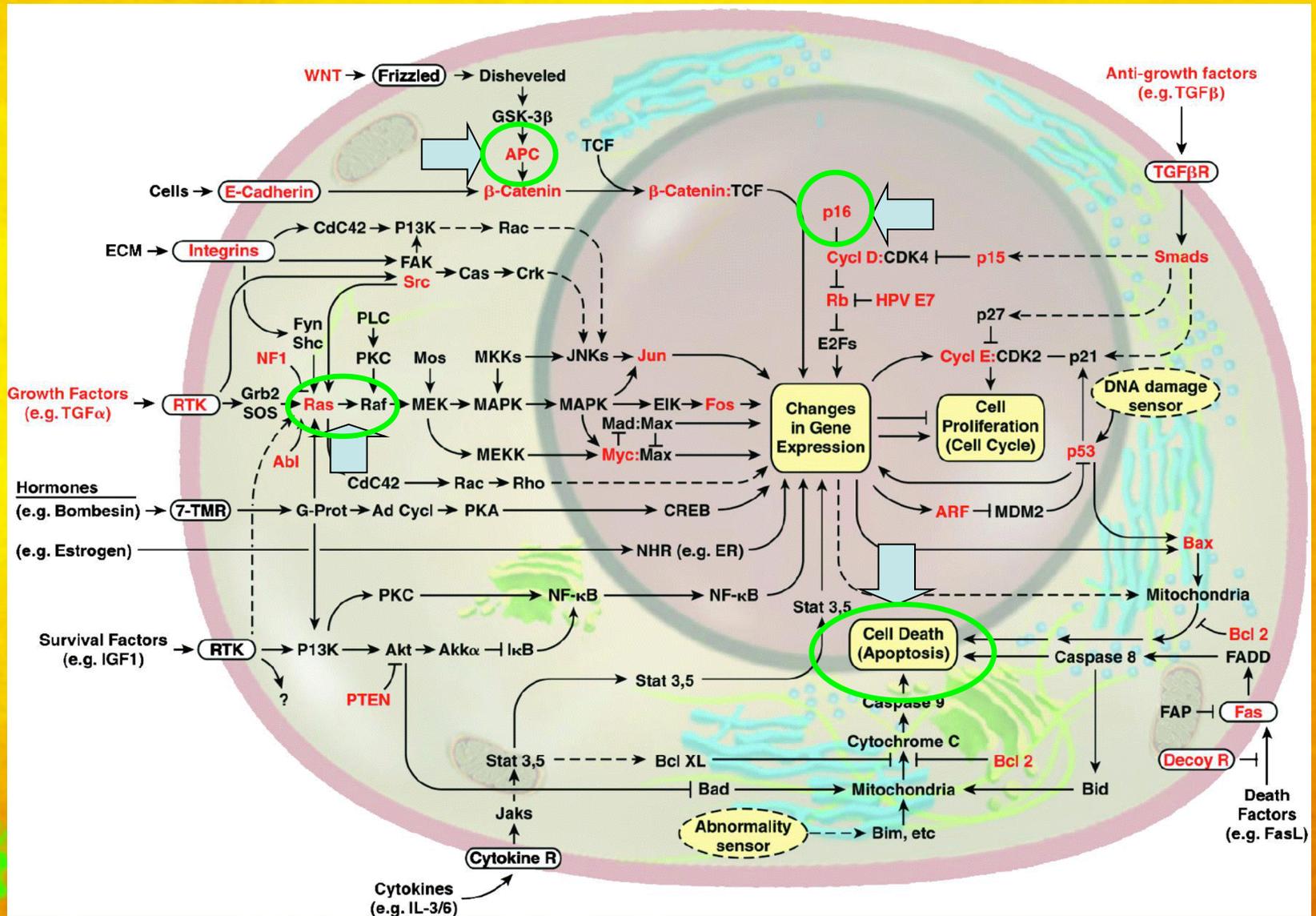


# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

- **Proyecto:**
  - 30 muestras apareadas de biopsias pulmonares y broncoaspirados en pacientes con sospecha de cáncer de pulmón
  - Analizar mediante MSP y Light-Cycler la metilación de los genes:
    - P16
    - APC
    - DAPK
    - RASSF1A
  - Comparar los resultados con mutaciones en k-ras, p53 y valores de marcadores tumorales



# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

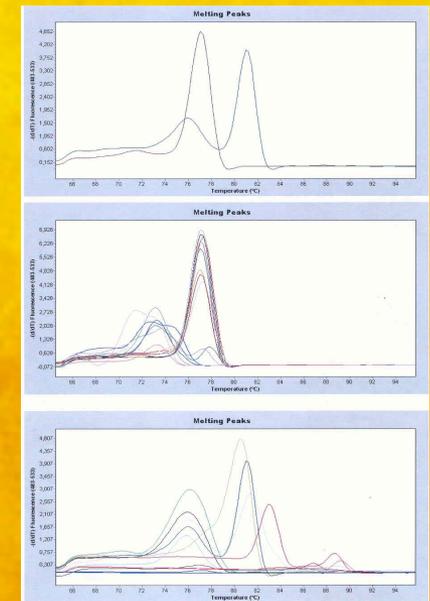
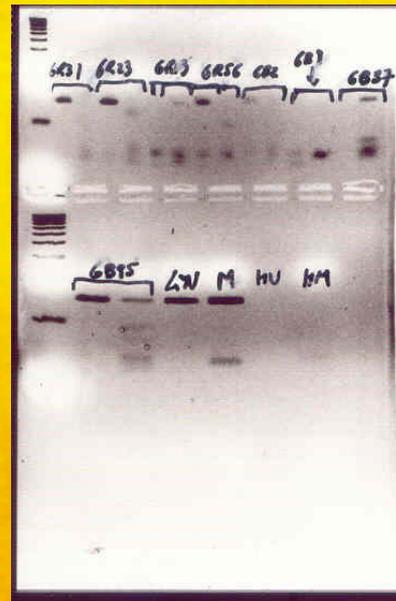


# EPIGENÉTICA Y CÁNCER: PROYECTO EN CÁNCER DE PULMÓN

- Primeros resultados:
  - 9 resultados confirmados para p16 por MSP:
    - 7 positivos
      - 6 cánceres de pulmón (estadios avanzados)
      - 1 neumonía
    - 2 negativos:
      - 1 sarcoidosis
      - 1 Linfoma Hodgkin
  - 10 resultados confirmados para DAPK con Light Cycler en muestras de cáncer de pulmón:
    - 4 positivos
    - 6 negativos

(Revisión bibliográfica: 19-44% de positivos.

*Toyooka S Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. Clin Cancer Res. 2003 Aug 1;9(8):3034-41.)*



# CONCLUSIONES

- La epigenética se presenta como un arma potencialmente muy útil para diagnóstico, seguimiento y tratamiento de múltiples patologías: cáncer, aterosclerosis, Alzheimer...
- Se precisa aún de numerosos estudios para:
  - Optimizar sus posibles aplicaciones
  - Garantizar su reproducibilidad
  - Aumentar la especificidad
- Planteamiento de la necesidad de un “proyecto epigenoma”



# GRACIAS

