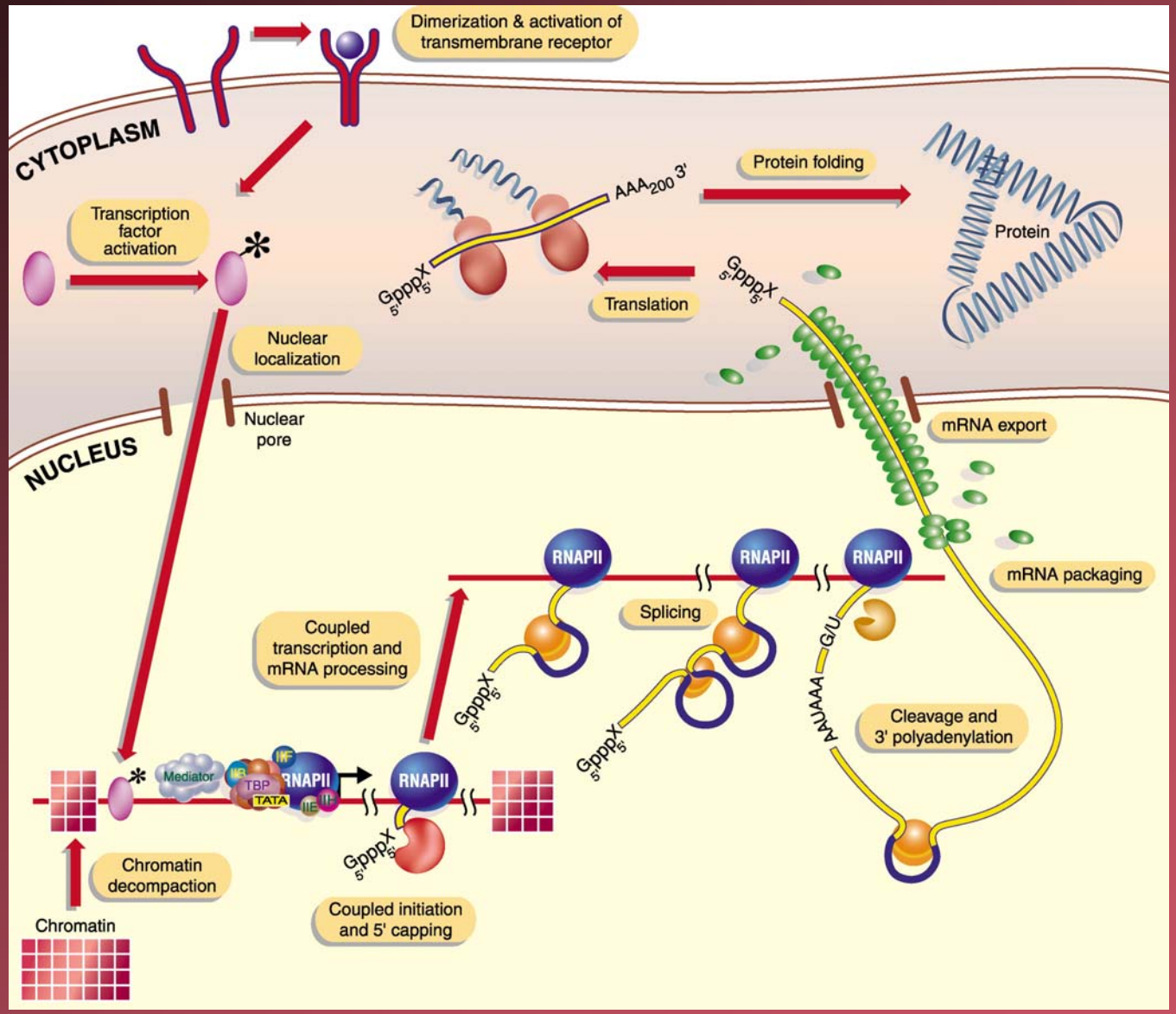
Epigenética

Epigenética

Cambios **reversibles y heredables** en la regulación génica que ocurren sin un cambio en la secuencia del ADN.

Mecanismos de regulación de la expresión génica



Metilación del ADN

RNA i ← Epigenética

Modificación de histonas

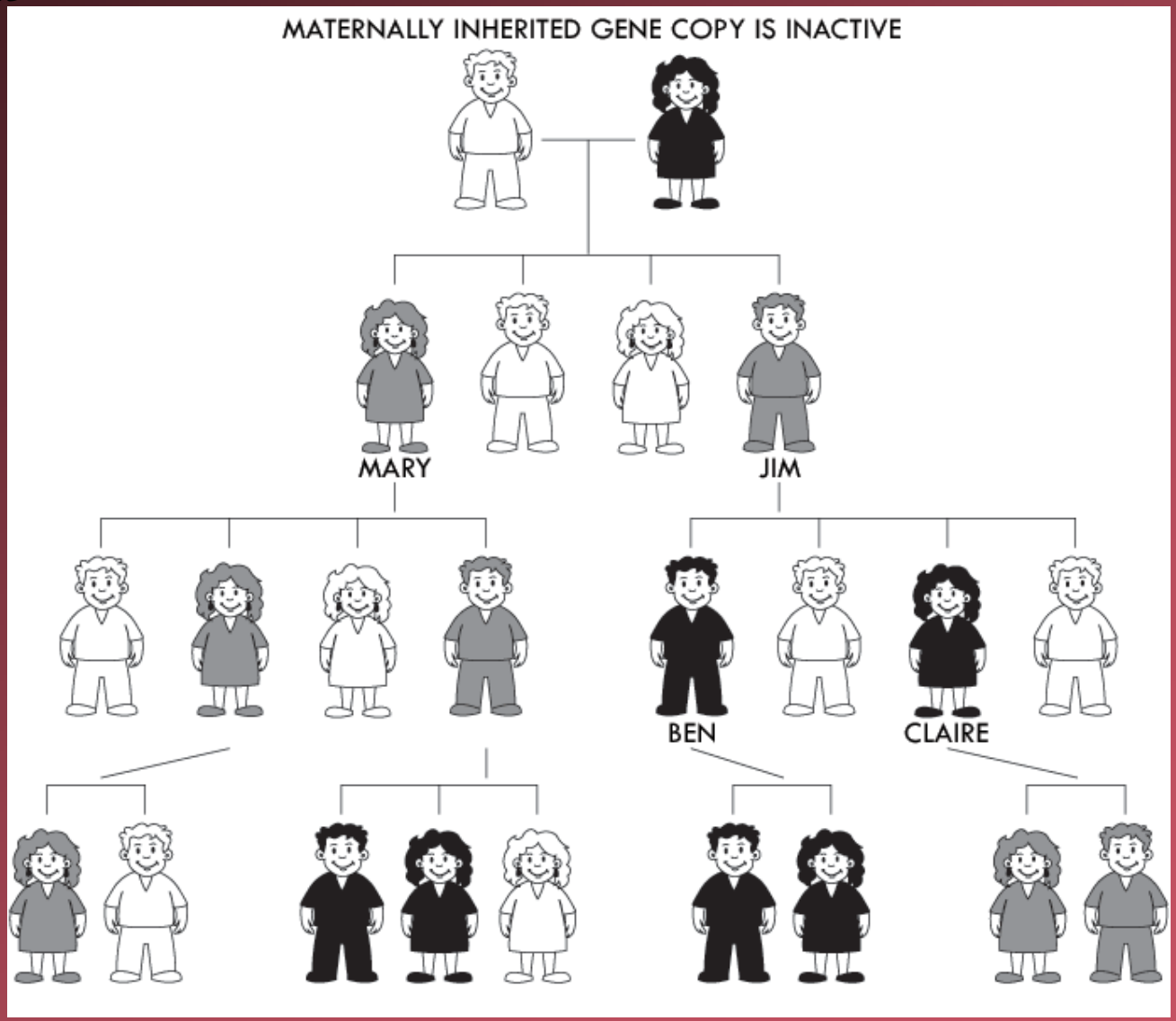
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica…

Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la **impronta génica...**

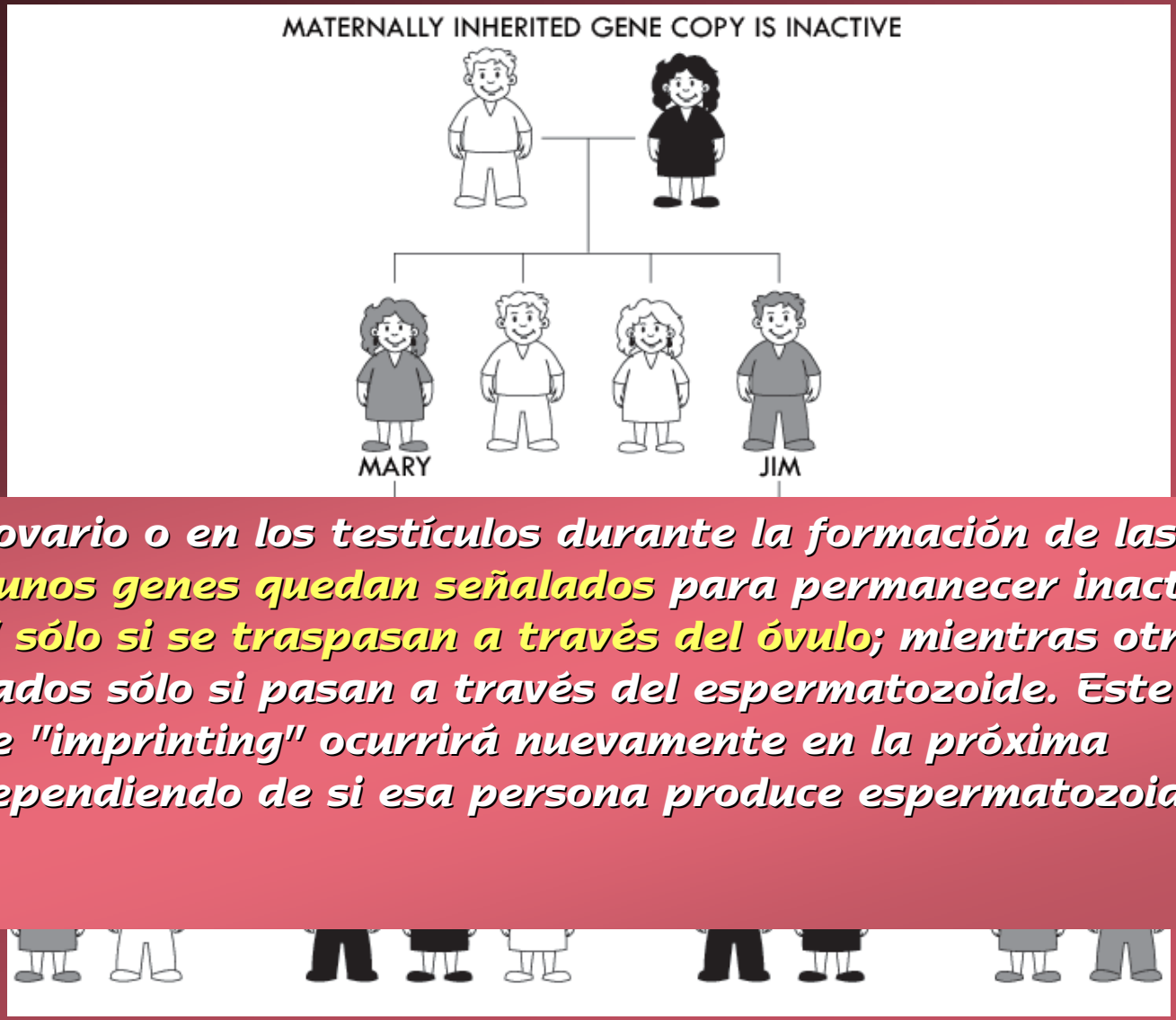
El "Genomic imprinting" es una modificación epigenética cromosomal que lleva a la expresión diferencial de un alelo parental de acuerdo al origen parental

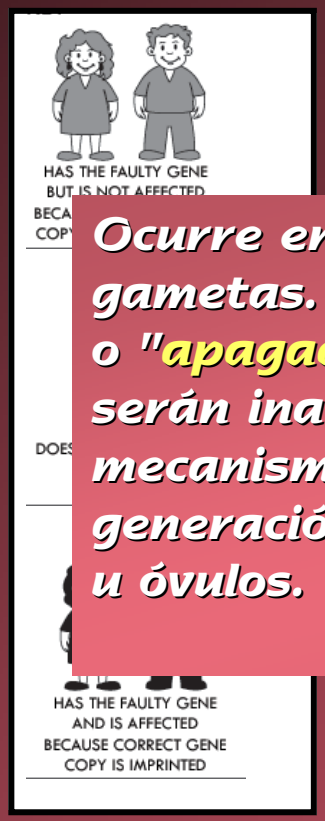
Ocurre en el ovario o en los testículos durante la formación de las gametas. **Algunos genes quedan señalados** para permanecer inactivos o "**apagados" sólo si se traspasan a través del óvulo**; mientras otros serán inactivados sólo si pasan a través del espermatozoide. Este mecanismo de "imprinting" ocurrirá nuevamente en la próxima generación dependiendo de si esa persona produce espermatozoides u óvulos.

Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica



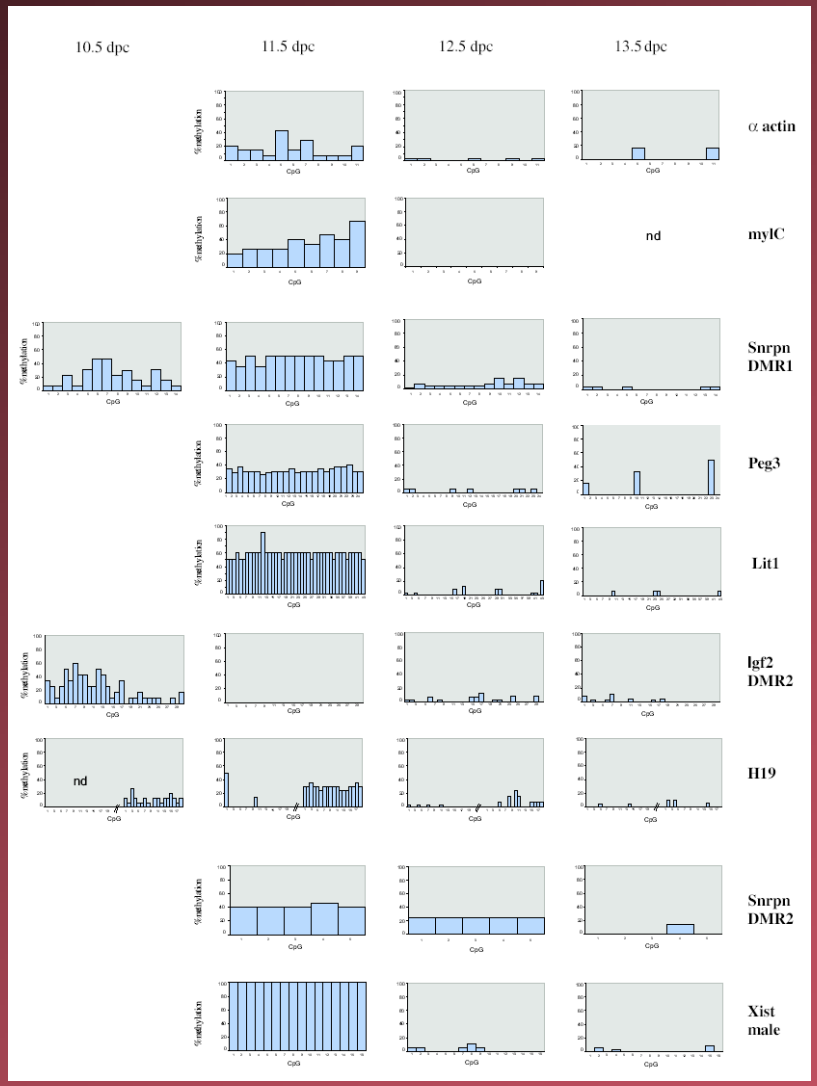
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica



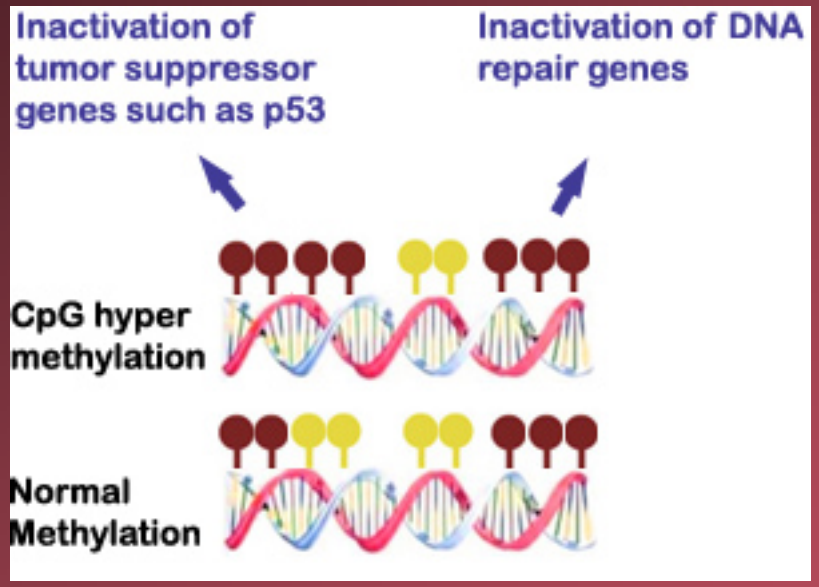


Ocurre en el ovario o en los testículos durante la formación de las gametas. Algunos genes quedan señalados para permanecer inactivos o "apagados" sólo si se traspasan a través del óvulo; mientras otros serán inactivados sólo si pasan a través del espermatozoide. Este mecanismo de "imprinting" ocurrirá nuevamente en la próxima generación dependiendo de si esa persona produce espermatozoides u óvulos.

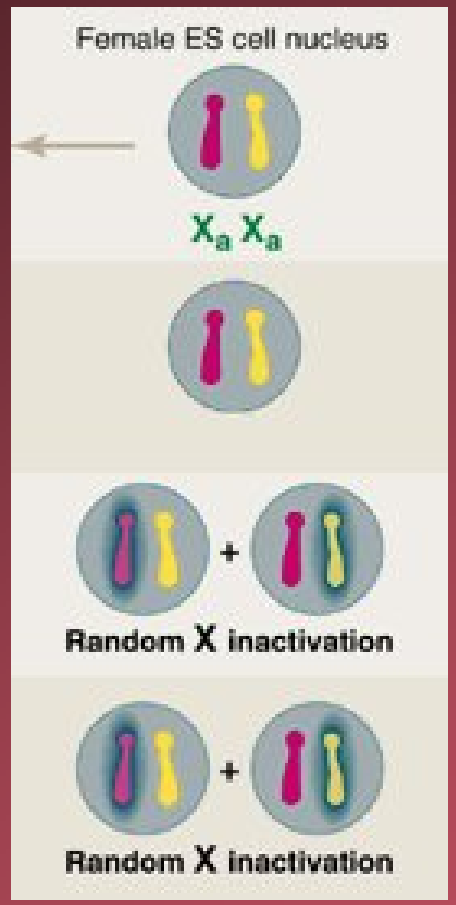
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación



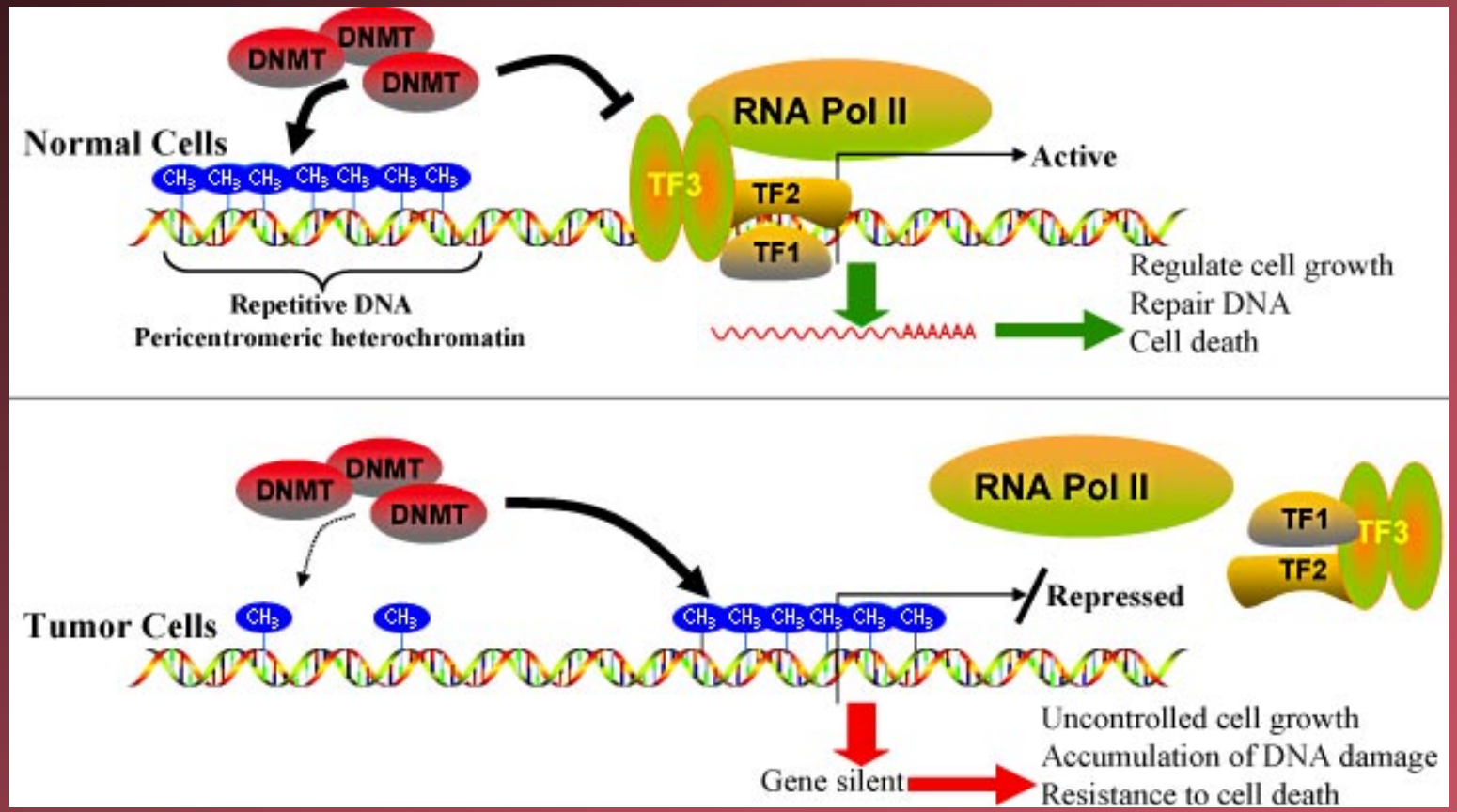
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación,el silenciamiento génico,



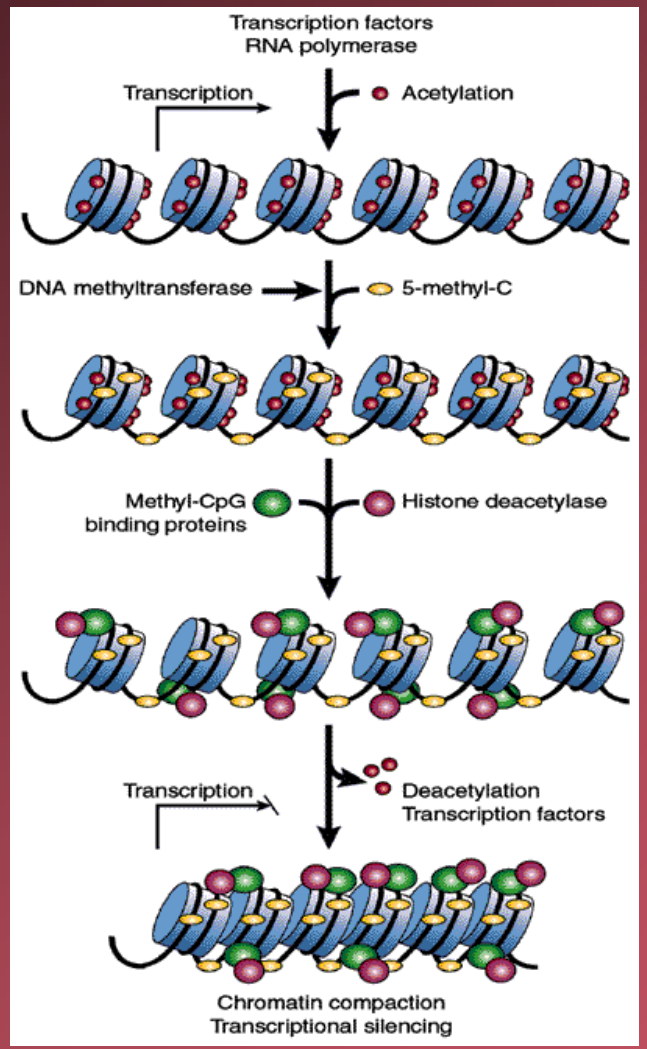
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación,el silenciamiento génico, la inactivación del cromosoma X



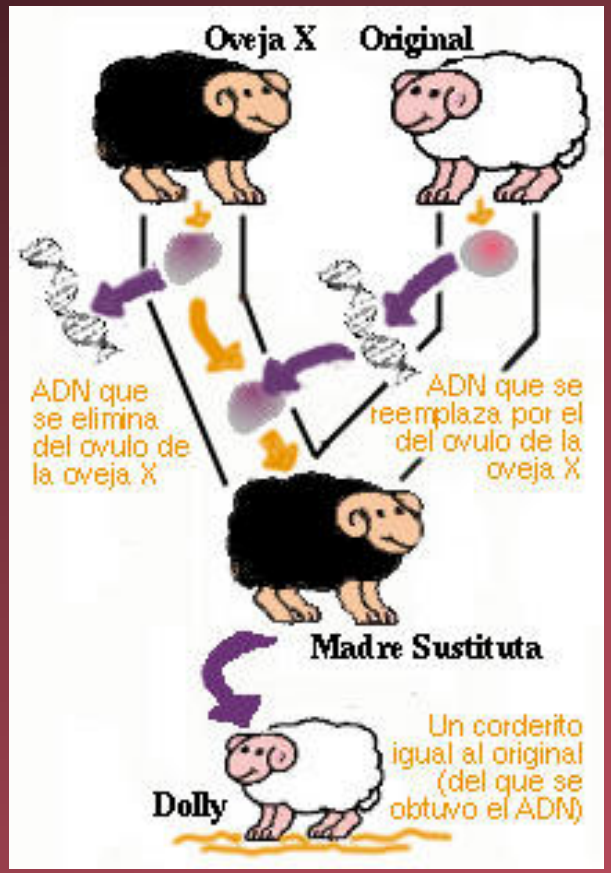
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación,el silenciamiento génico, la inactivación del cromosoma X y la carcinogénesis



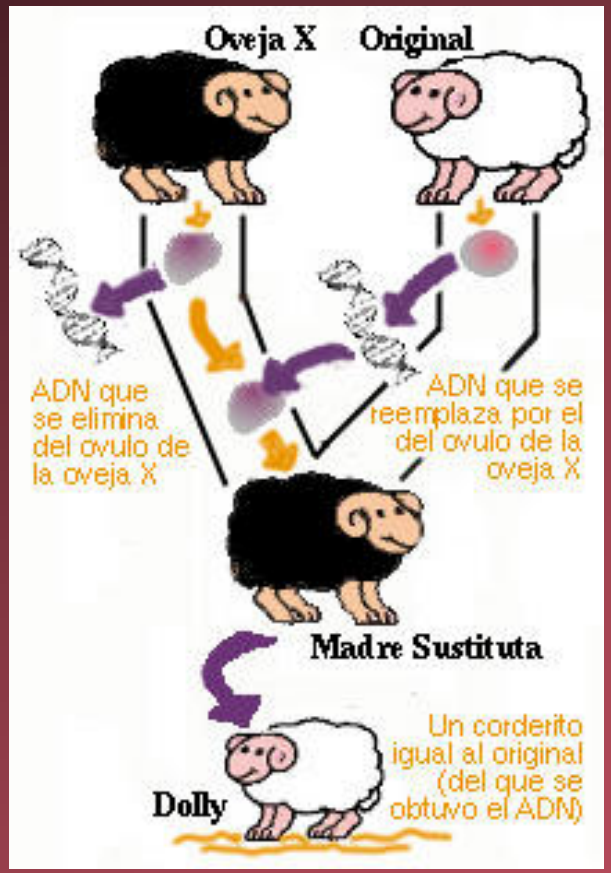
Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación,el silenciamiento génico, la inactivación del cromosoma X, la carcinogénesis, la regulación de las modificaciones de las histonas y de la heterocromatina



Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la impronta génica, la reprogramación,el silenciamiento génico, la inactivación del cromosoma X, la carcinogénesis, la regulación de las modificaciones de las histonas y de la heterocromatina y algunas limitaciones técnicas como la clonación.



Algunos de los procesos epigenéticos específicos incluyen la **impronta génica,** la **reprogramación**,el **silenciamiento génico,** la **inactivación del cromosoma X,** la **carcinogénesis,** la regulación de las **modificaciones** de las **histonas** y de la **heterocromatina** y algunas limitaciones técnicas como la **clonación.**



Artritis

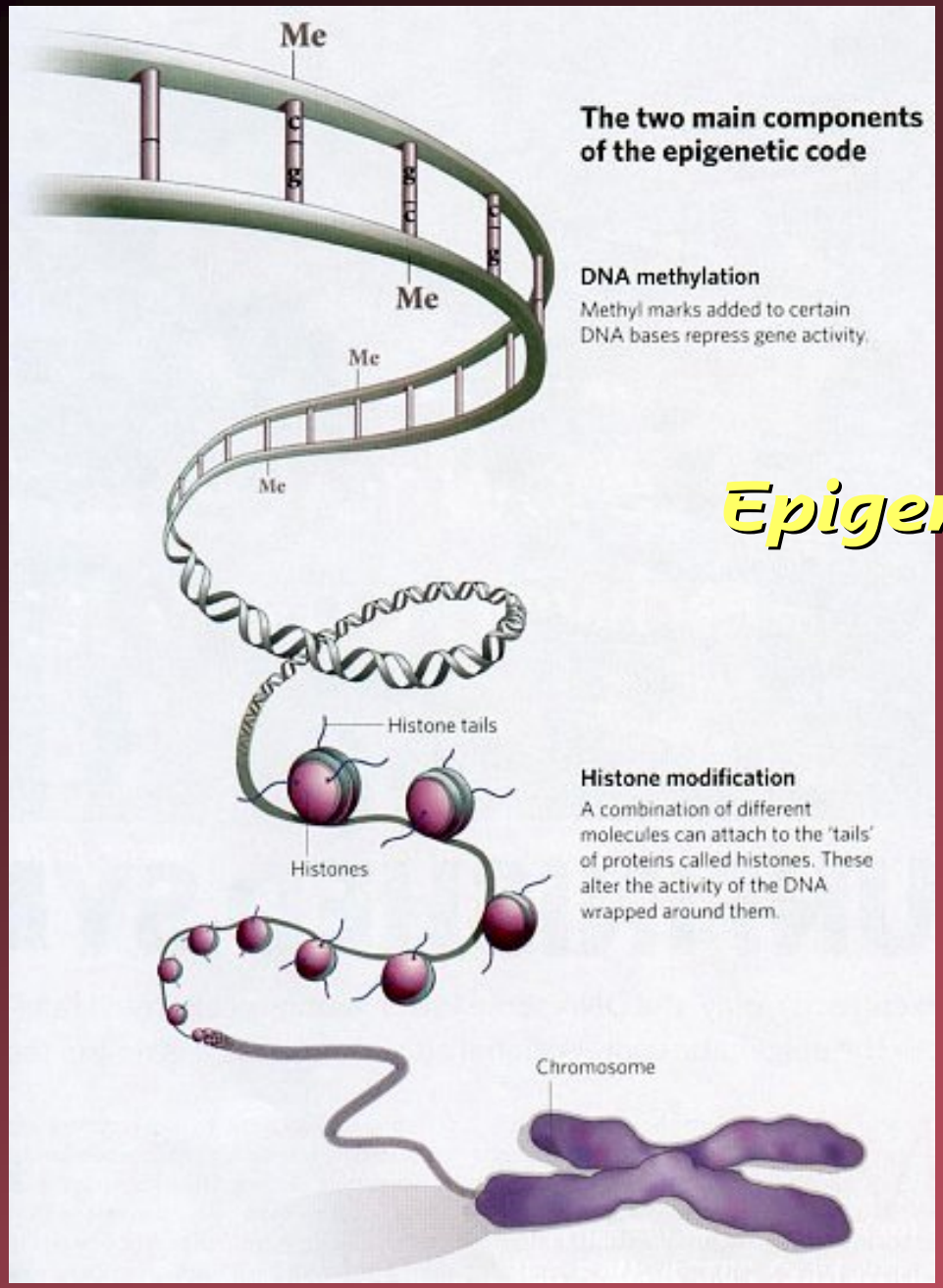
Tumores

Envejecimiento prematuro

Metilación del ADN

RNA i ← Epigenética

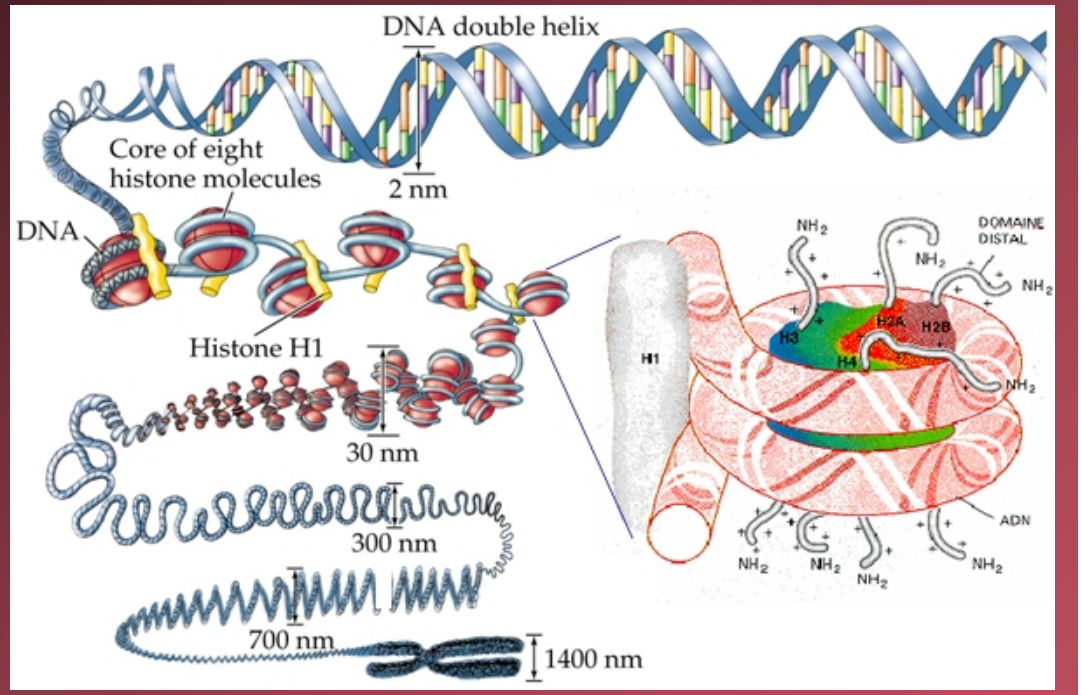
Modificación de histonas

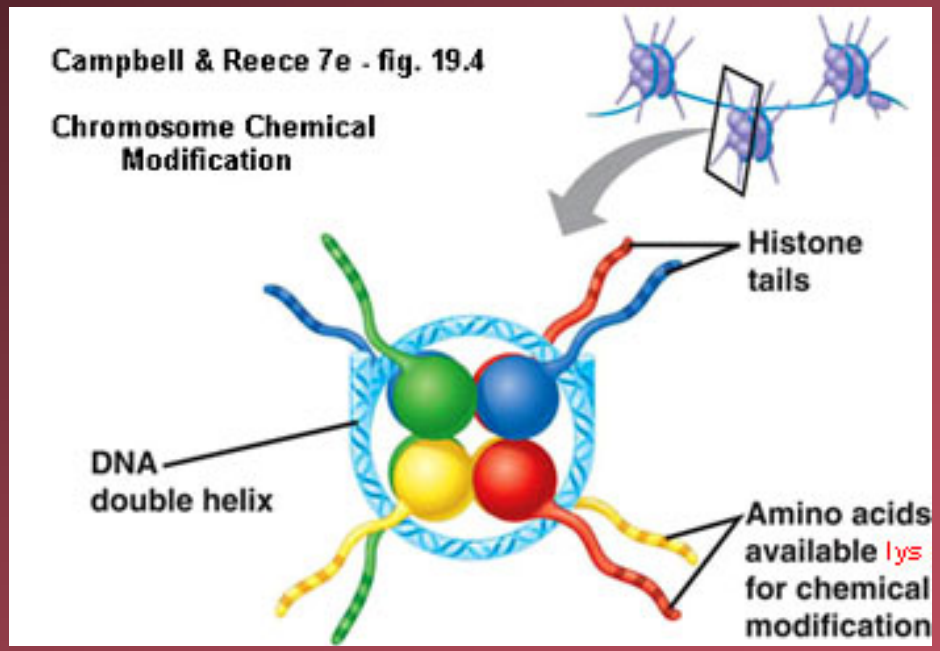


Epigenética

Metilación del ADN

Modificación de histonas





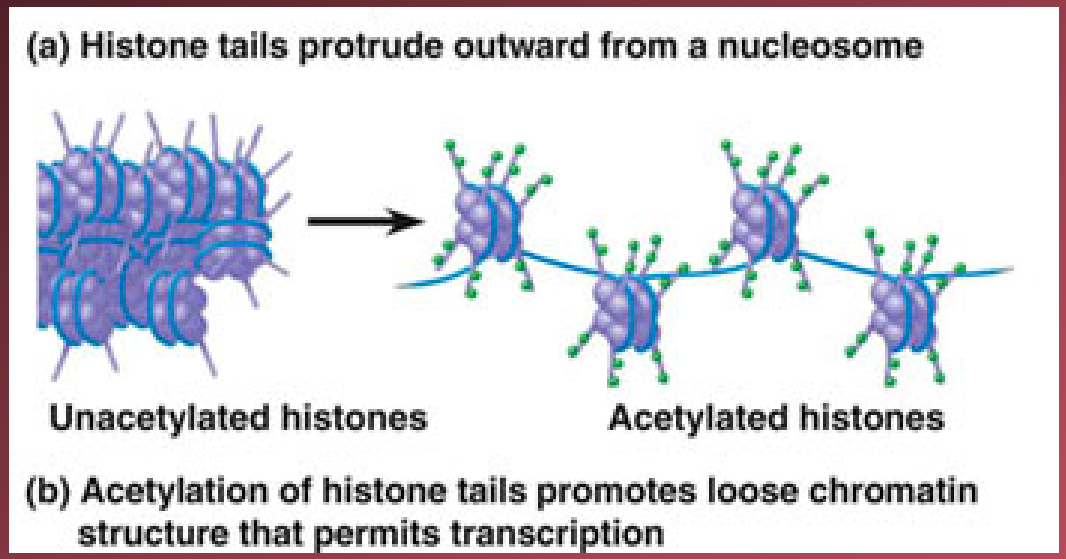
Modificación de histonas

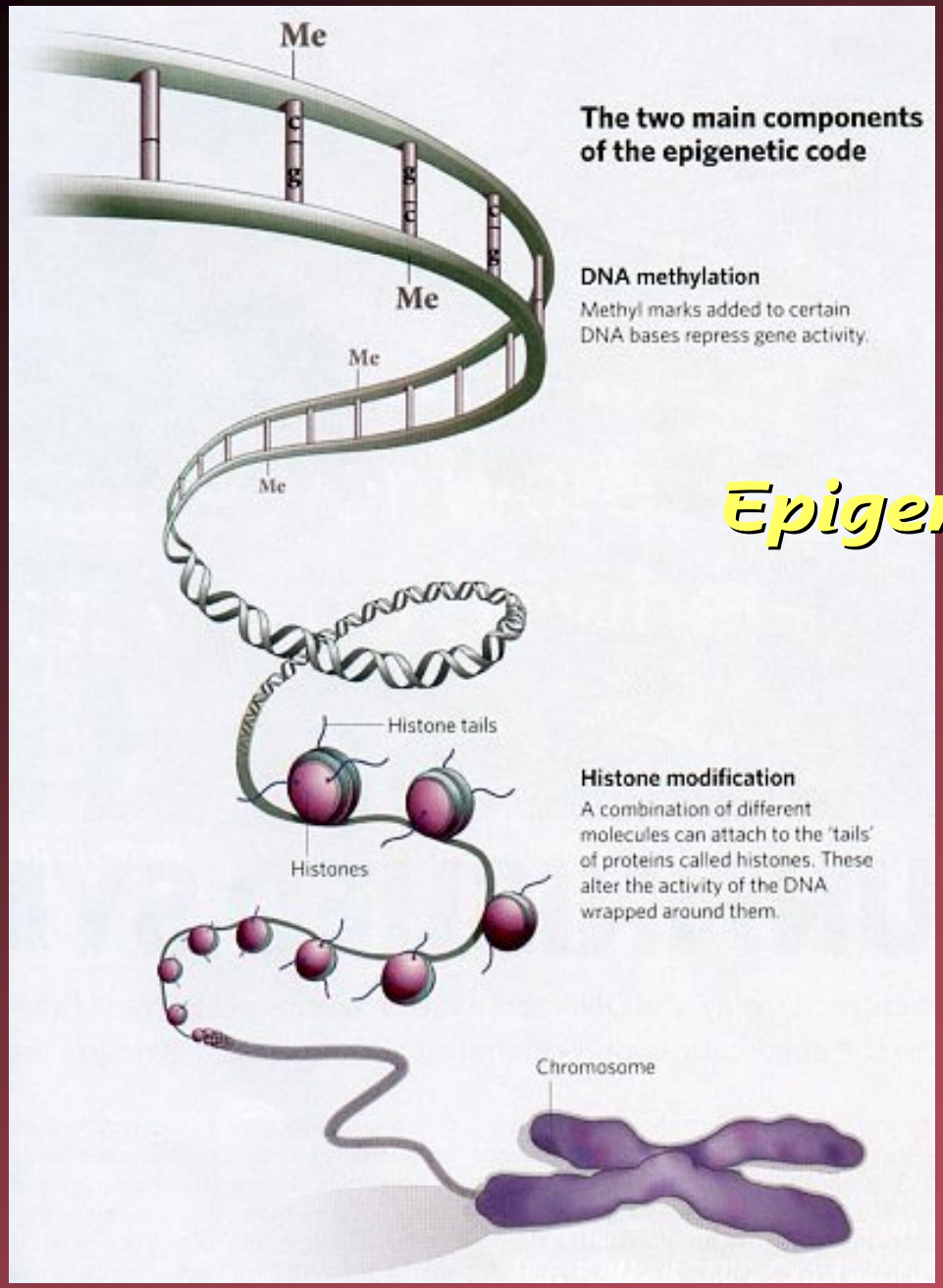
metiladas

acetiladas

La cromatina transcripcionalmente activa tiene a estar hiperacetilada

Las histonas desacetilasas son las encargadas de iniciar el silenciamiento génico

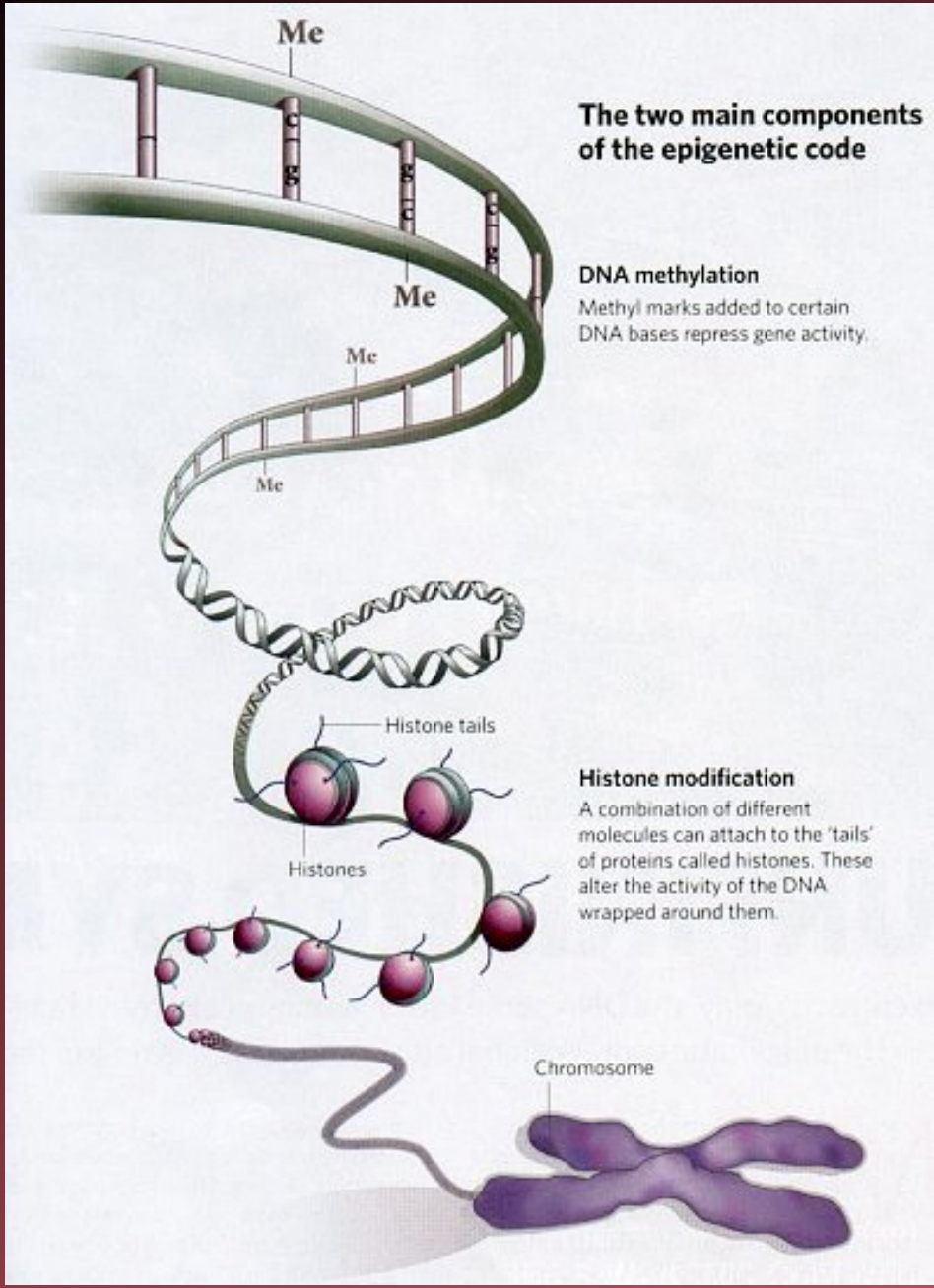




Epigenética

Metilación del ADN

Modificación de histonas



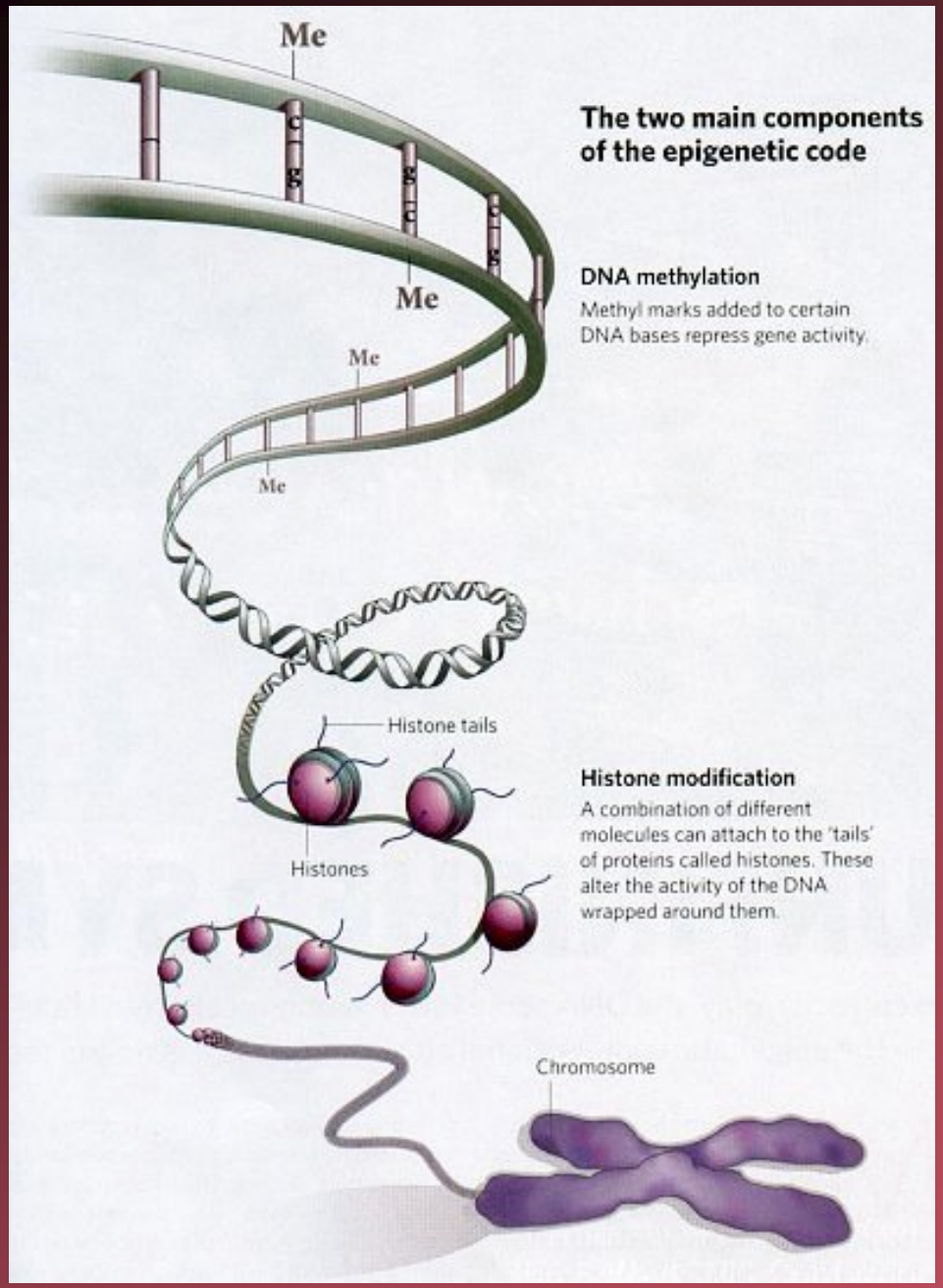
Metilación del ADN

¿Dónde se metila el ADN?

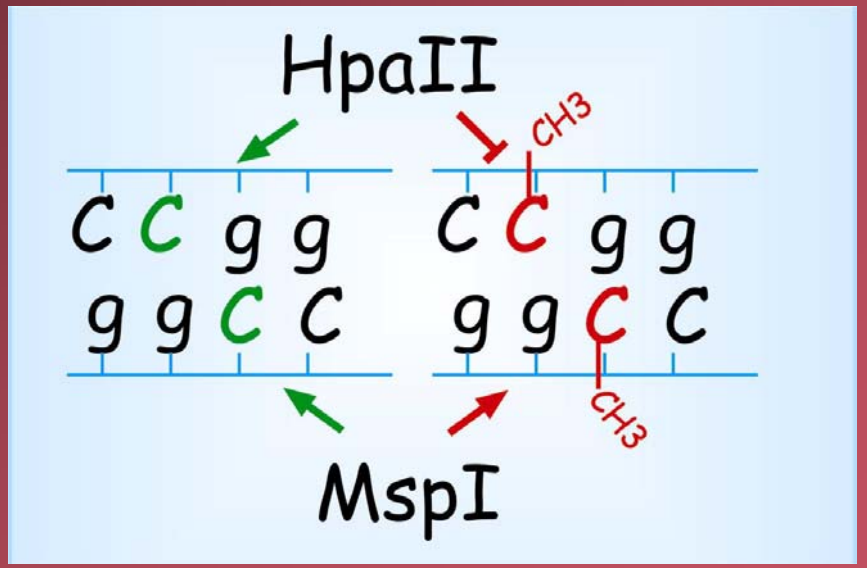
5-^{m}C fue detectada por primera vez en el año 1948.

5-^{m}C representa el 2% - 5% de las citosinas en el ADN de mamíferos

En **1975** se propuso por primera vez un posible rol en la regulación de la expresión génica (Holliday & Pugh, Science 1975,187:222-232)



Metilación del ADN



En 1975 se propuso por primera vez un posible rol en la regulación de la expresión génica (Holliday & Pugh, Science 1975,187:222-232)

Metilación del ADN

$5^{m}C$, la 5º base

dinucleótidos CpG

Metilación del ADN

5^mC, la 5º base

dinucleótidos CpG

Islas CpG

0.5 - 5 kb

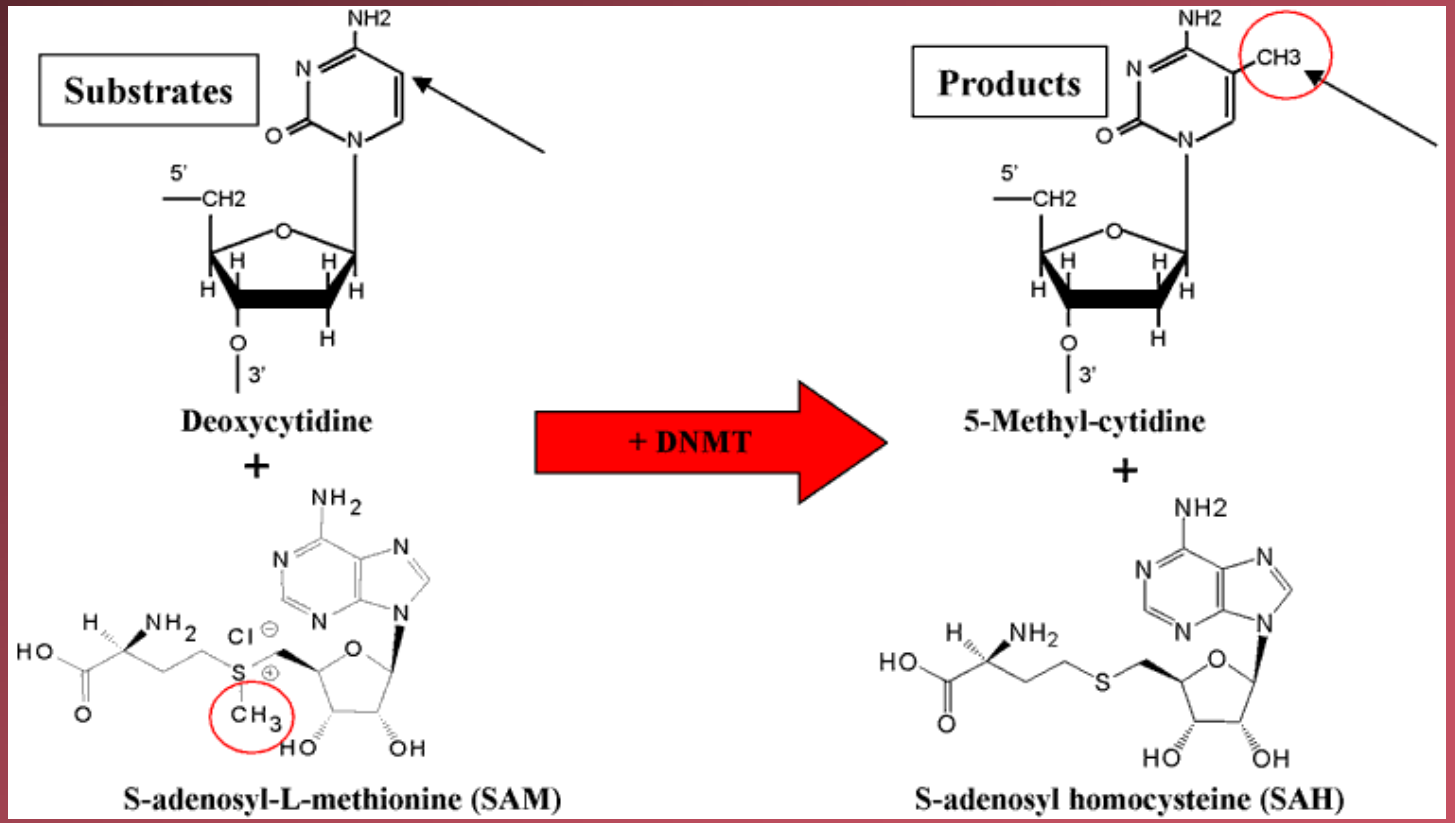
50% de los genes

en genes housekeeping y específicos de tejido

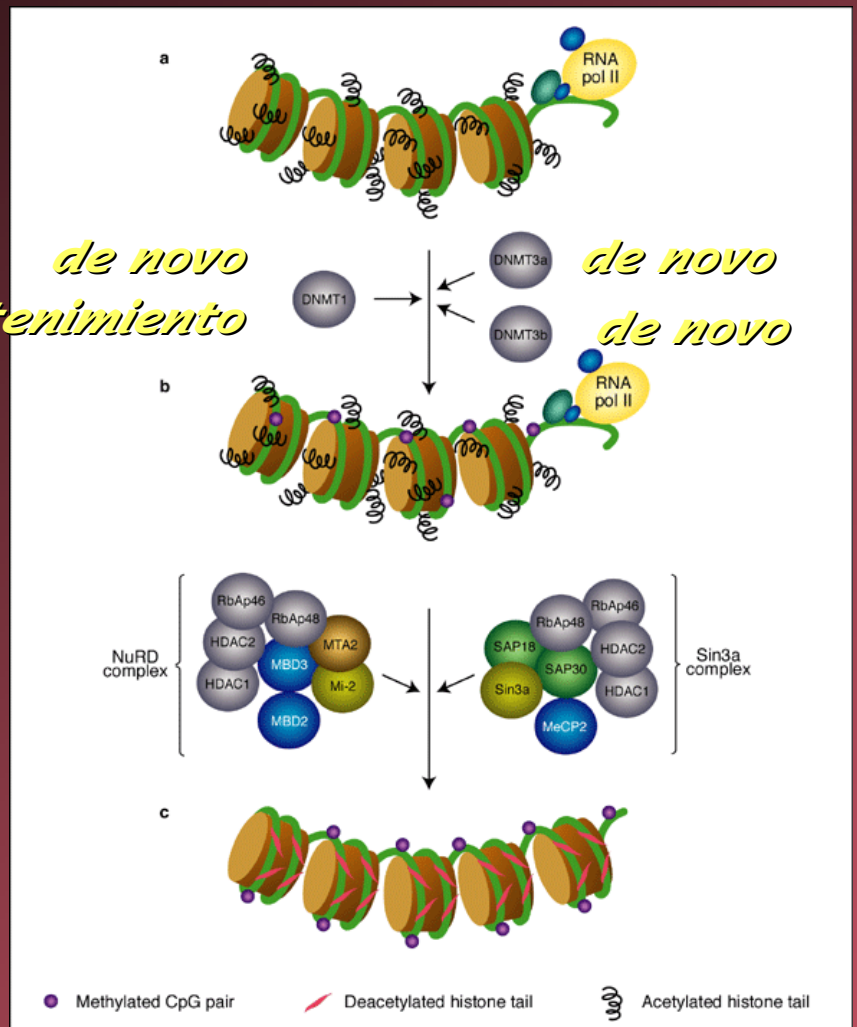
Metilación del ADN

5^mC, la 5º base

¿Cómo se metila el ADN?



Enzimas metil transferasas de ADN



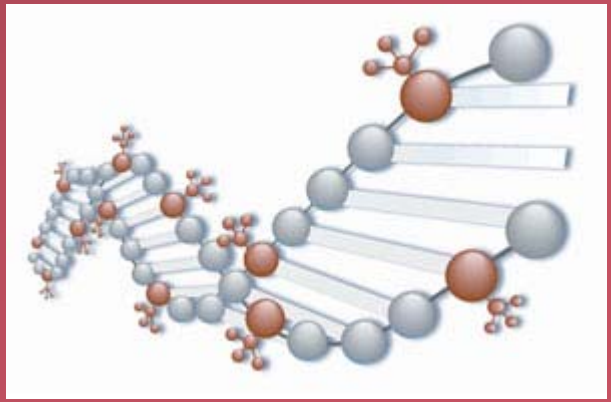
Proposed mechanism by which DNA methylation leads to transcriptional repression

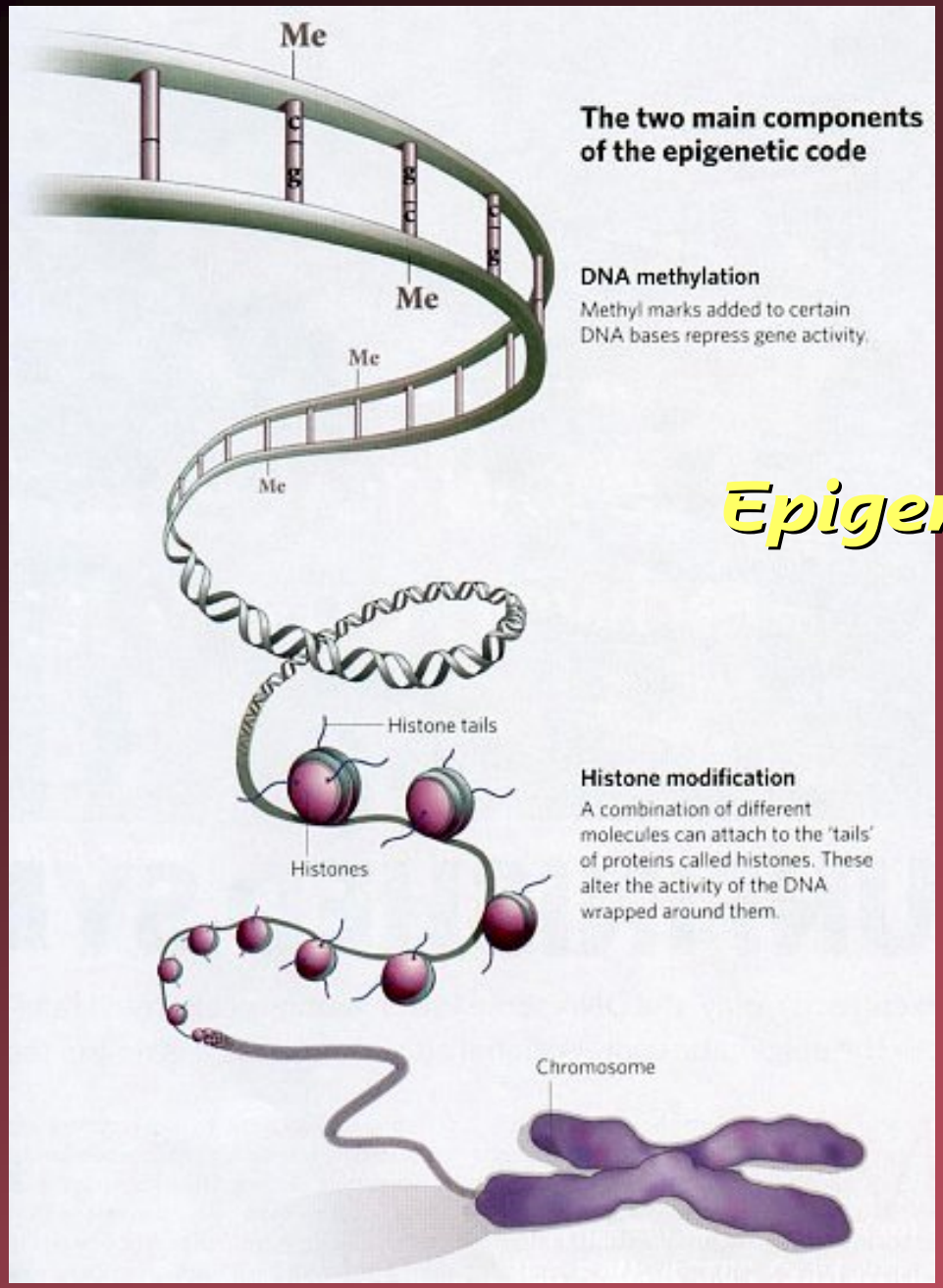
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2002 Cambridge University Press

Metilación = represión génica

1) Interferencia directa con la unión de factores de transcripción específicos (secuencia de reconocimiento tiene CpG)

2) Unión específica con represores transcripcionales. Se han detectado proteínas capaces de "leer" la secuencia de ADN metilada (MeCPs, MBDs)

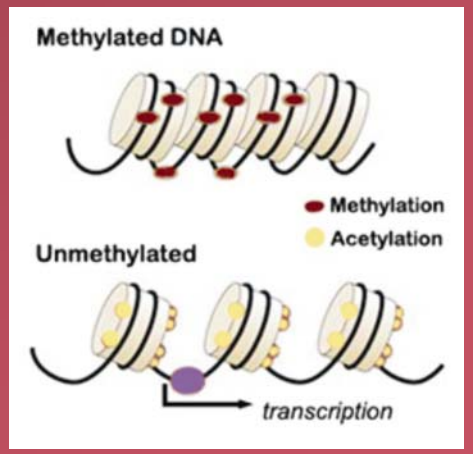




Epigenética

Metilación del ADN

Modificación de histonas



Patologías epigenéticas: Cáncer

Represión de genes supresores de tumores

Expresión de proto-oncogenes

Patologías epigenéticas: Cáncer

Represión de genes supresores de tumores

Hipermetilación de zonas promotoras en el ADN

- ✓genes de regulación del ciclo celular
- ✓genes asociados a la reparación del ADN
- ✓genes de apoptosis
- ✓genes de angiogénesis
- ✓genes de metástasis

Cáncer de próstata

GSTP1 hipermetilado (completamente desmetilado en leucemia mieloide)

Leucemia

la proteína de fusión RAR es capaz de reclutar ADN metil tranferasas e inducir hipermetilación, mientras que el ácido retinoico promueve la desmetilación revirtiendo el fenotipo transformado.

Cáncer de mama

hipermetilados: receptor de estrógeno y progestorona. También BCRA1, cuya disminución de expresión está altamente asociada a este tipo de cáncer.

Cáncer de pulmón

más de 40 genes poseen el patrón de metilación alterado

Patologías epigenéticas: Cáncer

Represión de genes supresores de tumores

Expresión de proto-oncogenes

Hipometilación de promotores de genes

Hipometilación de promotores de genes

Table 4
Examples of hypomethylated genes and their associated diseases: studies from the last 6 years

Gene	Disease	Assay method	Comments
Cytochrome P450 1B1	Prostate cancer	Methylation-specific PCR, Bisulfite-DNA sequencing, RT-PCR and immunostaining	Demethylation of promoter/enhancer region correlates to overexpression of gene; significant increases in demethylation and gene expression noted in cancer compared to surrounding muscle tissue and benign prostate tissues; no correlation of methylation levels with pathologic category
Maspin	Colorectal carcinoma	Methylation-specific PCR, microsatellite PCR, methylation-specific digest, RT-PCR, Western blot, immunostaining	Nuclear maspin expression increases with degree of dedifferentiation of cancer (high levels in microsatellite unstable tumors compared to matched benign colonic mucosa and microsatellite stable tumors ; gene promoter hypomethylation observed in all maspin expressing samples; expression frequently found at invasion front of tumor
	Thyroid cancer	Methylation-specific PCR, RT-PCR, immunostaining	Gene hypomethylation correlated well with gene expression; demethylation evident mostly in undifferentiated and poorly differentiated specimens compared to well-differentiated tumors and matched normal
Maspin, S100P Claudin-4; lipocalin 2; S100A4; PSA; 14-3-3sigma; trefoil factor 2; mesothelin;	Primary pancreatic carcinoma	Expression microarrays, methylation-specific PCR	Promoter hypomethylation of maspin and S100P correlate with overexpression in most primary pancreatic cancers; 32 genes show overexpression in cancer, 19 of 32 were methylated in normal tissues, 7 of 19 were hypomethylated in cancer tissues (this pattern prevalent in most carcinomas examined), 1 gene overexpressed was methylated
Protease uPA	Breast cancer (cell lines)	Methylation-sensitive digest, MS-PCR, DNA methyltransferase activity assay DNA demethylase activity assay	Hypomethylation observed in late-stage invasive cell lines whilst MCF-7 cells were highly methylated at gene; methylation levels corresponded to maintenance DNA methyltransferase activity and inversely to demethylase activity
P-Cadherin	Invasive breast cancer	Methylation-specific PCR, RT-PCR, Western Blot	Demethylation of the CDH3 promoter linked to increased p-cadherin expression, overexpression of p-cadherin has shown a strong association with histological grade, p53 oncogene expression, lack of estrogen receptor and increased cell proliferation.
Synuclein γ (SNCG)	Breast and ovarian cancer (cell lines); tumors of liver, prostate, esophagus, gastric, colon, cervical, lung and breast	Bisulphite sequencing, nested methylation-specific PCR	Correlation of exon 1 hypomethylation with expression, methylation primarily occurred in exon 1 at CpG positions 2, 5, 7, 10–15 in normal breast, no such pattern observed in ovarian cells; Gene demethylation was noted in all tumor tissues and correlated significantly with gene expression, 10–30% of normal tissues also showed some demethylation but were mostly methylated; protein expression was stage-specific (low in stage I and very high in stages II–IV) and strongly associated with distant metastasis in patients

Hipometilación de promotores de genes

Gene	Disease	Assay method	Comments
TRAG-3	Colon, liver, lung, ovarian, pancreatic tumors (cell lines)	Bisulphite sequencing, RT-PCR	Methylation of exon 2 and promoter of TRAG-3 inversely correlates to expression; tumors overexpressed gene compared to normal cells
BRCA1, BRCA2	Sporadic ovarian cancer	Bisulphite-PCR, RE-digest, bisulphite sequencing	Low BRCA1 expression in tumors but high BRCA2 expression levels in tumor compared to normal; promoter hypomethylation correlated with expression levels and tumor stage
MEL1S	T-cell acute lymphoblastic leukemia	MS-PCR, RDA and bisulphite sequencing	Demethylation of chromosomal region contained MEL1, CACNA1H, and Nogo receptor genes, hypomethylation of MEL1S associated with increased expression in all T-ALL and a dysregulation of TGFb-mediated signaling, hypomethylation implicated in disease progression;
HOX II			In all samples of T-ALL, promoter demethylation corresponded to HOX-11 expression
p53	Lung cancer	Modified methyl acceptance assay, COBRA assay	Genome-wide hypomethylation unrelated to lung cancer risk, hypomethylation of p53 in exons 5–8 (hypermutable region) associated with 2 fold increased risk of lung cancer whilst no risk associated with hypomethylation at exon 2–4
MAGE 1; MAGE-A1; MAGE A3	Testicular cancer (cell lines);	Methylation-specific-PCR, bisulphite sequencing, RT-PCR and southern blot	Promoter hypomethylation in cell lines due to transient \demethylation followed by local inhibition of remethylation by the presence of transcription factors and increased promoter activity;
	Hepatocellular cancer		Promoter hypomethylation correlated to gene expression in HCC compared to tumor free tissues and blood
BAGE	Breast ovarian and myeloma cell lines, tumors of sperm, testis, somatic tissue,		94% of somatic tissue is DNA methylated while 98% of tumor is demethylated but BAGE transcripts evident in 47% of tumors. Testis and sperm show demethylation in at least one BAGE loci. Hypomethylation evident at Juxtacentromeric satellite DNA
Perforin	Active SLE	Methylation-inhibitors	Gene is demethylated and overexpressed in active Lupus

Metilación global del ADN genómico

Hipometilación global del ADN

Muestra un aumento progresivo con el grado de malignidad del tumor (cáncer de mama, cervical y cerebro)

Metilación global del ADN genómico

Hipometilación global del ADN

Muestra un aumento progresivo con el grado de malignidad del tumor (cáncer de mama, cervical y cerebro)

¿Por qué la hipometilación contribuye a la oncogénesis?

Activación de oncogenes (c-myc, ras)

Metilación global del ADN genómico

Hipometilación global del ADN

Muestra un aumento progresivo con el grado de malignidad del tumor (cáncer de mama, cervical y cerebro)

¿Por qué la hipometilación contribuye a la oncogénesis?

Activación de oncogenes (c-myc, ras)

Activación de retrotransposones latentes

Inestabilidad cromosómica

Metilación global del ADN

Disease	Tissue samples	Methylation level	Comments on methylation changes
Cancer (breast, lung and colorectal)	Adjacent normal (57)	5.50%	Individually 70% of cancers had reduced 5 meC, 18% no change and 12% increased 5 meC relative to adjacent normal tissue. Identified a MTHFR polymorphism associated with lowered 5 meC content in normal tissue and relatively smaller subsequent hypomethylation in cancer
	Carcinoma (57)	4.31%	
Colorectal cancer	Colorectal carcinoma and adenomas ($n=13$)		Antibody staining level was reduced by 17–29% in carcinoma relative to paired normal tissue and associated with change in chromatin condensation; Southwestern blot index increased with increasing Duke stage
	Normal colon/breast tissue ($n=49$)	6.31±1.97	Global methylation 30% lower in sporadic colorectal cancers and 43% or 42% lower in hereditary FAP or HNPCC tumours respectively.
	Sporadic colorectal cancer ($n=26$)	4.43±1.57	
	FAP tumors ($n=19$)	3.57±0.60	
	HNPCC tumors ($n=13$)	3.66±1.02	
	Normal colon mucosa ($n=20$)	6.5±4.9	Methyl acceptance capacity about 15% greater in cancer and polyps than in normal tissue colonic mucosa (colon mucosa about 6% lower than blood DNA)
	Paired normal mucosa ($n=25$)	5.2±3.8	
	Colorectal cancer ($n=24$)	22.2±4.4	
	Large adenoma ($n=32$)	21.5±3.4	
	Small adenoma ($n=21$)	22.8±3.8	
	Hyperplastic polyps ($n=20$)	20.3±3.6	
	Normal colonic mucosa		
	Healthy controls ($n=7$)	88.9±4.2%	
	Cancer patients with no LINE L1 hypomethylation ($n=14$)	82.0±7.7%	
	Cancer patients with LINE L1 hypomethylation 444($n=7$)	73.9±4.9%	
	Normal colonic mucosa ($n=76$)	26% increased methyl acceptance	Colonic and leukocyte hypomethylation and low folate status associated with colorectal neoplasia
	Adenoma ($n=35$)	30% increased methyl acceptance	
	Colorectal cancer ($n=28$)		
Gastric Cancer	Paired normal tissue ($n=9$)	0.82±0.07	8 of 9 tumors show hypomethylation relative to matched normal. Correlated with LINE and MAGE gene hypomethylation.
	Cancer tissue ($n=9$)	0.64±0.12	
Breast cancer	Normal colon/breast tissue ($n=49$)	6.31±1.97	Level of 5 meC is 56% lower in breast tumors; reduction methylation is less for BRCA1 (42%) and BRCA2 (30%) tumors
	Sporadic cancer ($n=13$)	2.72±0.63	

Metilación global del ADN genómico

Hipometilación global del ADN

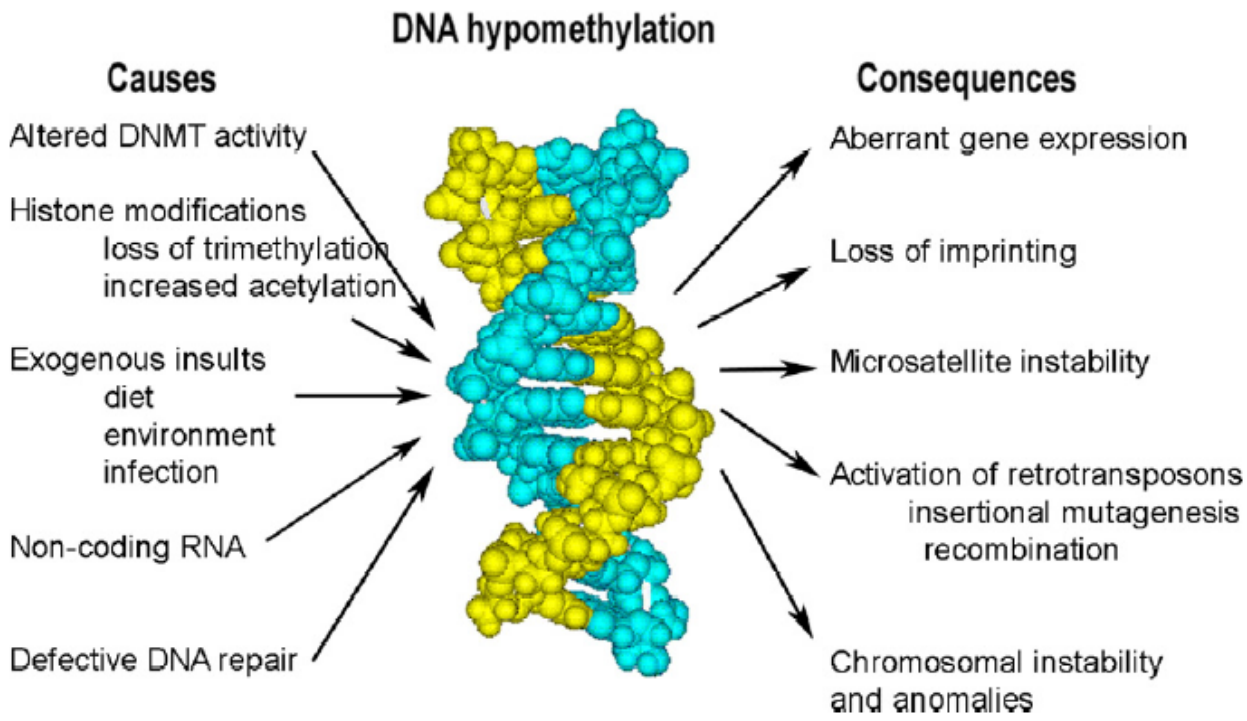


Fig. 1. DNA demethylation. The figure shows potential causes and consequences of DNA hypomethylation. Surrounding the figure of the double helix are processes linked to DNA demethylation as demonstrated by in vitro and in vivo models.

Metilación del ADN en la clínica

Metilación del ADN en la clínica

La relación observada en distintos tipos de cáncer entre hipometilación global y desarrollo de la enfermedad como medida de la progresión.

¿Como Indicador de prognosis?

Metilación del ADN en la clínica

La relación observada en distintos tipos de cáncer entre hipometilación global y desarrollo de la enfermedad como medida de la progresión.

¿Como Indicador de prognosis?

Los cambios en la metilación preceden a los cambios en malignidad, y por lo tanto podrían medirse para un eficiente...

¿ ...diagnóstico de cáncer?

Diagnóstico de cáncer

Existen numerosos tests que se están desarrollando para la identificación de alteraciones en los patrones de metilación de genes específicos (GSTP1 en próstata)

Table 2. Detection of Cancer in Body Fluids Using DNA Methylation as Marker

Tumor Type	Gene	Specimen	Methylation (%)	Reference
Prostate cancer	*GSTP1*	Serum/plasma	72	94
		Urine	36	
		Ejaculates	50	
Non–small-cell lung cancer	*APC*	Serum/plasma	47	95
	CDKN2A	Sputum/Bronchial washings/BAL	50	96
	p16, DAPK, MGMT, GSTP1	Serum/Plasma	73	97
Breast cancer	*p16ink4a*	Serum/plasma	23	98
	Cyclin D2, *RARβ*, Twist gene	Ductal lavage	85	99
Bladder cancer	*p14ARF*	Plasma	40	100
Colorectal cancer	*p16*	Plasma/serum	38	101
Esophageal cancer	*APC*-adenocarcinoma	Serum/plasma	27	37
	APC-SCC	Serum/Plasma	12	
Liver cancer	*p15*	Serum/plasma	81	102
Head and neck cancer	*p16, DAPK, GSTP1* and *MGMT*	Serum/plasma	42	41

Abbreviations: *GSTP1*, glutathione S-transferase Pi 1; *APC*, adenomatous polyposis coli; *CDKN2A/p16*, cyclin-dependent kinase 2A; *DAPK1*, death-associated protein kinase 1; *MGMT*, O-6 methylguanine-DNA methyltransferase.

Ensayos basados en PCR

Diagnóstico de cáncer

Ensayos basados en PCR

Métodos muy **sensibles**, que permite además subclasificar los tumores en algunos casos.

Son métodos **no invasivos** o mínimamente invasivos: citología exfoliativa, o se utilizan como muestra plasma, orina, saliva o esputos.

Terapias contra el cáncer

Fármacos

Agentes desmetilantes: Azacytidine, decitabine, fazarabine y dihydro-5-azacytidine (análogos de desoxicitidina modificados en la posición 5 del anillo pirimidínico)

Inhibidores de histonas desacetilasas (HDAC)

Oligodesoxinucleótidos antisentido

Terapias contra el cáncer

Fármacos

Agentes desmetilantes: Azacytidine, decitabine, fazarabine y dihydro-5-azacytidine (análogos de desoxicitidina modificados en la posición 5 del anillo pirimidínico)

Inhibidores de histonas desacetilasas (HDAC)

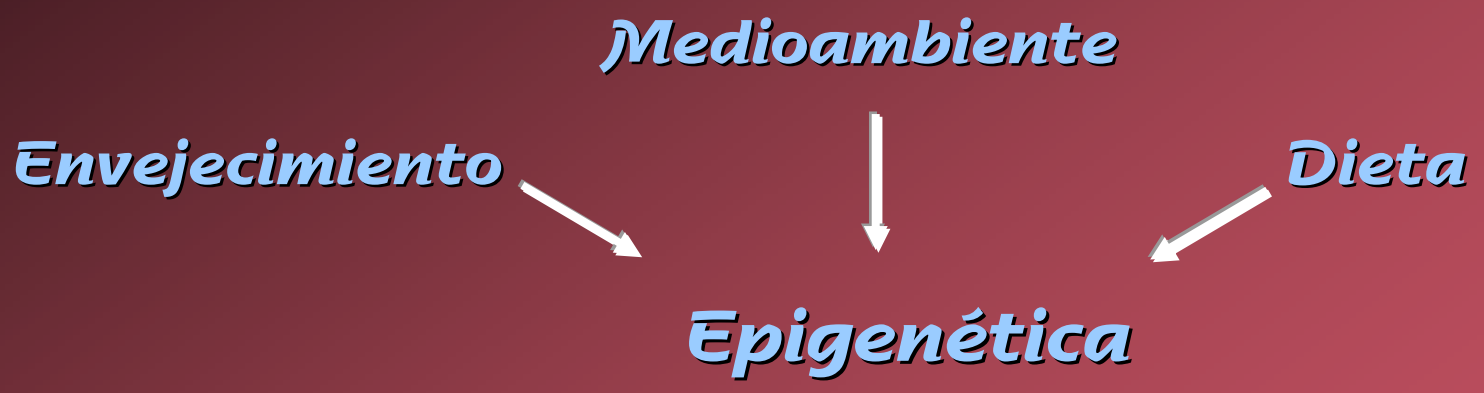
Oligodesoxinucleótidos antisentido

Conocer el perfil de metilación del tumor y tener fármacos que apunten a genes específicos.

Proyecto Epigenoma Humano

Epigenética

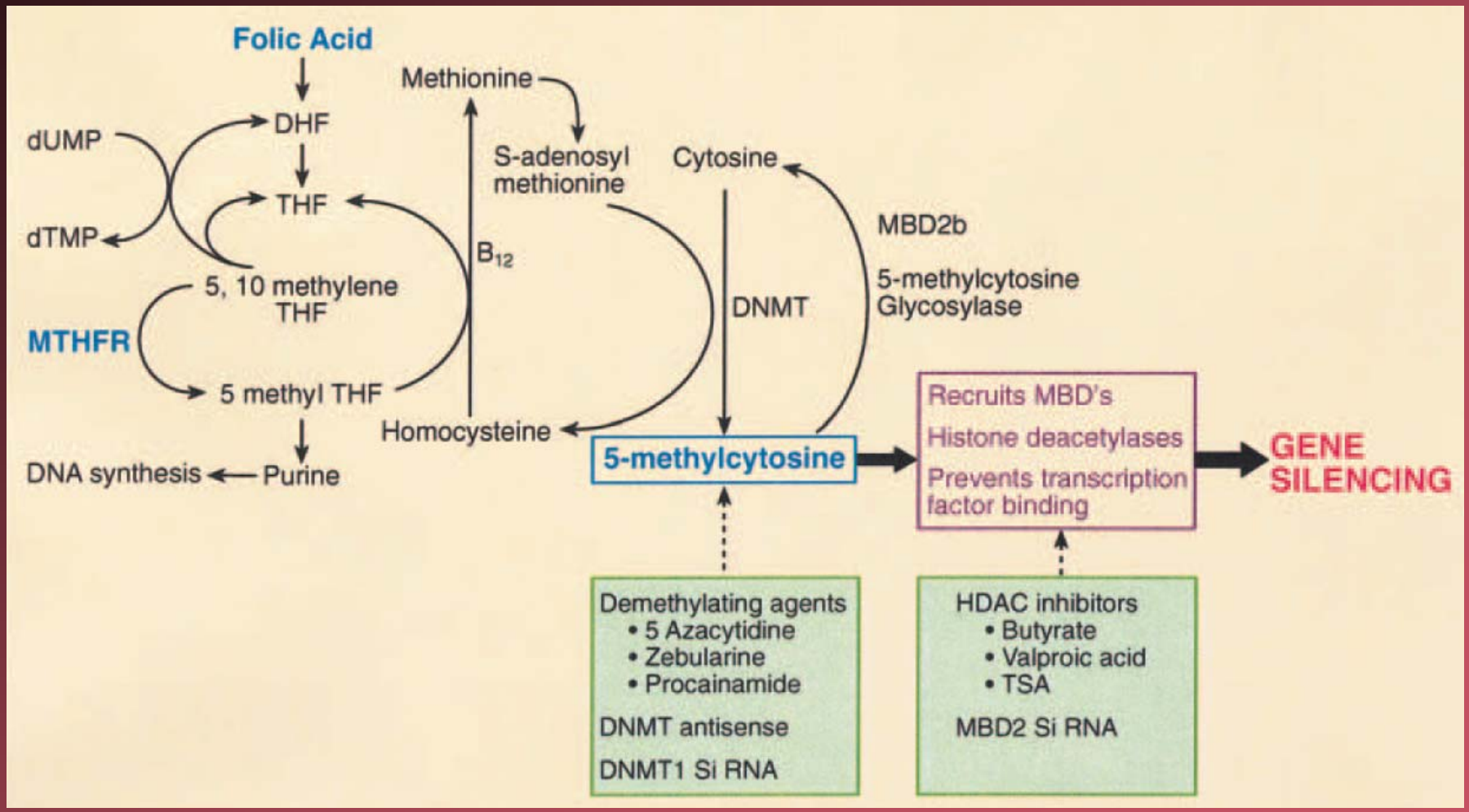
Cambios **reversibles y heredables** en la regulación génica que ocurren sin un cambio en la secuencia del ADN.



El ácido fólico

Epigenética

Dieta



Otras funciones de la metilación del ADN

Quizás sólo un pequeño porcentaje de los genes metilados tengan una función de regulación de la expresión directamente.

Otras funciones de la metilación del ADN

Quizás sólo un pequeño porcentaje de los genes metilados tengan una función de regulación de la expresión directamente.

Inactivación de ADN foráneo (transposones, animales trasngénicos).

Supresión de la recombinación en zonas repetidas del genoma.

Rol en el desarrollo embrionario.

Lo que queda por saber...

¿Cómo se establecen los patrones de metilación y luego se modifican a lo largo de la vida?

¿Es la metilación la que directamente reprime la trasncripción, o es un mecanismo secundario?

¿Cómo se consigue revertir terapéuticamente el patrón de metilación en una enfermedad?

¿Cómo se restablece el patrón correcto de metilación luego de un daño en el ADN?

¿Cómo medir metilación en el DNA?