

IV Epigenética en la enfermedad

Las *enfermedades complejas*, también denominadas multifactoriales, son aquellas que no son el resultado obvio del efecto de una mutación genética simple o de una influencia ambiental única [Hatchwell & Greally 2007]. La creciente incidencia de este tipo de patologías en la actualidad ha despertado un gran interés en su comprensión para diseñar e implementar alternativas terapéuticas eficaces. Inicialmente, el estudio de estas enfermedades se basó en buscar genes que estuvieran relacionados con su desarrollo. Sin embargo, en algunos casos no se encontraron lesiones genéticas que explicaran el comportamiento patológico y tampoco mostraron un patrón de herencia mendeliano, por lo que no se pudo responsabilizar solamente a ciertos genes por algunas enfermedades cardiovasculares, metabólicas y psiquiátricas.

Como ya se mencionó con anterioridad, la epigenética estudia cambios hereditarios, pero potencialmente reversibles, de la expresión genética mediada por patrones de metilación de ADN y la alteración de la estructura de cromatina. Tres puntos fundamentales nos permiten considerar a los factores epigenéticos como candidatos etiológicos de enfermedades complejas [Ptak & Petronis 2008]:

1. El estado epigenético de los genes es más dinámico en comparación con la secuencia de ADN, además de que puede ser alterado por aspectos del desarrollo y condiciones ambientales a los que esté expuesto el organismo [Weaver et al. 2004].
2. Algunas señales epigenéticas pueden ser transmitidas, en conjunto con la secuencia de ADN, a través de varias generaciones celulares. Esto significa que las marcas epigenéticas presentan cierta estabilidad meiótica [Riggs et al. 1998].
3. La modulación epigenética es crítica para la función genómica normal en procesos como la segregación de cromosomas en la mitosis, la inactivación de elementos parásitos de ADN y la regulación de la actividad genética [Jaenisch & Bird 2003]. La estabilidad epigenética parcial, la *metaestabilidad*, puede explicar ciertas irregularidades no-mendelianas de las enfermedades complejas.

Los mecanismos patológicos epigenéticos que se han propuesto para explicar ciertas enfermedades se enlistan en la Tabla 9 [Robertson 2005].

Observaciones en humanos			
Mortalidad (en general y relacionada con diabetes)	Consumo de alimentos durante periodos específicos del crecimiento	F2	Reprogramación de genes de impronta durante la gametogénesis
Anormalidades reproductivas y tumores	Exposición a dietilestilbestrol durante el embarazo	F1-F2	Epigenético
Síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman	Defecto de impronta	F2	Error al borrar la impronta de abuelos
Tamaño al nacimiento	Nutrición de la línea materna	Múltiple	Estado de desnutrición materna o desarrollo alterado del aparato reproductor materno
Diabetes tipo 2	Estrés nutricional	Múltiple	Hiperglicemia intrauterina causada por diabetes materna
Observaciones en animales			
Fenotipo <i>agouti</i> (ratón)	Variación natural, nutrición materna o exposición endocrina	F1-F2	Fenotipo determinado por el grado de metilación de ADN de epialelos metaestables. El mecanismo de herencia no está claro
Fertilidad, anormalidades en la edad adulta (rata)	Exposición a un agente perturbador de la función endocrina durante el embarazo	F1-F4	Cambios epigenéticos en la línea germinal del macho
Tumores reproductivos (ratón)	Exposición a dietilestilbestrol durante el embarazo	F1-F2	Cambios epigenéticos en la línea germinal de la hembra
Comportamiento (rata)	Atención materna al neonato	F1-F2	Fenotipo determinado por el grado de metilación del receptor glucocorticoide en hipocampo. La herencia puede ser epigenética o conductual
Desregulación del metabolismo de glucosa y concentraciones de enzimas hepáticas (rata)	Exposición a glucocorticoides durante el embarazo	F1-F2	Transmisión a partir de machos y hembra F1, se pierde en F3; efecto epigenético en células embrionarias germinales
Disfunción endotelial (rata)	Restricción proteica durante el embarazo	F1-F2	Función uterina vascular
Crecimiento, metabolismo de glucosa/insulina	Restricción proteica durante el embarazo	F1-F3	Ambiente intrauterino alterado resultado de la desregulación del metabolismo materno de glucosa/insulina

Tabla 9: Enfermedades o estados psicológicos reportados en mamíferos con un mecanismo de herencia transgeneracional no-genómico [Adaptado de Gluckman et al. 2007].

4.1 Irregularidades en la impronta genómica

La *impronta genómica* se define como la expresión selectiva de un gen de acuerdo al origen parental del alelo. Esto significa que existen marcas epigenéticas en algunos locus basadas en el origen del alelo (materno o paterno), lo que resulta en una expresión genética monoalélica diferenciada [Esteller 2008; Hall 1990; Barlow 1995]: para ciertos genes se prefiere la expresión del alelo materno, mientras que para otros, la expresión del alelo paterno es la elección. Esta expresión diferenciada puede ocurrir en todas las células, en tejidos específicos o durante diferentes etapas del desarrollo. En la actualidad se conocen alrededor de ochenta genes improntados, aunque este número sigue en aumento [Robertson 2005].

La variación en la metilación del ADN en los diferentes alelos es una característica básica de las regiones de impronta, y generalmente está localizada en *regiones de metilación diferencial* (DMR). Dentro de los DMR, se encuentran unas regiones de ~1-2 kb enriquecidas con dinucleótidos CpG [Lewis & Reik 2006] denominados *centros de control de impronta* (ICR) que controlan la expresión genética de los dominios improntados [Robertson 2005]. Mientras los DMR pueden ser reprogramados durante el desarrollo, la metilación diferencial en los ICR generalmente se establece en las células germinales y se mantiene durante todo el desarrollo [Reik & Walter 2001] (Fig. 49).

El *factor de unión a CCCTC* (CTCF) es una proteína que se une a secuencias de nucleótidos altamente divergentes mediante diferentes combinaciones de motivos dedos de zinc contenidos en su estructura. El CTCF es un regulador importante de la expresión de genes improntados al controlar el acceso de potenciadores a regiones promotoras [Klenova et al. 2002]. Varios estudios en ICR *in vitro* e *in vivo* han mostrado que los CTCFs se unen solamente al alelo parental no-metilado [Kanduri et al. 2000; Thakur et al. 2004], lo que permite que los genes regulados por ICRs se expresen de manera alelo-específica. Es probable que la unión de CTCF también proteja a los DMRs de la metilación *de novo* [Schoenherr et al. 2003].

La pérdida de la impronta (LOI) consiste en la alteración de marcas de impronta genómica a través de un aumento o disminución del grado de metilación de ADN, o simplemente, por la pérdida de expresión genética alelo-específica [Feinberg et al. 2002].

Este enfoque ha podido explicar enfermedades como el síndrome de Angelman, síndrome de Beckwith-Wiedemann [Weksberg et al. 2003], síndrome de Prader-Willi, la osteodistrofia hereditaria de Albright y la diabetes mellitus neonatal transitoria [Vliet et al. 2007]. Para más información de estas patologías, consultar el artículo de Robertson 2005.

4.2 Género y susceptibilidad a desarrollar enfermedades

El *dimorfismo sexual* consiste en la susceptibilidad diferenciada a adquirir una enfermedad entre los diferentes sexos [Ptak & Petronis 2008]. Esta condición implica que existe una frecuencia desigual a desarrollar cierta enfermedad entre las mujeres y los hombres: aunque ambos géneros pueden ser afectados por la patología, uno de éstos es más susceptible a desarrollarla. La enfermedad de Crohn, el desorden de pánico, enfermedades cardíacas estructurales y el hipertiroidismo son más comunes en las mujeres; mientras que los hombres experimentan con mayor frecuencia autismo, enfermedad de Hirschsprung, colitis ulcerativa, Parkinson, alcoholismo, alergias y asma [Oster 1999].

Contrario a lo que se pudiera inferir inicialmente, los efectos del género en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades complejas no pueden ser explicadas por efectos del cromosoma sexual (X/Y); es más, estudios de asociación y ligación genética han detectado relaciones entre diversas enfermedades complejas y los cromosomas autosomales [Kaminsky et al. 2006]. Los mismos estudios han sugerido que los cromosomas y los genes individuales pueden ser blanco de hormonas sexuales que, aunque no pueden cambiar la secuencia de ADN, pueden ser potentes moduladores del estado epigenético. Se sabe que las hormonas, incluyendo las de tipo sexual, pueden controlar la expresión genética al inducir modificaciones epigenéticas. Por lo tanto, se piensa que las diferencias en la regulación epigenética de los genes y el desarrollo de enfermedades complejas en los géneros están mediados por hormonas sexuales [Kaminsky et al. 2006].

En algunas enfermedades complejas, el riesgo de que la progenie desarrolle una enfermedad parece depender del sexo del padre afectado. El asma, el desorden bipolar y la epilepsia son transmitidos principalmente por la madre afectada; mientras que la diabetes tipo 1 parece ser transmitido mayoritariamente por el padre que la padece [Petronis 2001]. Adicionalmente, estudios de genética molecular han revelado un origen paterno en fenotipos como obesidad [Guo et al. 2006; Wu & Suzuki 2006], Alzheimer [Bassett et al. 2002], asma [Demenaïs et al. 2001], autismo [Lamb et al. 2005] y psicosis [Schulze et al. 2003].

4.3 Errores en la metilación de ADN e inestabilidad de repeticiones

Algunos defectos en la metilación del ADN se han relacionado con ciertas enfermedades asociadas con inestabilidad en las repeticiones de secuencias (Fig. 48). En ejemplo de este tipo de errores son las repeticiones de trinucleótidos en ciertos genes que exceden la carga de tripletes normal, lo que se denomina *expansión de repeticiones de trinucleótidos* (TNR). Este fenómeno ocurre durante la gametogénesis e induce mutaciones o silenciamiento de los genes afectados. La causa de la inestabilidad causada por TNR se desconoce, aunque se ha sugerido que puede surgir a partir de errores en la

función de la ADN polimerasa, en la reparación de ADN, posicionamiento nucleosomal y por fragmentos Okazaki aberrantes [Cleary & Pearson 2003]. Las regiones TNR se encuentran hipometiladas y son susceptibles sufrir metilación *de novo*. Algunas de las enfermedades que se han propuesto como susceptibles a tener estas repeticiones de tripletes no-metilables son la enfermedad de Huntington (con la presencia de trinucleótidos CAG), distrofia miotónica tipo 1, varias formas de ataxia-espinocerebelar (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA17), y en la ataxia de Friedreich (con repeticiones de GAA).

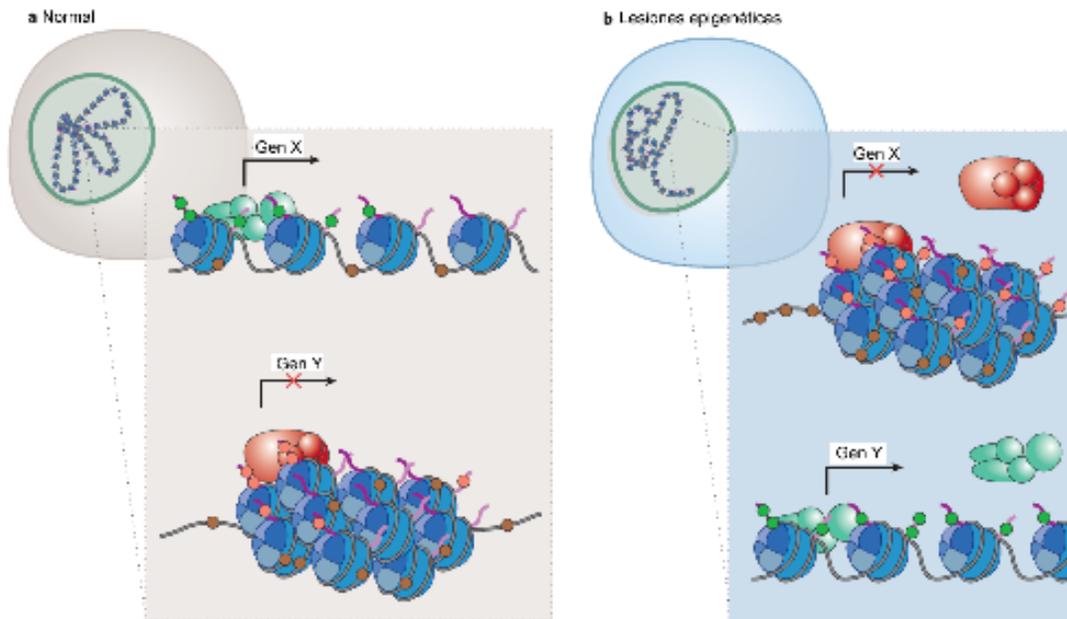


Figura 48. Naturaleza de las lesiones epigenéticas.

Aunque la naturaleza de las lesiones genéticas es bien relativamente bien comprendida, las lesiones epigenéticas han sido un poco más difíciles de definir. En esta imagen se demuestran defectos conocidos y posibles en el epigenoma que pueden inducir un estado patológico. (a) X es un gen transcripcionalmente activo con un patrón de metilación disperso en ADN (círculos café), y una estructura abierta de cromatina, interacción con proteínas de la eucromatina (complejo proteico verde) y modificaciones en histonas como la acetilación de H3K9 y metilación de H3K4 (puntos verdes). Y es un gen transcripcionalmente silenciado con metilación densa de ADN, estructura de cromatina cerrada, que interacciona con proteínas de la heterocromatina (complejo proteico rojo) y con modificaciones en histonas como metilación de H3K27 (círculos rosas). (b) La célula anormal puede cambiar su epigenotipo a través del silenciamiento de genes normalmente activos o viceversa, por la activación de genes normalmente reprimidos. Además, la lesión epigenética podría incluir un cambio en el número de proteínas de heterocromatina en el gen X (como en EZH2 en cáncer) o proteínas eucromáticas en el gen Y (como proteínas tritorax en leucemia). También pueden tener patrones anormales de metilación en zonas promotoras [Adaptado de Feinberg 2007].

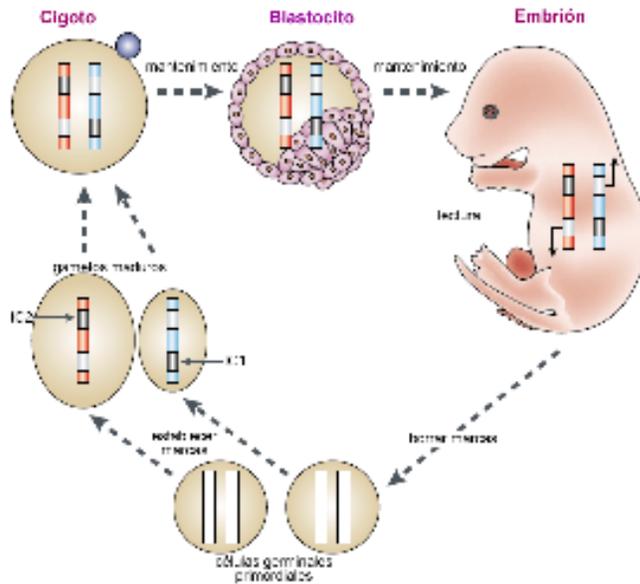


Figura 49. Ciclo de vida de las marcas de metilación de impronta.

El borrado, el establecimiento y el mantenimiento de las marcas en los centros de impronta durante el desarrollo embrionario. Se muestran como ejemplos los elementos de control IC1 e IC2 (cromosoma 11p15.5). El color gris indica modificación y el blanco es no-modificación en los alelos correspondientes. Los cromosomas paternos se marcan según el sexo en azul (hombre) o rojo (mujer). La interpretación transcripcional de las improntas primarias (lectura) en el embrión en desarrollo está indicado con flechas [Adaptado de Reik & Walter 2001].

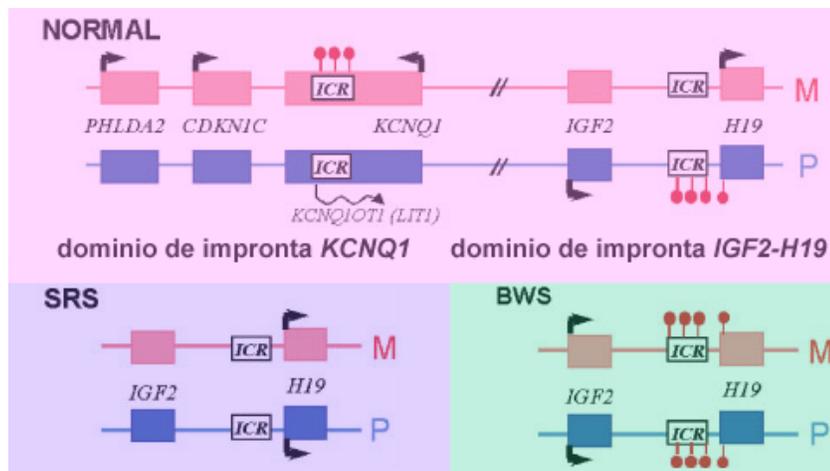


Figura 50. Regulación epigenética de los dominios IGF2-H19 y KCNQ1.

En una organización normal, el ICR de H19 está metilado (puntos rojos) exclusivamente en el alelo paterno (P). Esto permite la expresión paterna del gen IGF2 y la expresión materna de H19. El dominio ICR regulador del dominio adyacente, KCNQ1, está metilado solo en el alelo materno (M). En el alelo paterno no metilado, esta región produce un ARNnc (KCNQ1OT1) que aparentemente tiene un efecto represivo sobre el dominio del cromosoma paterno. En la parte inferior, se muestran los patrones de expresión anormal característicos del síndrome de Silver-Russell (SRS, izquierda) y el Beckwith-Wiedemann (BWS, derecha) [Adaptada de Delaval et al. 2006].

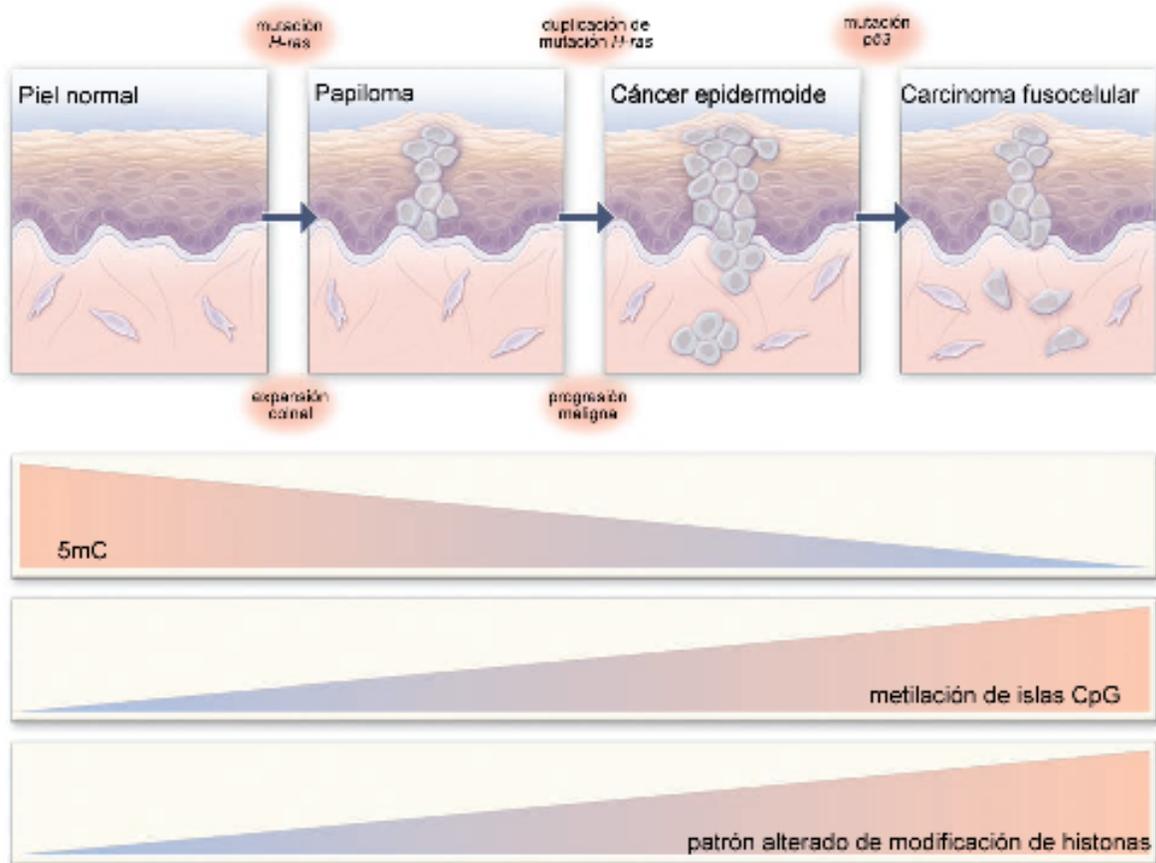


Figura 51. Alteraciones epigenéticas en la progresión de la tumoración.

Muestra de un modelo de carcinogénesis, de varios pasos, en la piel. Además de los cambios fenotípicos celulares y la acumulación de defectos genéticos, existe una pérdida progresiva de las marcas de metilación global en el ADN, una frecuencia incrementada de islas CpG hipermetiladas y un mayor desequilibrio en las modificaciones de histonas durante el desarrollo de la enfermedad. Abreviaturas: *H-ras*=Harvey-ras (oncogén); 5mC=5-metil-citosina [Adaptada de Esteller 2008].

4.4 Defectos específicos en la maquinaria de metilación

Las enfermedades humanas que surgen a partir de mutaciones en los componentes de la maquinaria de metilación en el ADN han probado ser importantes para mantener los patrones de metilación normales de cada tipo celular. La regulación inapropiada de la metilación de ADN en tipos celulares específicos conlleva consecuencias patológicas, como el desarrollo de lupus eritematoso sistémico (SLE) y el síndrome de inmunodeficiencia inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF) [Robertson 2005].

La investigación sobre patologías con trasfondo epigenético se ha enfocado principalmente sobre la metilación del ADN (Fig. 52); sin embargo, como se mencionará a continuación, también hay otros factores de remodelación de la cromatina que intervienen en estas enfermedades.

4.4.1 Cáncer

El cáncer, también llamado *neoplasma maligno*, es una clase de patología que se caracteriza por células que muestran un crecimiento descontrolado, invaden tejidos adyacentes, y que en algunas ocasiones, se esparcen hacia otros compartimentos corporales por vía linfática o sanguínea (metástasis).

Según múltiples estudios, existe una estrecha relación entre el cáncer y las alteraciones epigenéticas, tanto así que esta enfermedad es una de sus principales líneas de investigación (Tabla 10). Sin embargo, aún no se sabe si los cambios epigenéticos son la causa o el resultado de las transformaciones celulares de esta enfermedad [Vliet et al. 2007]. El epigenoma de células cancerígenas generalmente sufre grandes alteraciones en los patrones de metilación de ADN en forma de hipometilación global e hipermetilación en zonas promotoras específicas [Esteller 2005]; además de patrones aberrantes de modificación de histonas [Fraga et al. 2005b]. Aún no se sabe si las epimutaciones causan la transformación celular anómala o son resultado de ésta [Laird 2005; Baylin & Bestor 2002].

La LOI de un gen promotor de crecimiento induce la activación de un alelo normalmente silenciado, lo que resulta en una expresión anormalmente alta de proteínas de crecimiento. El locus de impronta IGF2/H19 codifica IGF2, un factor de crecimiento autócrino, y H19, un ARNnc con propiedades supresoras del crecimiento [Hao et al. 1993]. Las proteínas IGF2 y H19 se expresan en células normales a partir de alelos maternos y paternos, respectivamente, de tal forma que la activación del alelo materno IGF2 resulta en una expresión aumentada de IGF2 y una expresión reducida de H19 en el mismo alelo (Fig. 50). La pérdida de impronta de IGF2 es el LOI más común entre diferentes tipos tumorales, entre los que se encuentran el de colon, hígado, pulmón y ovario [Moulton et al. 1994; Steenman et al. 1994]. Además, se ha observado que los defectos por LOI en IGF2/H19 varían según el tipo de lesión [Robertson 2005]. Por ejemplo, en el tumor de Wilm (en riñón) la región ICR1 en el alelo materno se metila *de novo*, lo que

inhibe la unión de CTCF y así permite el acceso de los potenciadores de H19 al promotor IGF2 en ambos alelos.

Se han encontrado que genes involucrados en diversas funciones celulares pueden estar mal regulados en células cancerosas. Algunas estimaciones recientes sugieren que un tumor promedio contiene entre 100 y 400 regiones promotoras hipermetiladas [Esteller 2007]. En tumores con una progresión bien definida (Fig. 51) se puede observar una hipermetilación aberrante en el ADN de células precursoras [Vliet et al. 2007]. Esto sugiere que la hipermetilación, más que ser resultado secundario de alteraciones genéticas, contribuye directamente a la transformación celular maligna [Chan et al. 2002]. Se han encontrado patrones de hipermetilación anómala en zonas promotoras de genes involucrados en la regulación del ciclo celular ($p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4a}}$, Rb, $p^{14\text{ARF}}$), reparación de ADN (BRCA1, MGMT), señalización, resistencia a fármacos, detoxificación, apoptosis (DAPK, TMS1), diferenciación, angiogénesis y metástasis [Scarano et al. 2005; Esteller 2007].

Se cree que la hipometilación general observada en células cancerosas [Hsiung et al. 2007; Ehrlich 2002] provoca inestabilidad genómica y la formación de estructuras cromosómicas anormales. Además, se ha reportado que induce la activación de oncogenes, como el homólogo RAS viral (*r-ras*), antígeno de melanoma 1 (*MAGE1*) y *PAX2* [Feinberg et al. 2006].

Los patrones de metilación de histonas también parecen estar alterados en cáncer [Fraga et al. 2005b; Pogribny et al. 2006]. Los dinucleótidos CpG están generalmente metilados en células normales, con la excepción de las islas CpG reguladoras que se encuentran hipometiladas [Lund & van Lohuizen 2004]. En contraste, las células cancerosas muestran una hipometilación general y una hipermetilación de islas CpG. Este cambio en el patrón de metilación de ADN resulta generalmente en el silenciamiento inapropiado de ciertos genes, especialmente en los supresores de tumoración, lo cual induce el desarrollo de varios tipos de cáncer.

Se ha observado una pérdida en el grado de la acetilación en residuos H4K16 y de trimetilación de H4K20 en tejidos pre-cancerosos como linfoma, adenocarcinoma colorectal y carcinoma escamoso. Estas pérdidas se acumulan durante el desarrollo tumoral [Fraga et al. 2005a]. La expresión de maspina, un inhibidor de serina proteasa, está reducida en algunas formas de cáncer avanzado por la metilación de sus secuencias promotoras [Boltze et al. 2003; Futscher et al. 2004; Yatabe et al. 2004].

También se han reportado alteraciones en la dimetilación de H3K9 [Frigola et al. 2006] y niveles reducidos de acetilación de histonas en general [Mitsiades et al. 2004].

Gen	Función en el desarrollo tumoral	Sitio de tumoración
APC	Desmodulación de proliferación celular, migración, adhesión, reorganización del citoesqueleto y estabilidad cromosómica	Seno, pulmón, esófago.
BRCA1	Reparación de ADN y activación de transcripción	Seno, ovario
CDKN2A/p16	Inhibidor de cinasa ciclina-dependiente	GIT, cuello y cabeza, NHL, pulmón
DAPK1	Enzima dependiente de calcio/calmodulina que fosforila residuos de serina/treonina en proteínas. Supresión de apoptosis	Pulmón
E-cadherina	Incremento de proliferación, invasión y/o metástasis	Seno, tiroides, estómago
ER	Resistencia hormonal	Seno, próstata
GSTP1	Detoxificación disminuida de metabolitos activos derivados de carcinógenos	Próstata, seno, riñón
hMLH1	Reparación de ADN defectuosa y mutaciones genéticas	Colon, estómago, endometrio, ovario
MGMT	Gen relacionado a p53 involucrado en la reparación de ADN y resistencia a fármacos	Pulmón, cerebro
p15	Activación y proliferación celular no-restringida	Leucemia, linfoma, carcinoma de células escamosas, pulmón
RASSF1A	Pérdida de regulación negativa de proliferación a través de la inhibición de la progresión de fase G1/S	Pulmón, seno, ovario, riñón, nariz, faringe.
Rb	Falla en la represión de la transcripción de genes requeridos para la replicación de ADN y división celular	Retinoblastoma, oligodendroglioma
VHL	Estabilidad de ARN alterada y degradación errónea de proteínas de unión a ARN	Riñón

Tabla 10. Genes metilados en cáncer humano y su rol en el desarrollo tumoral.

Abreviaturas: APC=poliposis coli adenomatosa; BRCA1=cáncer de seno 1; CDKN2A/p16=cinasa dependiente de ciclina 2^a; DAPK1=proteína cinasa asociada con muerte 1; ER=receptor de estrógenos; GSTP1=glutación S-transferasa fosfato 1; hMLH1=homólogo Mut L 1; MGMT=O-6 metilguanina-ADN metiltransferasa; RASSF1A=miembro de la familia de dominios de asociación a Ras 1; Rb=retinoblastoma; VHL=von Hippel-Lindau; GIT=tracto gastrointestinal; NHL=linfoma no Hodgkin [Adaptado de Das & Singal 2004].

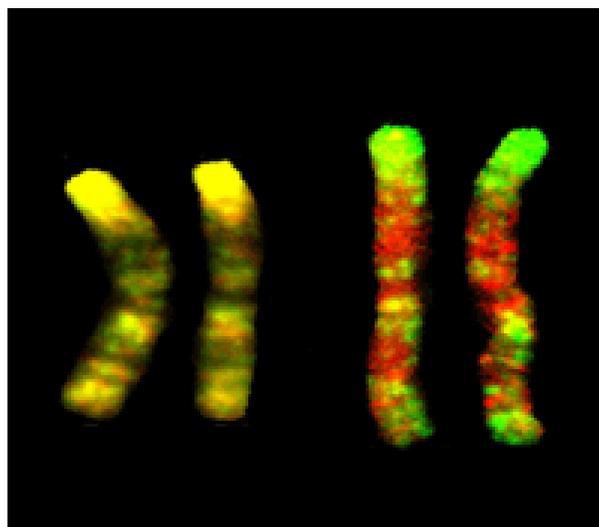


Figura 52. Patrones de metilación de cromosoma 1 en dos pares de gemelos monocigóticos de diferentes edades.

Tres años (izquierda) y cincuenta (derecha) años de edad. Aunque cada gemelo comparte la misma información genética con su hermano, se pueden apreciar diferentes patrones de metilación; especialmente cuando aumenta su edad. Código de colores: hipermetilación= verde; hipometilación= rojo; metilación similar= amarillo [Adaptado de Fraga et al. 2005a].

Alelo	Tejidos con productos de interacción con GNAS	Pérdida de función alélica
Materno	Gónadas, glándula pituitaria, tiroides, túbulo proximal renal y tejido adiposo.	Disminución de la adiposidad, función hipermetabólica, hipoglicemia, disminución en la actividad de locomoción y resistencia a la hormona paratiroidea
Paterno	Tejido adiposo pardo	Mayor adiposidad

Tabla 11. Tejidos con los que interactúa la proteína G_s y los efectos de la pérdida de función alélica del complejo GNAS materno y paterno [Adaptado de Gallou-Kabani & Junten 2005].

Curiosamente, durante el proceso normal de envejecimiento celular también se presenta una disminución generalizada de los niveles de metilación [Wilson & Jones 1983], y un incremento en la hipermetilación de zonas localizadas del ADN [Richardson 2002]. Por lo tanto, la mayor incidencia de cáncer en individuos maduros tiene una explicación epigenética.

4.4.2 Lupus

El *lupus eritematoso sistémico* (SLE) es una enfermedad autoinmune caracterizada por erupciones cutáneas, dolor en las articulaciones, glomerulonefritis, células T defectuosas y presencia de anticuerpos anti-ADN, anti-cromatina y anti-anticuerpos. El SLE es 8-10 veces más frecuente en mujeres que en hombres, con una incidencia de ~1 por cada 2,000 personas a nivel mundial [Robertson 2005].

Se piensa que en esta enfermedad las células T, responsables de la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos, sufren una disminución en el grado de metilación de su ADN [Deng et al. 2001]. Los genomas de células T con SLE están hipometilados, ya que presentan una disminución del 15-20% con respecto a su grado de metilación normal. Además, se han encontrado concentraciones reducidas de DNMT1 en estas células [Richardson et al. 1990]. Un experimento que sustentó esta idea fue el realizado sobre células CD4⁺ normales de ratón a los que se les expuso a 5-aza-2'-deoxicitidina, (un inhibidor de la metilación de ADN), las cuales posteriormente mostraron comportamiento autoreactivo. La transferencia adoptiva de estas células provocó en los ratones una enfermedad tipo SLE [Quddus et al. 1993]. Además, hay reportes de humanos que presentaron una enfermedad tipo-lupus al ser expuestos a inhibidores de la metilación de ADN [Richardson 2003; Scheinbart et al. 1991].

En células T normales, la DNMT1 se activa transcripcionalmente cuando se estimula por señales provenientes de la *vía cinasa regulada por señales extracelulares* (ERK), la cual está alterada en células T de lupus [Robertson 2005]. El señalamiento anómalo de ERK probablemente contribuye a las concentraciones reducidas de DNMT1 y la consecuente hipometilación de las células T en pacientes con SLE [Deng et al. 2003]. Se piensa que el fármaco antihipertensivo hidralazina causa hipometilación en células T y enfermedad tipo-lupus en humanos al inhibir esta vía [Robertson 2005].

Adicionalmente, algunos estudios en humanos sugieren que la exposición a inhibidores de la DNMT tiene un efecto similar al visto en ratones con enfermedad tipo-lupus [Harmon & Portanova 1982]. Por lo tanto, SLE demuestra que los defectos en la metilación del ADN se regulan de manera diferencial, al responder a diferentes estímulos y dependiendo del tipo celular.

4.4.3 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico consiste en una combinación de síntomas que promueven el desarrollo de enfermedades cardíacas y de diabetes. El cuadro diagnóstico de esta enfermedad consiste en hipertensión arterial, hiperglicemia, hiperlipidemia, concentración baja de HDL y obesidad central [MedlinePlus 2008].

Se han descrito alteraciones epigenéticas tempranas en aterosclerosis, animales alimentados con dietas aterogénicas, diabetes mellitus tipo 2 y envejecimiento [Issa 2002; Poirier et al. 2002; Lund et al. 2004; Dong et al. 2002; Post et al. 1999]. Sin embargo, las alteraciones epigenéticas involucradas en el síndrome metabólico aún no han sido totalmente exploradas, pero ya se inició su investigación [Boloker et al. 2002; Dabelea et al. 2000; Issa 2002].

La Organización Mundial de la Salud reportó que en el 2005 existían aproximadamente 1,600 millones de personas mayores de 15 años con sobrepeso, y que al menos 400 millones de adultos eran obesos. Además, se calcula que en el año 2015 habrán ~2,300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad, un incremento que se ve especialmente marcado en el medio urbano [OMS 2008].

También se ha observado una prevalencia de obesidad en países con ingresos bajos o medios. La hipótesis del *genotipo ahorrador* ('thrifty genotype') propuesta en 1962 por el genetista James V. Neel intentó explicar la tendencia de ciertos grupos étnicos a padecer diabetes. La hipótesis dice que un genotipo diabético pudo haber sido ventajoso para las poblaciones cazadoras y recolectoras, especialmente para las madres, ya que les habría permitido engordar más rápido en tiempos de abundancia y así tener mejores probabilidades de supervivencia durante periodos de escasez. Por lo tanto, con los hábitos de consumo abundante de alimentos y el sedentarismo, este genotipo pudo haberse convertido en un elemento de desventaja al inducir obesidad crónica y problemas de salud relacionados a estos factores [Neel 1962].

En la actualidad existen reportes disponibles para apoyar la idea de que, junto con la herencia del genotipo "ahorrador", los individuos que padecen el síndrome metabólico experimentaron una *programación epigenética* inadecuada durante su desarrollo fetal y post-natal. Aparentemente, cuando un individuo con un fenotipo ahorrador está expuesto a altos niveles de nutrientes durante su vida es más susceptible a presentar obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, además de que aparentemente se puede transmitir esta predisposición a su progenie [Hales & Barker 1992; Barker 1990, 1993].

La insuficiencia placentaria se ha asociado persistentemente con alteraciones epigenéticas en ratas. Cambios en el metabolismo del monóxido de carbono en hígado, provocados por deficiencia de folato, produce hipometilación de ADN y acetilación de histonas en este tejido [MacLennan et al. 2004].

La restricción proteica durante la gestación incrementa la velocidad de la apoptosis pancreática en crías de ratas. Esto implica que existan menor cantidad de células pancreáticas β y se altere el desarrollo endocrino del páncreas en la siguiente generación [Blondeau et al. 2002]. De manera similar, una dieta rica en carbohidratos en ratas recién nacidas induce inmediatamente hiperinsulinemia, la cual persiste durante la edad adulta sin necesidad de algún estímulo adicional. Esta impronta metabólica, una vez establecida, forma un ciclo vicioso por que las ratas hembra con un fenotipo "alto en carbohidratos" lo transmiten a su progenie [Srinivasan et al. 2003].

Se ha propuesto que la desnutrición o la sobrealimentación en etapas críticas del desarrollo, como la niñez y la adolescencia, podrían programar su metabolismo de lípidos, y de otros sistemas metabólicos, por el resto de su vida [Wu et al. 2004]. Por ejemplo, un análisis utilizó la información de ALSPAC (*Avon Longitudinal Study of Parents and Children*) y reportes históricos de Överkalix (Suecia) para estudiar la influencia de los efectos transgeneracionales del tabaquismo y el consumo de alimentos (basándose solamente en la disponibilidad, sin datos nutricionales) en la mortalidad [ALSPAC 2008]. Se reportó que la longevidad de los sujetos de estudio está influenciada por el consumo de alimentos de los abuelos paternos, particularmente durante el periodo de crecimiento lento (de los 8-10 años en niñas; 9-12 en niños). Se encontró además que si los abuelos paternos, durante el periodo de crecimiento lento:

- Experimentaron hambruna, el sujeto de estudio estuvo generalmente protegido contra muerte por eventos cardiovasculares. Se piensa que las abuelas paternas podrían tener el mismo efecto.
- Vivieron hambruna, la mayoría de sus nietos no experimentaban diabetes.
- Tuvieron acceso a una gran cantidad de alimento, sus nietos presentaban cuatro veces más riesgo de muerte por diabetes mellitus.

Además, los nietos presentaron la tendencia a estar protegidos de muerte cardiovascular si la madre vivió durante uno o varios años con abundancia alimenticia durante su periodo de crecimiento lento. Por lo tanto, se cree que el periodo de crecimiento lento es un periodo ontogenético crítico pero que aún no tiene un mecanismo de funcionamiento definido [Kaati et al. 2002; Pembrey et al. 2006].

En adultos se han descrito cambios en los patrones de metilación durante la diferenciación celular para algunos pocos genes. Por ejemplo, dos estudios mostraron una estricta correlación entre la desmetilación del promotor leptina y en preadipocitos durante su diferenciación a adipocitos [Melzner et al.

2002; Yokomori et al. 2002]. La leptina regula el balance energético a través de la modulación electrofisiológica de neuronas orexígenas (neuropéptido Y/péptido relacionado a agouti) y neuronas anorexígenas, por lo que también tiene un efecto trófico en neuronas del hipotálamo involucrado en la respuesta a nutrientes. No obstante, la leptina sólo tiene estos efectos durante una corta ventana temporal en el desarrollo post-natal: en el periodo neonatal, antes de que la leptina se involucre en la regulación del consumo de alimentos en adultos [Bouret et al. 2004]. Por lo tanto, es muy probable que las concentraciones de leptina, en conjunto con un estímulo nutricional particular, durante este periodo tengan consecuencias a largo plazo por la remodelación epigenética variable de la cromatina [Waterland & Garza 1999]. Sin embargo, se infiere hay mecanismos similares que se aplican en los genes relacionados con el desarrollo y la diferenciación.

Teóricamente, la acumulación de errores de metilación durante el envejecimiento [Issa 2002] puede contribuir al desarrollo de diabetes mellitus 2 al disminuir la capacidad de respuesta de los genes, cuya expresión debe ajustarse con respecto a concentraciones variables de glucosa [Waterland & Jirtle 2004].

Aunque aún no está demostrado formalmente, existe numerosa evidencia que indica que los genes de impronta son los candidatos con mayor probabilidad de estar involucrados en efectos evolucionarios y transgeneracionales de respuesta a las condiciones nutricionales [Gallou-Kabani & Junien 2005].

La diabetes y la obesidad, dos de los pilares del síndrome metabólico, generalmente van acompañados con cambios en la impronta genómica [Delrue & Michaud 2004]. El knockout de genes de impronta paternos resulta en el desarrollo de una placenta pequeña, mientras que el knockout de genes de impronta maternos induce placentomegalia [Constancia et al. 2002]. Este efecto está relacionado con el gen improntado IGF2: la expresión placentaria de IGF2 puede causar retraso idiopático en el crecimiento uterino en humanos [Sibley et al. 2004].

Los genes de impronta genómica también parecen tener funciones en el desarrollo post-natal. El complejo GNAS es un dominio de impronta que codifica la subunidad α de la proteína estimuladora G ($G_s\alpha$), la cual interactúa con la adenilato ciclasa y otros productos de transcripción tejido-específicos del alelo materno y paterno (Tabla 11) [Gallou-Kabani & Junten 2005].

Otros dos genes improntados de expresión paterna, Peg1 y Peg2, ejemplifican la sincronización entre la ingesta y la demanda de alimento. Estudios sugieren que las modificaciones epigenéticas pueden alterar el fenotipo de la madre y los hijos de acuerdo a la disponibilidad de comida. La sincronización de estas características adaptativas en la madre y la progenie, por medio de la expresión de algunos genes de impronta paternos, asegura que las crías tengan un buen cuidado materno [Curley et al.

2004]. Sin embargo, un estudio que utilizó micromatrices de oligonucleótidos concluyó que Peg1 y Peg3 están activados transcripcionalmente en tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por la dieta [Moraes et al. 2003]. En otro estudio se observó que la sobreexpresión de Peg1 alargaba adipocitos, lo que podría hacer que las concentraciones de ARNm de Peg1 pueda funcionar como un indicador del tamaño de adipocitos [Takahashi et al. 2005].

La demostración formal de la influencia de genes de impronta en la adaptación metabólica relacionada con diabetes y obesidad requerirá un análisis detallado de patrones epigenéticos en complejos de impronta [Gallou-Kabani & Junten 2005].

Como en el caso del cáncer, en casos de aterosclerosis se han reportado hipermetilación regional. El receptor de estrógeno α (ER α) tiene un grado de metilación superior en ateromas a comparación de tejido de músculo liso y aorta *in vitro* [Ying et al. 2000].

4.4.4 Esquizofrenia

La incidencia interracial de esquizofrenia sugiere que los genes de susceptibilidad a desarrollar la enfermedad han estado presentes en el ser humano desde hace aproximadamente 160,000 años [Muskiet & Kemperman 2006]. Estudios sobre familias con historial de esquizofrenia han mostrado que está asociada con un pequeño número de genes de susceptibilidad, los cuales también están involucrados en la depresión, desorden bipolar, sociopatía y problemas de aprendizaje. Se piensa que estos genes se han conservado durante la evolución porque también están relacionados con la creatividad excepcional y la inteligencia [Horrobin 2001].

La concordancia de esquizofrenia entre gemelos homocigóticos es de $\sim 50\%$ [Muskiet & Kemperman 2006]. Además, esta enfermedad parece ser transmitida a la progeñe principalmente por el padre que la padece, lo que sugiere patrones de impronta genómica [Ohara et al. 1997].

Varias líneas de estudio indican que la deficiencia de ácido fólico y ciertos polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de folato están relacionados con esquizofrenia [Abdolmaleky et al. 2006]. Estos estudios han mostrado que los pacientes con esquizofrenia tienen concentraciones bajas de folato circulante [Muskiet & Kemperman 2006], además de que las concentraciones séricas en pacientes con esquizofrenia son inversamente proporcionales a la severidad de sus síntomas [Goff et al. 2004]. Algunas condiciones que han sido definidas como factores de riesgo para desarrollar esquizofrenia, y que pueden inducir una deficiencia de folato, son: desnutrición materna, nacer en el periodo de transición invierno-primavera, ambientes urbanos, ser de un nivel socioeconómico bajo, alcoholismo, tabaquismo y evacuaciones frecuentes. Además, el consumo de ciertos medicamentos puede inducir un estado de

deficiencia: anticonceptivos orales, anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), anticonvulsivantes, hipolipemiantes, metotrexato, antihiperglucemiantes, diuréticos y ciertos antibióticos.

Por ejemplo, las mujeres que estuvieron en condiciones de hambruna en Holanda [Hoek et al. 1998] y China [St Clair et al. 2005] tuvieron hijos con riesgo duplicado de desarrollar esquizofrenia. La alta incidencia de esquizofrenia reportada en una cohorte holandesa coincidió con una incidencia 2.5 veces mayor de defectos del tubo neural, lo que sugiere un estado de folato bajo prenatal [Hoek et al. 1998].

Los genes involucrados con el desarrollo de esquizofrenia y que podrían ser sensibles a alteraciones epigenéticas son los de la *catecol-O-metiltransferasa* (COMT), reelina (RELN) y glutamato descarboxilasa (GAD₆₇) [Vliet et al. 2007]. La COMT cataliza el primer paso de la degradación de neurotransmisores como dopamina, epinefrina y norepinefrina. Se encuentra en el tejido cerebral en forma soluble (S-COMT) y unida a la membrana (MB-COMT). Un estudio *post mortem* en cerebro mostró que el promotor MB-COMT está hipometilado, y por lo tanto más activo, en pacientes con desorden bipolar y esquizofrenia que en pacientes control. La hiperactividad de MB-COMT está asociada con problemas de atención y funciones cognitivas ejecutivas. Además, existe una correlación entre COMT hiperactivo con la hipermetilación del promotor RELN [Abdolmaleky et al. 2006].

La *reelina* es una proteína encontrada en la matriz extracelular que modula las interacciones intercelulares críticas para el posicionamiento y migración neuronal durante el desarrollo cerebral. La proteína GAD₆₇ cataliza la producción del neurotransmisor *ácido gama-amino-butírico* (GABA). El gen que codifica la DNMT1 se activa por las mismas interneuronas que silencian la expresión de RELN y GAD₆₇ [Guidotti et al. 2000; Veldic et al. 2005]. Ya que el promotor RELN ha demostrado ser sensible a la metilación, se ha propuesto que la sobreexpresión de DNMT1 es, al menos parcialmente, responsable de la represión de RELN en las neuronas [Grayson et al. 2006]. Además, RELN ha mostrado estar hipermetilado en pacientes esquizofrénicos [Grayson et al. 2005]. Esto concuerda con observaciones de estructuras corticales *post-mortem* donde se ha encontrado una reducción de reelina y GAD₆₇ en pacientes esquizofrénicos, con desorden bipolar y depresión con respecto a pacientes control [Guidotti et al. 2000; Fatemi et al. 2000; Grayson et al. 2006].

El tratamiento crónico con metionina induce la hipermetilación del promotor RELN y reprime la expresión de RELN y GAD₆₇, induciendo un estado tipo psicótico en roedores [Tremolizzo et al. 2002]. En humanos, un estudio mostró que la administración de metionina en pacientes esquizofrénicos exacerbaba los síntomas de la enfermedad en la mayoría de los casos [Antun et al. 1971].

4.4.5 Autismo

El tejido cerebral de pacientes con autismo presenta una expresión inferior de MeCP2, el gen que codifica la proteína de unión a CpG metilado [Samaco et al. 2005; Thatcher et al. 2005]. Además, en estos pacientes se han encontrado anomalías en la metilación de UBE3A, un gen de impronta genómica que codifica la ubiquitina proteína ligasa E3A (*Ube3A*). Alrededor del 5% de los pacientes con autismo tienen duplicada la región de impronta del cromosoma 15q11-q13, en la cual se localiza UBE3A [Cook et al. 1998; Cook et al. 1997; Schroer et al. 1998; Schanen 2006].

Los niños con autismo tienen un menor índice de SAM/SAH en sangre, lo que posiblemente se traduce en una capacidad de metilación disminuida [James et al. 2004]. Adicionalmente, el desarrollo de autismo se ha relacionado con la exposición prenatal al ácido valpróico, un agente anticonvulsivante que también actúa como inhibidor de la histona desacetilasa (HDACI) [Christianson et al. 1994].

Además se han reportado concentraciones reducidas de una proteína también relacionada con la esquizofrenia y el trastorno bipolar en pacientes autistas, la reelina (en forma de ARNm y proteína) [Fatemi et al. 2005; James et al. 2004].

4.5 Acciones a futuro para el estudio de influencias epigenéticas en enfermedades humanas

4.5.1 Definir los epigenomas estándar

La organización epigenética anormal solo podrá ser definida cuando se conozcan los patrones normales de cada tipo celular. En la actualidad, los conceptos como *islas CpG* o *elementos transponibles* se utilizan para definir secuencias no-metiladas o metiladas, respectivamente. Idealmente, en el futuro se podrán definir patrones epigenéticos para cada una de las líneas celulares en diferentes etapas de desarrollo del cuerpo en varios organismos como una base importante de los estudios de enfermedades [Robertson 2005].

4.5.2 Identificar la variabilidad epigenética

Una vez que se hayan definido los epigenomas normales, se tratará la heterogeneidad entre los diferentes patrones individuales. Al recopilar información sobre varias poblaciones, probablemente se podrán asociar cambios individuales con características generales de algún grupo demográfico que tiene factores en común. Considerando que varios cambios epigenéticos ocurren durante las etapas tempranas de la enfermedad humana, se espera que ese rango de variabilidad pueda ser un instrumento de diagnóstico para los individuos que sean aún asintomáticos [Robertson 2005].

4.5.3 Estudios especializados sobre fuentes de variabilidad epigenética

Paralelamente a los estudios previamente mencionados, se podrá comparar información contenida en cohortes para determinar si hay factores específicos que influyen el comportamiento epigenético. Los que están recibiendo más atención en el presente son la dieta, fármacos, edad, género y el genotipo [Robertson 2005].

4.5.4 Estudios de asociación epigenómicos

Ya que se tengan suficientes estudios como los mencionados previamente, se podrán realizar estudios de asociación epigenómica sobre enfermedades específicas. La localización y el grado de variabilidad en el genoma serán útiles porque permitirán comprender la función de la desregulación epigenética en los mecanismos patológicos. Con esto se podrán diseñar biomarcadores para la detección temprana y la prognosis [Robertson 2005].

4.5.5 Mayor desarrollo bioinformático

El estudio epigenómico requiere de herramientas para organizar, manejar y analizar una gran cantidad de datos generados en los estudios, por lo tanto, será necesario promover la epigenómica computacional para poder cumplir con esas necesidades [Robertson 2005].

