

Epigenética: una aproximación

Drs. María Andreína Bruni, Juan José Puigbó

e-mail: puigboj@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos, incluso los más simples, contienen una enorme cantidad de información en la forma de ADN (ácido desoxirribonucleico). En cada célula, el ADN se organiza en unidades de información llamadas genes, que finalmente controlan todos los aspectos de la vida del organismo. En los seres humanos, la información genética está organizada en alrededor de 25 000 genes.

El núcleo de toda célula eucariótica contiene infinidad de moléculas de ADN, cada una de las cuales se empaqueta con proteínas y se organiza en estructuras llamadas cromosomas. La información genética humana se organiza en 23 pares de estos. Si se sumara todo el ADN contenido en los cromosomas de una célula superior, se conseguiría una molécula de alrededor de 2 metros de largo. Por lo tanto se necesita una condensación máxima de superenrollamiento de unas 10 000 veces para que pueda disponerse dentro del núcleo celular. Este empaquetamiento se logra, enrollando el ADN sobre "carretes" proteicos, llamados histonas, dando lugar a un polímero de ADN conocido como cromatina. Esta organización es esencial para los procesos altamente organizados mediante los cuales el ADN se distribuye durante la división celular.

Todas las células se forman por la división de células preexistentes. Cuando una célula se divide, la información contenida en el ADN debe duplicarse primero de manera precisa, y las copias se transmiten después a cada célula hija mediante una serie de procesos complejos. La mayor parte de las

divisiones celulares en las células corporales de los eucariotas conllevan un proceso llamado mitosis, el cual asegura que cada célula hija reciba una copia de cada cromosoma, y por ende, una copia de cada gen de la célula progenitora.

Asimismo, en los eucariotas, la reproducción sexual ocurre por fusión de dos células sexuales, o gametos, para formar una célula única, llamada cigoto. Para evitar que los cigotos tengan el doble de cromosomas que las células de los progenitores, cada gameto debe contener solo la mitad del número de cromosomas de estos. Por ello, los ciclos vitales sexuales incluyen un tipo de división celular especial, llamado meiosis, que reduce a la mitad el número de cromosomas.

Todos estos mecanismos biológicos están bien dilucidados, pero hasta hace poco no había forma de saber de qué manera se orquestaban todos estos eventos. Hoy en día, numerosos estudios se vuelcan hacia la epigenética, atribuyéndole la batuta.

La manera como se expresan los genes cobra más importancia que los genes en sí. Se responde así el porqué el hombre y el chimpancé, siendo tan distintos en su complejidad, comparten el 99 % de los genes.

1. EPIGENÉTICA

La historia de la epigenética está vinculada con el estudio de la evolución y el desarrollo. Durante los últimos 50 años, el significado del término epigenética también ha sufrido una gran evolución, que es paralelo al aumento de conocimiento sobre los mecanismos moleculares que rigen la regulación genética en eucariotas.

La definición actual es “el estudio de cambios hereditarios, mitóticos y/o meióticos, de la función de los genes que no puede ser explicada por cambios en la secuencia del ADN”. Es decir que la epigenética ofrece la posibilidad de reprogramar el genoma sin necesidad de modificar el material genético.

Un ejemplo fisiológico claro que demuestra la diversidad de fenotipos que puede presentar un mismo genoma, es el proceso de la embriogénesis.

Cuando se da la fusión de los gametos femenino y masculino, el huevo o cigote resultante tiene un genoma único y propio, es decir, que tiene una secuencia de ADN que mantendrá a lo largo de toda su vida. Está claro que las células que se generan a partir del huevo no presentan un mismo fenotipo. Más claramente, la célula primordial generará alrededor de 200 diferentes fenotipos somáticos (hepatocitos, miocitos, enterocitos, neuronas, etc.), todos dotados de un mismo material genético pero con diferentes expresiones del mismo. Esto se debe a la expresión diferencial del genoma, la cual es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos.

1.1. EVOLUCIÓN

EPIGENÉTICA VERSUS DOGMA CENTRAL

El dogma central de la era genética está atravesando una silenciosa revolución. La epigenética aparece como la nueva ciencia; aquella capaz de dar la estocada final al rígido dogma central. Es por esto, que el período científico actual se conoce como la “era posgenómica”.

El dogma central supone un sistema lineal de información, donde el genotipo es capaz de generar un fenotipo, y excluye completamente la influencia ambiental de su sistema. De esta manera, la evolución está regida únicamente por cambios en el “pool genético” de los individuos, que los hará más o menos aptos para adaptarse a su ambiente.

La epigenética, por el contrario, nos abre un abanico infinito de posibilidades de expresión de un mismo genoma, y estos distintos patrones de expresión dependerán enteramente de señales externas. Es decir, la epigenética va a descifrar la constante y dinámica interacción que existe entre el genoma y el ambiente, para dar lugar a un fenotipo. A su vez, este fenotipo es capaz de modificar de manera consciente o inconsciente su genotipo.

La discusión sobre la manera como las interacciones entre los organismos y el medio ambiente afectan los cambios evolutivos, se remonta a la idea lamarckiana

sobre la influencia de las circunstancias (medio ambiente) sobre los hábitos y costumbres de los organismos. Esta visión se sustenta en una distinción entre lo “interno” y lo “externo”, confinando así lo viviente a un dominio espacial interno que se diferencia del dominio espacial externo, inorgánico. Los organismos se consideraron como “*seres dotados de sentimientos e impulsos derivados de una organización interna que los capacita para reaccionar a las influencias del medio externo*” (1). Lamarck, entonces, no acepta una historia única de la vida a partir de un ancestro común, sino series de transformaciones idénticas a partir de sucesivas generaciones espontáneas.

El opositor más grande de las teorías lamarckianas fue sin duda, Charles Darwin (1809-1882). Su obra fundamental, “El origen de las especies según la selección natural” (1859) es globalmente resumida como “la supervivencia del más apto” (2). Darwin propuso que una población exhibe una variación fenotípica al azar y que los organismos más aptos sobrevivían, mientras que los menos aptos no vivían lo suficiente para reproducirse.

En 1896, un brillante psicólogo estadounidense, James Mark Baldwin (1861-1934) propuso, en concordancia con la teoría lamarckiana, el rol del ambiente en la selección evolutiva. Concibió lo que llamó *herencia orgánica* como una reconciliación entre las evoluciones lamarckista y darwinista: la habilidad de los individuos para aprender puede guiar los procesos evolutivos, facilitando la evolución, puliendo el paisaje adaptativo.

El proponía, por ejemplo, que un organismo tiene un amplio rango de mecanismos adaptativos que le permiten sobrevivir en diferentes ambientes. Inicialmente, cuando el organismo es situado en un ambiente estresante, este es capaz de adaptarse apenas, haciendo uso de procesos preexistentes para lograr reproducirse mínimamente. En generaciones subsecuentes, surgen cambios heredables en algunos de los individuos que fortalecen la adaptación somática (3).

En la evolución baldwiniana, estas adaptaciones liberan al organismo del estrés y les permitiría reproducirse más óptimamente. Los cambios heredables reemplazan los cambios fenotípicos inducidos por el ambiente, de manera que el nuevo fenotipo se presente incluso en ausencia del estresor que lo indujo en primer lugar. Estas predicciones en cuanto a la plasticidad del desarrollo con respecto al ambiente, seguida de mutaciones que estabilizan al

fenotipo, es conocido como el efecto Baldwin (4). Hoy en día, el efecto Baldwin es utilizado para referirse a conductas aprendidas que luego se convierten en instintos por mutaciones subsecuentes, pero la idea original de Baldwin era incluir la herencia de cualquier fenotipo.

En 1940, un grupo de biólogos evolucionistas desarrollaron una teoría darwiniana moderna, conocida como la síntesis moderna. Esta teoría combina las teorías evolutivas de Darwin con los modelos de herencia mendelianos. La síntesis moderna descartaba cualquier otro modelo, tales como aquellos que incluían la herencia de los caracteres adquiridos.

En conformidad con la síntesis moderna y una vez que se dilucidó la estructura de la molécula de ADN, en 1953, por Sir Francis Crick y James Watson, se definieron las bases moleculares del dogma central. La dualidad genotipo/fenotipo se convirtió en la dualidad ADN/proteínas. La aceptación del gen como entidad fundamental determinada, discreta y cerrada dio lugar a que el estudio de la evolución se centrara alrededor de la investigación de los cambios en la composición genética de la población por efecto de la selección natural. Esto llevó a que los organismos individuales se concibieran como seres no autónomos determinados por dos causas opuestas, una que actúa desde el genotipo y otra, separada, que actuaba desde el medio externo.

En 1961, Conrad Waddington aparece para explicar de manera ejemplar la interacción existente entre el genotipo y el medio ambiente. El imaginó la canalización del desarrollo, como una bola que desciende por los valles de un paisaje epigenético, cuyas características se moldean tanto por una red de genes interactuantes, como por el medio ambiente. A medida que el proceso transcurre, el paisaje se va reconfigurando, generando nuevas rutas y profundizando trayectorias recorridas previamente (5).

El paisaje epigenético es una interfase dinámica entre la dotación genética del huevo y las interacciones medioambientales modulables por el organismo en desarrollo. Viéndolo de esta manera, ni el genotipo, ni el ambiente externo determinan entonces causalmente al fenotipo, sino que participan en la conformación del paisaje y del patrón de canalizaciones al que el proceso ontogénico da lugar. Así pues los organismos modifican su paisaje epigenético a media que interactúan con el ambiente y así van disminuyendo los rangos de variabilidad y plasticidad estructural.

Se debe descartar la idea, entonces, de que los seres vivos son sistemas predecibles. Desde siempre se ha afirmado que el desarrollo depende de la preexistencia de un programa genético o que la información fluye en una sola dirección desde el ADN.

El debate de la genética versus la epigenética con respecto al rol del ambiente sobre el genotipo, es evidente en los estudios de gemelos idénticos.

En nuestra especie, los gemelos representan una forma singular de las relaciones fraternas. Los gemelos monocigóticos se forman a partir de un solo cigoto cuyas células se disocian para dar origen a dos organismos independientes.

En las ciencias médicas los gemelos constituyen un grupo idóneo para abordar el estudio de enfermedades hereditarias. En este tipo de padecimientos suelen observarse similitudes entre gemelos monocigóticos. Sin embargo, aun en este tipo de hermanos se detectan diferencias importantes. Se ha observado que pueden diferir en mutaciones en células somáticas, sobre todo a largo plazo (6). Los gemelos monocigóticos pueden presentar incluso, diferentes grados de susceptibilidad a enfermedades, lo cual es objeto de numerosos estudios en la actualidad.

Partes de estas diferencias podrían relacionarse con cambios epigenéticos, ya que tanto en animales clonados como en gemelos humanos monocigóticos se han encontrado discrepancias epigenéticas que se asocian con diferentes rasgos (7). En estudios comparativos se analizaron las diferencias epigenéticas que presentaban gemelos monocigóticos desde edades tempranas hasta edades avanzadas de la vida. Los perfiles epigenéticos eran idénticos entre hermanos a temprana edad, pero a medida que esta avanzaba aumentaban las diferencias epigenéticas (8). Estas diferencias son aun más notorias cuando los gemelos crecen en ambientes separados o cuando tienen antecedentes médicos distintos. Esto sugiere que los factores ambientales, como la exposición al tabaco, la actividad física, la dieta y las afecciones médicas podrían contribuir a la diferenciación de los perfiles epigenéticos y por ende a cambios en el fenotipo.

2. NIVELES DE ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

2.1 ADN

El ADN es un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos, unidades moleculares que consisten en: 1) un azúcar de cinco carbonos,

sea ribosa o desoxirribosa; 2) uno o más grupos fosfato, que hacen ácida a la molécula, y 3) una base nitrogenada, un compuesto anular que contiene nitrógeno y puede ser una purina, de doble anillo, o una pirimidina, de un solo anillo.

El ADN por lo general contiene las purinas adenina (A) y guanina (G); las pirimidinas citosina (C) y timina (T), el azúcar desoxirribosa y fosfato.

Las moléculas de ácidos nucleicos se componen de cadenas lineales de nucleótidos, unidos por enlaces fosfodiéster, cada uno consistente en un grupo fosfato y los enlaces covalentes que lo unen a los azúcares de nucleótidos adyacentes. Así, el carbono 3' de un azúcar se une al fosfato 5' del azúcar adyacente para formar un enlace fosfodiéster 3', 5'. La mayor parte de las moléculas de ADN presentes en las células tienen millones de bases de longitud y son direccionales, es decir, tienen un sentido. Independientemente de lo larga que sea la cadena, un extremo (el extremo 5') siempre tiene un carbono 5' y el otro extremo (extremo 3') siempre tiene un carbono 3', que no está unido a otro nucleótido. El ADN se compone de dos de tales cadenas mantenidas juntas por enlaces de hidrógeno y enrolladas una alrededor de la otra en una doble hélice (9).

La naturaleza de formación de enlaces de hidrógeno entre adenina y timina y entre citosina y guanina explica el concepto de apareamiento de bases específicas. Pueden formarse dos enlaces de hidrógeno entre adenina y timina y tres, entre guanina y citosina. De esta manera la cantidad de citosina debe ser igual a la cantidad de guanina, porque cada citosina de una cadena debe parearse con una guanina de la otra cadena. De manera similar, cada adenina en la primera cadena debe corresponder a una timina en la segunda cadena. Por lo tanto, las secuencias de bases en las dos cadenas son complementarias, pero no idénticas entre sí.

La determinación de los detalles estructurales de la doble hélice de ADN, su duplicación y su transcripción para formar proteínas (o cualquier otro producto) se mantiene como el gran descubrimiento de toda la biología. El ADN es la molécula principal que almacena información genética y propaga esta información a las futuras generaciones a través de la línea germinal. De este y otros hallazgos, emerge el "dogma central" de la biología moderna. Este dogma resume los procesos involucrados en mantener y traducir el patrón genético que se requiere para la vida. Los estadios esenciales de este dogma son 1) la auto-propagación del ADN por replicación

semiconservativa; 2) la transcripción unidireccional en dirección 5' a 3', usando como patrón el código genético (ADN) y generando un ARN mensajero intermediario (ARNm); 3) traducción del RNA mensajero para producir polipéptidos que consisten en series lineales de aminoácidos que son con lineales con el orden 5' a 3' del ADN. En términos simples:



2.2 ARN

El ARN, es muy similar químicamente al ADN. Al igual que este, el ARN está formado por una cadena de monómeros repetitivos llamados nucleótidos. Los nucleótidos se unen uno tras otro mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente. Cada nucleótido está formado por una molécula de monosacárido de cinco carbonos (pentosa) llamada ribosa (desoxirribosa en el ADN), un grupo fosfato, y una base nitrogenada conformadas por las mismas utilizadas por el ADN, con la excepción de la timina, que en el ARN es reemplazada por un uracilo. En concreto, las purinas del ARN son adenina y guanina; las pirimidinas son citosina y uracilo.

Existen algunos ARN, como es el caso del ARN mensajero, que se sintetizan, emplean, y degradan, mientras que otros, como el ARN ribosómico, no presentan un recambio rápido.

La principal función que se le había reconocido hasta ahora al ARN es como parte de la maquinaria de producción de proteínas. Los ARN mensajeros (ARNm) son los intermediarios en la expresión de genes, transmitiendo información entre el ADN y la maquinaria de síntesis de proteínas. Los ARN de transferencia (ARNt) son el elemento decodificador que permite traducir de un lenguaje de nucleótidos (el que tiene el ADN y el ARNm) a un lenguaje de aminoácidos (el de las proteínas), y los ARN ribosomales (ARNr) son parte de la maquinaria que produce las proteínas. Actualmente, se reconoce un nuevo grupo de ARN, conocidos como ARN de interferencia y que tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica (9).

2.3 TRANSCRIPCIÓN DEL ADN



La unidad de información fundamental de los organismos vivos es el gen. Desde el punto de vista

bioquímico, un gen se define como un segmento de ADN (o, en algunos casos, de ARN) que codifica la información requerida para sintetizar un producto biológico funcional. El producto final es normalmente una proteína, pero este no siempre es el caso. Es por esto que una definición más completa de un gen es, por tanto, una secuencia de ADN que codifica un producto final, sea una proteína o un ARN con función estructural o catalítica.

Las proteínas son los productos finales de la mayoría de las rutas de información. Una célula típica necesita miles de proteínas diferentes en cualquier instante. Estas proteínas han de ser sintetizadas en respuesta a las necesidades celulares del momento, transportadas (dirigidas) hasta la localización celular adecuada y degradadas cuando ya no son necesarias.

El proceso mediante el cual un gen es transcrito para formar un producto es conocido como “transcripción del ADN”. Este mecanismo consiste en sintetizar ARN utilizando ADN como molde; para que luego sea traducido y forme un producto. La primera parte tiene lugar en el núcleo, mientras que la traducción tiene una ocurrencia citoplasmática.

Para apreciar la importancia de la síntesis proteica, es conveniente considerar los recursos celulares dedicados a este proceso. La síntesis proteica consume hasta el 90 % de la energía química utilizada por la célula en todas las reacciones biosintéticas. Muchos factores intervienen en este proceso, como lo son: el propio ADN, factores de transcripción, la ARN polimerasa, y por supuesto, ATP.

La concentración celular de una proteína viene determinada por un equilibrio delicado de una serie de procesos. Se describen dos etapas importantes:

Primero ocurre la transcripción, (véase Figura 1) que no es más que el proceso durante el cual la información genética contenida en el DNA es copiado a un ARN de una cadena única llamado ARN-mensajero. Esta reacción es catalizada por una enzima llamada ARN-polimerasa. El proceso se inicia separándose una porción de las cadenas de DNA: una de ellas es utilizada como molde por la RNA-polimerasa para incorporar nucleótidos con bases complementarias. El ARN emergente copia del ADN inicial unas regiones que no codifican proteínas. Sin embargo, antes de que abandone el núcleo para dirigirse al citoplasma donde se encuentran los ribosomas, este ARN es procesado mediante operaciones de “corte y empalme”, generando un ARN maduro.

El ADN no solo sirve de molde para ARN-m, sino que además se obtienen “ARN de transferencia” (ARNt), que transportan aminoácidos a los ribosomas; y también “ARN ribosómico” (ARNr) que junto a las proteínas ribosómicas, forman el propio ribosoma.

En la segunda etapa, la traducción o síntesis de proteínas, el ARN-m ya maduro contiene la información para que los aminoácidos que constituyen una proteína se vayan añadiendo según la secuencia correcta. Para ello, cada triplete de nucleótidos consecutivos (codón) especifica un aminoácido. Dado que el ARN-m contiene 4 bases, el [número de combinaciones](#) posibles de grupos de 3 es de 64, número más que suficiente para codificar los 20 aminoácidos. De hecho, un aminoácido puede ser codificado por varios codones.

El proceso de traducción comienza cuando el ARN-m se une a una pequeña unidad ribosomal, la cual sirve de plataforma celular para el ensamblaje de proteínas. Cuando están adecuadamente posicionadas, el ARNm activa el acercamiento de un ARNt, quien posee el primer aminoácido. El ARNt se acoplará solo si sus tres nucleótidos encajan perfectamente con los nucleótidos codantes del ARNm. Luego, una subunidad ribosomal grande se une al grupo para formar un ribosoma funcional. Aquí se une un nuevo ARNt que encaja exactamente con los nucleótidos que siguen en la hebra. Con la ayuda del ribosoma y energía celular, los aminoácidos vecinos se van uniendo. Luego el primer aminoácido se separa de su ARNt. De esta manera, el ribosoma se mueve a lo largo de la hebra de ARNm y así va dejando expuesto el siguiente grupo de nucleótidos que encaja con otro ARNt. Con cada aminoácido, la proteína continúa creciendo y conforme va creciendo, se pliega en su forma tridimensional, crucial para su funcionamiento. Cuando el proceso está completo, las subunidades ribosomales se separan para luego acoplarse libremente de nuevo (9).

3. CROMATINA

EMPAQUETAMIENTO DEL ADN

Sin embargo, el DNA no está “desnudo” en el núcleo, sino fuertemente empaquetado formando la cromatina. Tanto la compactación del DNA (unos 2 m de DNA en un núcleo de 10 µm de diámetro) como el control de la transcripción en los eucariotas se consigue mediante la formación de complejos del DNA con proteínas específicas, las histonas, para

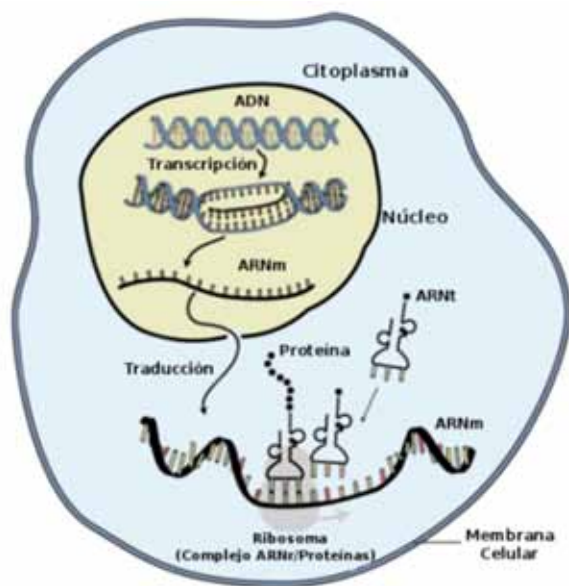


Figura 1. Proceso de transcripción del ADN y traducción de proteínas. La transcripción tiene lugar en el núcleo celular. El ADN se abre para servir de molde para la creación de un ARN mensajero. El ARNm maduro sale al citoplasma, donde ocurre la traducción del lenguaje nucleotídico para dar lugar a la formación de proteínas. Esto se logra al formarse el complejo ribosomal (ARNr) y a través de la incorporación de aminoácidos por parte del ARNt.

dar lugar a la cromatina. Esta compactación es el resultado de la superposición de diversos niveles de plegamiento altamente organizados y afecta a todas las etapas de la transcripción.

Los genes humanos están constituidos por áreas de ADN codificante o exones, y áreas de ADN no codificante o intrones; la mayor proporción del ADN en los genes corresponde a zonas de intrones. Además de exones e intrones, cada gen está asociado a una secuencia de ADN reguladora, la cual es responsable de que el gen sea expresado en el nivel adecuado, en tiempo y en el tipo de célula apropiada. El ADN humano contiene grandes zonas de elementos repetitivos (52 %) y de regiones no codificantes (44 %). Solo el 4 % del ADN humano codifica algún producto (12).

Esta gran cantidad de regiones no codificantes y de elementos repetitivos requiere de extensos mecanismos genómicos y epigenómicos de regulación, tanto en células germinales como en células somáticas sometidas continuamente a múltiples tipos de

señalamiento internos (por ejemplo la transcripción, replicación del ADN, etc.) y externos (por ejemplo citocinas, hormonas, daño del ADN, estrés celular).

Si se considera que el ADN celular está altamente compactado, entonces está implícito que debe estar sometido a un alto grado de organización estructural. Sin embargo, el plegamiento del ADN debe permitir acceder a la información contenida en el ADN en procesos como la replicación y la transcripción.

El ADN nuclear está muy plegado y compactado con las proteínas histonas y no histonas formando un polímero dinámico llamado cromatina. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma (Véase más adelante).

La cromatina no es un polímero uniforme, presenta diferentes diseños de empaquetamiento: fibras fuertemente compactadas o heterocromatina, y fibras menos compactadas, en las cuales los genes son típicamente expresados, la eucromatina.

En las células eucarióticas que no se hallan en proceso de división, este material cromosómico, es amorfo y aparece disperso y desordenado por todo el núcleo. No obstante, cuando las células se preparan para dividirse, la cromatina se condensa y se estructura en un conjunto de cromosomas bien definidos, cuyo número es una característica de cada especie.

3.1 NUCLEOSOMAS

El nucleosoma constituye la unidad estructural de la cromatina. Está compuesto por un octámero de cuatro histonas (H3, H4, H2A, H2B), las cuales son proteínas muy básicas, alrededor de las cuales se enrolla el ADN. El nucleosoma fue descrito por primera vez en 1974, por el científico americano Roger Kornberg (Figura 2).

3.1.1 HISTONAS

Las histonas están presentes en la cromatina de todas las células eucarióticas. Son proteínas con forma esférica, masas moleculares relativamente pequeñas y son muy ricas en los aminoácidos básicos arginina y lisina.

Estas proteínas son moléculas cargadas positivamente, lo cual facilita la atracción con el ADN, el cual tiene carga negativa. Hay cinco clases principales de histonas, que difieren entre sí en masa molecular y composición de aminoácidos. Las histonas H3 tienen una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica en todos los eucariotas, al igual

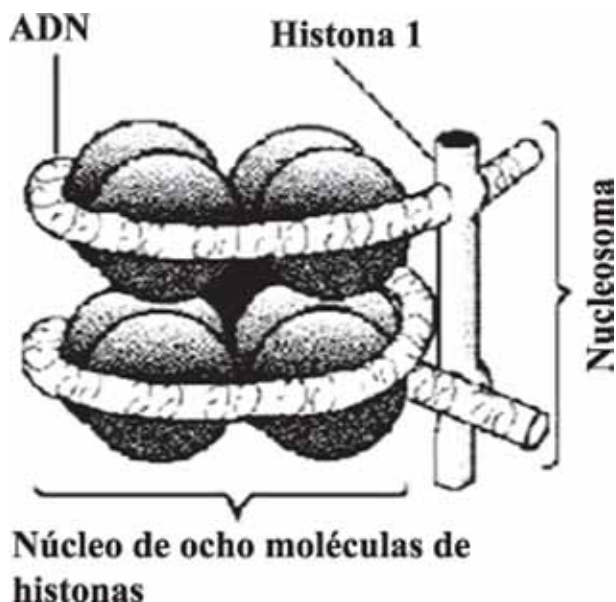


Figura 2. Nucleosoma.

que las histonas H4, lo que sugiere que sus funciones se han conservado estrictamente. Las histonas H1, H2A y H2B presenta un menor grado de similitud entre especies eucarióticas.

Las histonas se estructuran en dos dominios: una región central plegada, que interacciona con el DNA, formada por una hélice- α larga, flanqueada por dos hélices- α cortas, y un dominio N-terminal poco estructurado, de 15 a 30 residuos, denominado colas de histonas. El dominio N-terminal es flexible y sale fuera del núcleo central o "core" del nucleosoma.

Las histonas pueden ser modificadas en sus diferentes aminoácidos añadiendo o eliminando pequeños grupos químicos, como acetilos, metilos, fosfatos, o anexos proteicos mayores como ubiquitina.

Las colas de cada una de las histonas también son blanco de diferentes tipos de modificaciones covalentes por diferentes enzimas: metil transferasas, desmetilasas; acetilasas y desacetilasas; fosforilasas y fosfatasas, etc. Dentro de las histonas, las lisinas tienen carga positiva y el ADN cargado negativamente es atraído. Cuando se añade un grupo acetilo a las lisinas, se modifica la carga positiva de la lisina, provocando que la región de la cola de la histona se una débilmente al ADN, y lo deja libre para que se pueda transcribir.

El enrollamiento del ADN alrededor del núcleo proteico del nucleosoma hace que la longitud del

ADN se compacte unas siete veces. Pero el grado de compactación final del cromosoma es de unas 10 000 veces, lo cual muestra la existencia de órdenes superiores de organización estructural.

Un nucleosoma típico está asociado a 200 pares de bases (pb) de ADN, y está formado por una médula ("core") y un ligador ("linker"). La médula está formada por un octámero proteico, constituido por dos subunidades de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Alrededor de la médula, se enrolla el ADN (140 pb), y da poco menos de dos vueltas sobre esta (1,65 vueltas). El resto del ADN (60 pb) forma parte del ligador, quien interacciona con la histona H1.

Así pues, el primer nivel de empaquetamiento lo forman los nucleosomas, unidos por una secuencia espaciadora que le da flexibilidad a la estructura.

En el segundo nivel organizativo interviene la histona H1 que marca el empaquetamiento de los nucleosomas unos sobre otros (fibra de 30 nm).

Otro nivel organizativo son los cromosomas, cuyo estado de condensación varía dependiendo de su estadio funcional, y llega a su máxima compactación en metafase.

Hay pruebas de la existencia de niveles adicionales de organización de los cromosomas eucarióticos, cada uno con efecto multiplicativo sobre el grado de compactación. Ningún modelo puede describir adecuadamente estas estructuras. Sin embargo, el principio es simple: la compactación del ADN en los cromosomas eucarióticos probablemente se base en el enrollamiento de enrollamientos de enrollamientos...

La estructura cromosómica aparece cuando la célula se está dividiendo mientras que cuando los genes se van a transcribir, esa zona del cromosoma se descondensa hasta el primer nivel en el que los promotores están más accesibles.

La cromatina que es activa transcripcionalmente, se conoce como eucromatina. La que no se transcribe, es la heterocromatina. Existen dos tipos de heterocromatina: *constitutiva* y *facultativa*. La heterocromatina constitutiva corresponde a zonas que no se transcriben y se encuentran en todas las células. Estos son los centrómeros y los telómeros de todos los cromosomas, así como algunas zonas de algunos cromosomas. La heterocromatina facultativa corresponde a zonas que se transcriben según tipo y estado celular, por lo que se condensa y se descondensa según haga falta su transcripción. También es heterocromatina facultativa el cromosoma X que se encuentra inactivo en las mujeres (10).

4. MECANISMOS MOLECULARES EPIGENÉTICOS

Dependiendo de los genes que son transcritos, se verá afectado el fenotipo de una célula o de un individuo. Los estados de transcripción que presenta un genoma son estables y heredables. Existen varias capas para regular la expresión génica.

La epigenética comprende el estudio de los cambios hereditarios en las pautas de expresión génica que están mediados por mecanismos diferentes a las modificaciones de la secuencia nucleotídica primaria de un gen. Los mecanismos moleculares que median la regulación epigenética incluyen la metilación del ADN, las modificaciones de cromatina o modificación de histonas y los sistemas de interferencia, mediados por pequeñas moléculas de ARN no codificantes, también conocidos como microARNs.

Existen, por supuesto, variaciones aberrantes de estos mecanismos que regulan de manera patológica la expresión génica, dando lugar a fenotipos aberrantes, tal como es el ejemplo del cáncer.

Los mecanismos epigenéticos están íntimamente interrelacionados. Todos ellos trabajan a niveles distintos de la organización genética pero todos dan como resultado conjunto, modificaciones relevantes de la estructura cromatínica. Así pues, la modificación de una histona puede llevar a la metilación del ADN, y esta, a su vez, contribuye a mayor compactamiento del ADN sobre las histonas, y se crea así una cromatina más cerrada. Esta región será menos accesible a la maquinaria de transcripción; por lo que el gen que regulan, se silencia y no se codifica su producto.

De esta manera, ciertos mecanismos complejos, como lo son: la embriogénesis, el silenciamiento del cromosoma X inactivo en la mujer, la impronta génica, la heterocromatina constitutiva, etc., son producto de una fina comunicación de todos estos sistemas epigenéticos. Estos mecanismos complejos dan lugar a estados de la cromatina mantenidos a lo largo de la vida de un individuo.

A manera ilustrativa, comparamos los sistemas epigenéticos a un sencillo sistema de “encendido/apagado”. Cuando el gen está “apagado”, metilado, reprimido, no se transcribirá su información genética. Es interesante considerar que este proceso puede ser reversible, por lo que un gen que se encuentra apagado, puede activarse nuevamente.

La epigenética representa procesos muy dinámicos que ocurren constantemente y según las necesidades

celulares van cambiando; pero que también son lo suficientemente estables para mantener los patrones de represión génica y por ende, mantener el fenotipo celular. Por ejemplo un hepatocito es capaz de modificar constantemente sus rutas metabólicas, pero no deja de expresar el patrón que mantiene su fenotipo hepatocitario. Cuando esto sucede, y los patrones de encendido/apagado son aberrantes, la célula sufre modificaciones somáticas, claramente evidenciables en el caso del cáncer (11).

4.1 METILACIÓN DEL ADN

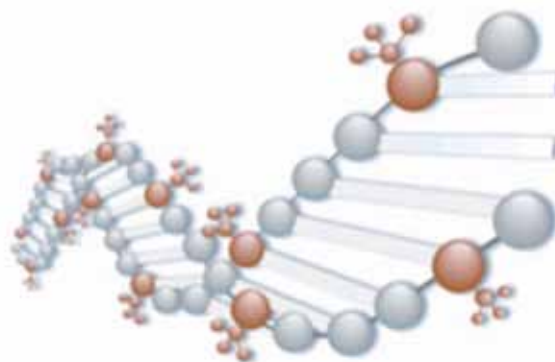


Figura 3. Metilización del ADN.

La metilación del ADN es la principal modificación epigenética del genoma y regula aspectos fundamentales de su función. Es un mecanismo normal de silenciamiento génico, con un evidente papel en la represión transcripcional. Este mecanismo es también propenso a sufrir modificaciones aberrantes de sus patrones y dar lugar a alteraciones somáticas o fenotípicas (12). (Figura 3)

La metilación del ADN no ocurre en cualquier sitio, si no que existen dianas específicas del genoma donde se cataliza esta reacción. En los seres humanos el ADN se metila únicamente en las citosinas, y más específicamente en citosinas que estén unidas a guaninas a través de un enlace fosfato, es decir, en dinucleótidos “citosina-fosfato-guanina” o CpG. La adición del grupo metilo a la citosina, da lugar al nucleótido 5-metil-citosina (5 mC), reacción que es catalizada por un grupo de enzimas conocidas como ADN metiltransferasas (DNMTs).

La mayor parte del genoma no contiene el dinucleótido CpG, sin embargo, este se concentra en las denominadas “islas CpG” situadas en las regiones reguladoras de los genes, posicionadas en el extremo 5' de muchos genes. Estudios computarizados de la secuencia del genoma humano predicen que existen alrededor de 29 000 “islas CpG” (1,2 % del genoma) (13).

La reacción de metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas e involucra la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina (14). En las células de mamíferos se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción: las ADN metiltransferasas “de mantenimiento” (DNMT1) y las metilasas “de novo” (DNMT3A y DNMT3B) (15).

Existen dos tipos de patrones de metilación, catalizados por dos grupos diferentes de enzimas:

1. Patrón “de novo”.
2. Patrón “de mantenimiento”.

La metilación “de novo”, por acción de las “DNMTs de novo”, añade grupos metilo en posiciones totalmente nuevas y cambia el patrón de metilación en una región localizada del genoma. Este sistema de metilación es particularmente activo durante el desarrollo temprano (16). Las DNMTs de novo (DNMT3A y DNMT3B) se expresan enormemente en células embrionarias, y es en esta etapa donde la mayor programación “de novo” de los patrones de metilación ocurren. Esta metilación programada durante el desarrollo está muy involucrada con la impronta genómica e inactivación del cromosoma X. La metilación “de novo” puede ocurrir en células somáticas adultas. Una significativa fracción de todas las CpG humanas son propensas a la metilación progresiva en ciertos tejidos en situaciones tales como: el envejecimiento, en células anormales como el cáncer, o en líneas celulares permanentes. Sin embargo, la velocidad con la que estos cambios ocurren parece ser muy lenta (17).

El patrón “de mantenimiento” se sustenta en el trabajo de las “DNMTs de mantenimiento”, específicamente la DNMT1, cuya función es añadir grupos metilo a cadenas de ADN en lugares opuestos a los metilados en la cadena madre, provocando que las moléculas hijas de ADN mantengan un patrón de metilación después de la división celular. Este sistema de copiado semiconservativo de una hebra parental provee una manera de pasar la información

epigenética entre generaciones celulares.

4.1.1. EXPERIMENTO: DIETA (AMBIENTE) Y METILACIÓN

“Tu ADN no es tu destino”

Un experimento interesante realizado en la Universidad de Duke en el año 2003, nos hace evidente la aproximación del silenciamiento génico por metilación. Aun más interesante, asoma la metilación del ADN como posible diana terapéutica (18).

Una década antes de que se realizara este experimento, a principios de los años 90, se descubrió que un gen, que se sabía, codificaba el color del pelaje en ratones, llamado el gen *agouti*, también estaba estrechamente relacionado con un gen humano que se expresa en casos de obesidad y diabetes tipo II. Los ratones *agouti* (que expresaban este gen) (Figura 4) además de tener un pelaje amarillo, también comían de manera exagerada, tenían una tendencia aumentada al cáncer y la diabetes; en general, tendían a morir más jóvenes. Cuando se reproducían, la cría era tan vulnerable a padecer la misma situación fenotípica.

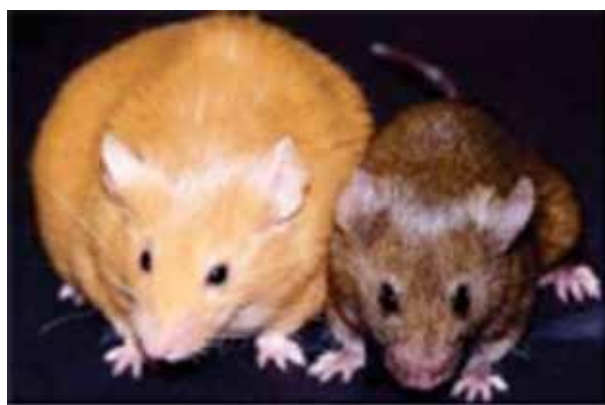


Figura 4a. Ratones *agouti*.

El doctor Randy Jirtle, profesor de radiología oncológica de la Universidad de Duke, Carolina del Norte, EE.UU publicó en el 2003 un interesantísimo estudio en la revista “*Molecular and Cellular Biology*”. Había descubierto que se podía modificar a los ratones *agouti* para producir crías normales y delgadas. Expuso la capacidad de cambiar la expresión de este gen, sin alterar de manera alguna la secuencia del ADN. Este cambio fue genialmente logrado con la sola intervención de alimentar a las madres

agouti, antes de que concibieran, con una dieta rica en “grupos metilo”.



Figura 4b. Crías normales y delgadas.

Los cambios en la pigmentación de la piel de la cría del ratón, que fluctuaron entre amarillo y marrón, estuvieron directamente vinculados con la suplementación de la dieta materna con vitamina B12, ácido fólico, colina y betaína. Demostró la estrecha relación que existe entre la metilación y la represión de un gen específico. Este experimento deja claro que el genotipo está sujeto a cambios por efectos del ambiente (en este caso la dieta) y que es posible alterar los patrones de expresión génica sin necesidad de recurrir a mutaciones.

4.2. MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE HISTONAS

El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina. Las histonas que forman la médula de esta unidad funcional, son pequeñas y altamente básicas. Están compuestas por un dominio globular y un dominio N-terminal, flexible y poco estructurado, conocido como “colas de histonas”, que protruyen fuera del nucleosoma. Ambos dominios son dianas para modificaciones químicas.

El efecto de estas modificaciones altera la naturaleza del nucleosoma de tal forma que “abre o cierra” a la cromatina para realizar la transcripción. Diferentes combinaciones específicas de modificaciones covalentes y no covalentes de las histonas, pueden leerse como un código, lo cual se conoce como hipótesis del “código de histonas”. Estas modificaciones son reguladas por grupos diferentes de enzimas que pueden añadir grupos

químicos a las histonas (marcadoras o *writers*) o remover grupos químicos (borradoras o *erasers*). Las histonas marcadas pueden ser blanco interpretativo de complejos enzimáticos (efectoras o *readers*) de activación o desactivación catalítica. Estas actividades coordinadas de escribir, leer y borrar, establecen el ambiente local óptimo para que la plantilla de la cromatina realice los procesos biológicos de regulación transcripcional o reparación del ADN dañado (19). Las colas de cada una de las histonas también son blanco de diferentes tipos de modificaciones covalentes por diferentes enzimas: metil transferasas, desmetilasas; acetilasas y desacetilasas; fosforilasas y fosfatasas, etc. Dentro de las histonas, las lisinas tienen carga positiva y el ADN cargado negativamente es atraído. Cuando se añade un grupo acetilo a las lisinas, se modifica la carga positiva de la lisina, provocando que la región de la cola de la histona se una débilmente al ADN, y lo deja libre para que se pueda transcribir (20).

Se han encontrado al menos ocho tipos de modificaciones postraduccionales en las histonas. Las “colas” de las histonas pueden sufrir acetilación, metilación, fosforilación, poliADP-ribosilación, ubiquitinación y glicosilación. La combinación de estas modificaciones, determina la interacción ADN-histona y la interacción de proteínas no histónicas con la cromatina, a través del llamado “código de las histonas”. La estructura de la cromatina y por ende, la expresión génica, se modifica por acción del “código de histonas”.

Las modificaciones de las histonas funcionan mediante dos mecanismos básicos:

1. Físicamente, interfieren en los contactos entre nucleosomas, por ejemplo para «abrir» la cromatina en el caso de la acetilación.
2. Interaccionan directamente con la maquinaria transcripcional y dan lugar a efectos traductores.

Una de las modificaciones de histonas mejor estudiadas es la acetilación. Esta reacción es catalizada por “histonas acetil-transferasas” (HATs), con ayuda de acetil-coenzima A como donante del grupo acetilo. (Figura 5).

La acetilación de histonas ocurre principalmente en los residuos de lisina de las histonas H4 y H3 y tiene básicamente, dos consecuencias biológicas: alteración de la unión “histona-ADN”, ya que la lisina pierde una carga positiva en el proceso, y alteraciones en los códigos de acoplamiento de los factores de transcripción que interactúan con la cromatina.

Así, la acetilación tiene un efecto activador de la transcripción; los nucleosomas se empaquetan menos eficientemente, permitiendo que el ADN sea más accesible a proteínas reguladoras. La deacetilación de histonas se correlaciona con compactación de la cromatina y represión transcripcional (21).

El nivel de acetilación de histonas depende del balance preciso de la acción de las HATs y de las “histonas deacetilasas” (HDACs).

Otro mecanismo bien conocido, es la metilación de histonas. Se vincula tanto a activación, como a represión transcripcional. Las “colas” de histonas pueden ser metiladas en múltiples residuos de arginina y lisina. La lisina puede ser mono, di y tri-metilada, mientras que la arginina solo puede sufrir monometilación. La metilación de histonas es catalizada por una familia de enzimas, conocidas como “histonas metil-transferasas” (HMTs) y el grupo metilo puede, a su vez, ser removido por un grupo de proteínas, recientemente identificado, conocidas como “histonas desmetilasas” (HDMs) (22).

A manera de simplificar, la acetilación de las histonas H3 y H4 se asocia generalmente a una configuración activa de la cromatina y expresión génica (eucromatina). En contraste, la metilación se

asocia más a cromatina condensada o heterocromática y represión transcripcional. Sin embargo, existen muchas excepciones a esta simple regla, y las interacciones son altamente dinámicas y complejas.

Esta gran variedad de modificaciones, y la combinación entre ellas, proporciona un enorme potencial de respuestas funcionales. Las modificaciones en histonas son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a estímulos celulares.

4.3 ARN DE INTERFERENCIA

Uno de los avances más importantes en la biología de las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de ARN que regulan la expresión de genes.

El silenciamiento por ARN es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza en el que moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA, *double stranded RNA*) regulan la expresión de genes (23).

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia. Las más ampliamente estudiados son los ARN interferentes pequeños (siRNA, *small interfering RNA*) y los microARN (miARN). (véase Figura 6).

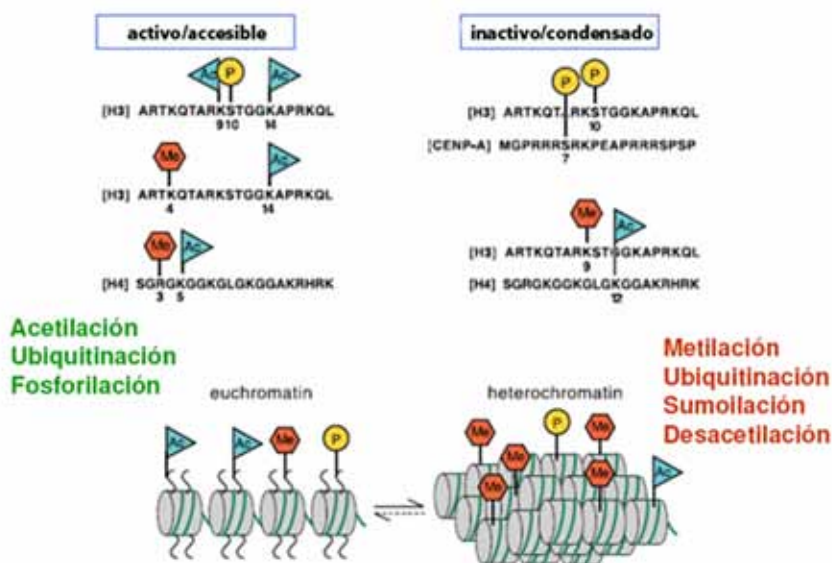


Figura 5. Código de las histonas.

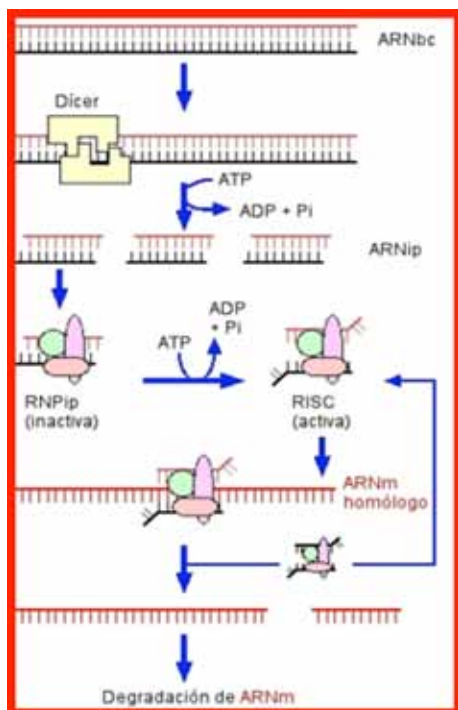


Figura 6. Degradación de ARNm.

4.3.1. ARN INTERFERENTES PEQUEÑOS (siARN)

Estas moléculas tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y son producidas a partir de precursores de ARN de doble cadena que pueden variar de tamaño y origen (Figura 6). Estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan ARN, conocidas como la familia de la RNasa tipo III. En particular, la enzima que degrada los precursores de ARNs hasta siARN se conoce como “*dicer*”. Los siARN resultantes son incorporados a un complejo denominado siRISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complejo está compuesto por numerosas proteínas celulares. La incorporación del siARN al siRISC está acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas, solo una de las cuales, conocida como cadena guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el ARNm con la secuencia complementaria.

Cuando las moléculas de ARNm complementarias son encontradas, la interacción entre el siARN y este ARNm desemboca en el corte del ARNm y su posterior degradación.

4.3.2. MICROARN

Aunque presentan mucha similitud con los siARN, los microARN son producidos por una vía de síntesis diferente (Figura 7). Los precursores de los microARN son transcritos a partir de genes celulares, tal y como se producen los ARNm. A esta primera molécula de ARN se le denomina microARN primario (primicroARN) y es procesada en el núcleo por otra enzima de la familia RNasa tipo III denominada “*drosha*”. El resultado del corte de *drosha* es una molécula de ARN de entre 70 y 100 nucleótidos con una estructura compleja. Partes de la molécula forman una estructura de doble cadena de ARN unida por una sección de cadena sencilla. A esta molécula de ARN se le llama el precursor del microARN (pre-microARN), el cual posee múltiples burbujas y una serie de *missmatches* (zonas dentro de las regiones de doble cadena que no pueden unirse entre sí). El pre-microRNA es posteriormente exportado del núcleo al citoplasma. Ya en el citoplasma, el pre-microRNA es cortado hasta adquirir la estructura del microRNA maduro; es decir, una molécula de dsARN lineal de entre 21 y 24 nucleótidos. Este último procesamiento es realizado, al igual que en el caso de los siARN, por *dicer*. Los microARN maduros se incorporan a un complejo ribonucleoproteínico (miRNP o miRISC) que es similar, y posiblemente idéntico, al siRISC. Una vez que estas moléculas de ARN se encuentran ensambladas en el miRISC, el complejo dirige el silenciamiento genético.

Una diferencia importante entre la vía de los siARN y los microARN es el mecanismo por el cual estas moléculas silencian la expresión de los genes. En general, los microARN reprimen la expresión genética bloqueando la traducción de los ARNm, esto es, evitando la síntesis de proteínas; en este caso el ARNm no es degradado, pero ya no se puede utilizar para fabricar proteínas. Otra diferencia importante radica en el hecho que el apareamiento entre el blanco y el microARN no es perfecto (24).

El mecanismo de interferencia está presente en todos los eucariotes. Esto sugiere que es un mecanismo muy antiguo que apareció temprano en la evolución y que tiene un papel importante en el mantenimiento del funcionamiento celular. Una de las ideas más aceptadas que explican su persistencia es que funciona como un sistema inmune a nivel celular. Es decir, que le permite a la célula distinguir información genética que le es propia, de la que no lo es, la cual actuaría como un parásito molecular, aprovechando la maquinaria celular para reproducirse

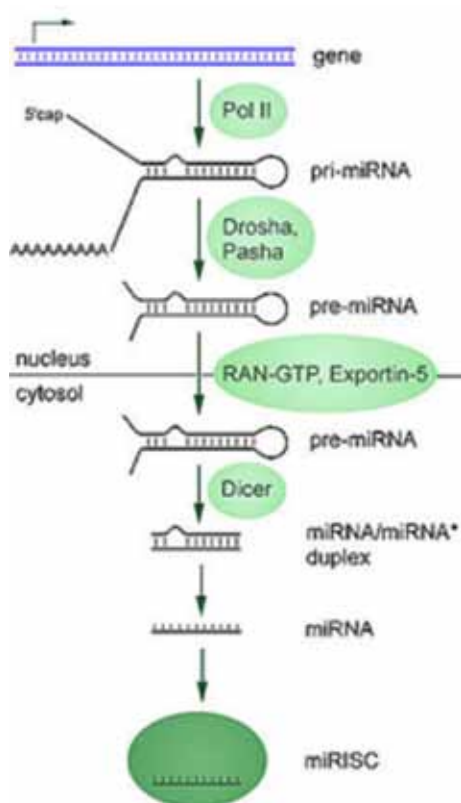


Figura 7. Síntesis de los micro ARN.

y causar daño a la célula.

4.4. IMPRONTA GENÓMICA

Los seres humanos son, desde el punto de vista genético, organismos diploides. Es decir, que sus células somáticas tienen dos copias del genoma, o lo que es igual, poseen dos series de cromosomas. De esta manera, los organismos diploides presentan dos alelos para cada gen. Esto es contrario en los gametos o células sexuales, las cuales presentan solo una serie de cromosomas y se dice que son células haploides. Las células humanas contienen 46 cromosomas, de los cuales 23 de ellos provienen del gameto femenino (materno) y los otros 23 cromosomas provienen del gameto masculino (paterno).

La impronta genómica se ha definido como el marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental. La impronta afecta la expresión de algunos genes (0,1 %-1 %),

pero no de todos los genes y los genes improntados se caracterizan por la expresión de solo uno de sus alelos. Así, los dos genomas parentales presentan asimetría funcional, debida a la presencia de genes improntados que se expresan de manera mono-alélica. Así, las células normales presentan una copia activa y una copia reprimida para un mismo gen (25).

La impronta se asocia a modificaciones epigenéticas del ADN y alteraciones de la estructura cromatínica que ocurren durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario, originando un estado funcionalmente haploide del genoma improntado. Se han identificado alrededor de 100 genes improntados en los seres humanos, la mayoría en agrupamientos ("racimos") localizados en determinadas regiones cromosómicas. Estos genes tienen funciones relacionadas fundamentalmente con la regulación del crecimiento y desarrollo y con la conducta.

Hay muchas evidencias sobre la existencia de impronta a nivel del genoma, originalmente obtenidas mediante experimentos de trasplante pronuclear en huevos enucleados de ratones. Si se fusionan dos pronúcleos paternos (androgénicos) producen una placenta normal con un embrión infradesarrollado (el equivalente a la mola hidatidiforme en patología humana), mientras que dos pronúcleos maternos (ginogénicos) originan un embrión sobre desarrollado con una placenta y membranas aberrantes (teratoma en humanos). Estos experimentos llevaron a la hipótesis que el desarrollo embrionario requiere de la expresión de genes improntados del genoma materno, mientras que los genes improntados del genoma paterno son requeridos para el desarrollo extraembrionario. Solo los embriones reconstituídos de un pronúcleo materno y un pronúcleo paterno produjeron una descendencia viable y fértil. (Figura 8).



Figura 8. Embriones reconstituídos.

La regulación epigenética de la transcripción que ocurre en la impronta genómica, involucra un complejo reordenamiento en la estructura de la cromatina, debido principalmente a la metilación del ADN, lo cual es importante tanto en la regulación y el control de la replicación, como en la expresión génica de las células eucarióticas. En los gametos masculino y femenino, la metilación del ADN desaparece en las células germinales primordiales, después de la fecundación y durante el desarrollo embrionario, para restablecerse nuevamente durante la gametogénesis.

La metilación del ADN está involucrada en el mecanismo de impronta genómica. Los genes improntados suelen tener “islas CpG” en sus regiones promotoras. Las “islas CpG” que se encuentran hipermetiladas en uno de los dos alelos parentales y desmetilados en el otro se conoce como “regiones con metilación diferencial” (DMR, *differentially methylated region*). Esta metilación diferencial puede servir como una marca epigenética que permite la distinción de cada uno de los cromosomas homólogos (26).

El papel de la metilación del ADN en la impronta genómica fue establecido mediante el estudio de embriones que carecían de la enzima encargada del mantenimiento de la metilación, la ADN-metiltransferasa 1 (DNMT1). En estos animales, la expresión monoalélica se perdía, y muchos de los alelos silenciados se activaban, consecuentemente se generaba una expresión bialélica. Sin embargo, en los mutantes para DNMT1, otros genes improntados se silenciaban. Esto sugiere que la metilación del ADN es requerida para la actividad de ciertos genes. De esta manera, en lo que a la impronta genómica se refiere, la metilación del ADN puede asociarse tanto con silenciamiento como con actividad de los alelos improntados.

Un tema de interés clínico que reviste la importancia de la impronta genómica, son las técnicas de reproducción asistida. Aunque no se puede poner en duda el éxito de estas técnicas para conseguir la concepción en parejas con problemas de fertilidad, existen cada vez más evidencias que indican que estas técnicas suponen un riesgo significativamente elevado con respecto a las concepciones naturales de presentación de anomalías fetales, que incluyen retraso de crecimiento y desarrollo, malformaciones, así como alteraciones cromosómicas y afectación de la impronta genómica. Hay diversas causas posibles para explicar el riesgo aumentado de defectos fetales tras técnicas de reproducción asistida (27).

En primer lugar, las propias causas de la infertilidad o subfertilidad en los padres pueden ya asociarse a un mayor riesgo de anomalías genéticas o cromosómicas transmisibles.

En segundo lugar, los embarazos generados por técnicas de reproducción asistida difieren de los embarazos espontáneos en que los gametos y embriones se cultivan *in vitro* con medios de cultivo artificiales, se transfiere a la cavidad uterina más de un embrión, y el momento de dicha transferencia no es igual al que ocurre en condiciones normales. Es pues posible que la manipulación del embrión modifique la concurrente reprogramación epigenética de la expresión génica, lo que podría alterar la impronta e inducir cambios en el crecimiento y desarrollo fetal. Hay diversas observaciones recientes que sugieren una asociación entre técnicas de reproducción asistida y errores epigenéticos, obtenidas desde registros de niños con síndromes de Beckwith-Wiedemann, Angelman y retinoblastoma. Aunque todavía no se han realizado estudios epidemiológicos controlados, los datos indican un riesgo de cuatro a seis veces superior para cada una de las patologías citadas en las concepciones realizadas por esta técnica.

En tercer lugar, el ambiente materno, con la hiperestimulación ovárica al inicio de la gestación, podría alterar la respuesta materna a las fases tempranas de la invasión trofoblástica. Hay datos que sugieren que el peso de las placetas y el cociente peso placentario / peso fetal están elevados en estos embarazos similar a lo que ocurre en los casos de malnutrición materna en fases precoces del embarazo.

Se necesita avanzar más en el conocimiento de los mecanismos epigenéticos asociados con las etapas precoces de la embriogénesis, específicamente la metilación y la modificación de la cromatina como coordinadores de la expresión de genes improntados estrechamente ligados, así como de los factores externos que pueden alterar esa coordinación y sus consecuencias. La preocupación sobre los efectos potencialmente nocivos incluso transgeneracionales con algunos procedimientos médicos a través de modificaciones de la impronta está justificada y hay una llamada de atención internacional con propuestas de realización de estudios para evaluar esa posibilidad. Por ahora, se debe ser cauto, manteniendo el debate y potenciando la investigación sobre las tecnologías de reproducción asistida y la clonación (28).

4.5 CÁNCER

El cáncer puede definirse de diversas maneras, esto dependerá del área desde la cual la enfermedad sea estudiada. Se sabe que engloba a un grupo de aproximadamente cien enfermedades diferentes. Todas estas se caracterizan por un crecimiento celular anormal, que por lo general llevan a una proliferación descontrolada que, en algunos casos, puede metastizar a otros órganos o tejidos.

Durante las últimas décadas, los investigadores se han dedicado a identificar la serie de cambios genómicos (amplificaciones, traslocaciones, deleciones y mutaciones puntuales) involucrados en la proliferación celular descontrolada, y por ende en el desarrollo del cáncer. El análisis de estas alteraciones genómicas ha llevado a la identificación de “oncogenes” y “genes supresores de tumores” que se sabe están involucrados en el desarrollo del tumor. Un oncogén es un gen anormal o activado que procede de la mutación o activación de un gen normal llamado protooncogén.

Los oncogenes son los responsables de la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer. En el hombre se han identificado y secuenciado más de sesenta oncogenes en los diferentes cromosomas del genoma, formando un conjunto muy heterogéneo de genes.

Un gen supresor tumoral es un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y normalmente inhiben la proliferación celular excesiva. Una mutación o una deleción de un gen supresor tumoral, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor, al perder su función. De esa manera, un gen supresor tumoral alterado es similar a un oncogén.

Sin embargo, la ocurrencia del cáncer no se debe únicamente a estos cambios genéticos, sino también a cambios epigenéticos. Mientras que la genética se interesa en la información transmitida basada en la secuencia del ADN, la epigenética se ocupa de la herencia de la información basada en los niveles de expresión génica (29).

Actualmente podemos definir el cáncer como una enfermedad poligenética y poliepigenética; que repercute esencialmente, en la expresión génica. La compleja red que controla la homeostasis en organismos multicelulares sufre trastornos que

permiten a las células crecer sin referencia alguna a las necesidades del organismo.

Durante el proceso de carcinogénesis, los genes pueden ser activados de manera que favorecen la división celular o previenen la muerte celular, como es el caso de los “oncogenes”; o, alternativamente pueden inactivarse y no ser capaces de frenar estos procesos, como sucede con la inactivación de los “genes supresores de tumores”. La disregulación de la acción de estas dos clases de genes resulta en la formación del cáncer.

Los genes pueden inactivarse por, al menos, tres mecanismos que incluyen:

1. Mutación, por lo que la función del gen se ve inhabilitada.
2. Deleción, el gen puede perderse por completo y no estar disponible para funcionar.
3. Modificación de la actividad del gen que, sin haber sido mutado o eliminado, su expresión puede aumentar, disminuir o incluso, “silenciarse” de manera hereditaria por cambios epigenéticos.

En la actualidad, los mecanismos moleculares utilizados para mantener estados de “silenciación” génica, están bien dilucidados y se han explicado anteriormente en este trabajo. De esta manera, se sabe que la silenciamiento epigenético tiene implicaciones profundas en la prevención, detección precoz y terapéutica del cáncer.

A pesar de los avances en el entendimiento de las lesiones moleculares de las vías de control que contribuyen al cáncer, el examen histológico de la estructura nuclear, realizado por el patólogo, sigue siendo el “gold-standard” de los métodos para diagnosticar el cáncer. El ojo humano puede discernir con exactitud, cambios en la arquitectura nuclear, que tiene mucho que ver con los estados de configuración de la cromatina. Entre los parámetros utilizados por los patólogos para el diagnóstico de cáncer están: tamaño del núcleo, contorno nuclear, condensación de la membrana nuclear, nucleólos prominentes, cromatina densa “hipercromática” y una relación núcleo/citoplasma elevada. Estos rasgos estructurales, visibles al microscopio óptico, se relacionan enormemente con alteraciones profundas en la función de la cromatina y los cambios resultantes en los estados de expresión génica y/o estabilidad cromosómica.

4.5.1 METILACIÓN ABERRANTE DEL ADN EN CÁNCER

El descubrimiento inicial de que el ADN contiene 5-metil-citosina, además de las cuatro bases ya conocidas, llevó a la propuesta de que alteraciones de la metilación del ADN puede contribuir a la oncogénesis.

Los patrones de metilación cambian sustancialmente cuando las células se vuelven cancerosas, como resultado de dos grandes fenómenos:

- Hipometilación global del genoma tumoral.
- Hipermetilación intensa en regiones promotoras de “genes supresores de tumores”.

4.5.1.1 HIPOMETILACIÓN GLOBAL

El cambio más prominente y que más tempranamente se reconoció, en los cambios de los patrones de metilación en células tumorales, es la disminución universal de esta modificación, la cual contribuye a inestabilidad genómica.

Actualmente se sabe que el genoma tumoral pierde de 20 %-60 % de su contenido de 5-metil-citosina en comparación al tejido normal. La pérdida de grupos metilos ocurre principalmente por hipometilación tanto de las regiones codificadoras como de los intrones de los genes y desmetilación de las secuencias repetitivas que constituyen alrededor del 20 %-30 % del genoma humano.

La hipometilación es un evento que ocurre tempranamente en el desarrollo del cáncer y continúa acumulándose a través de todos los estados de tumorigenesis, desde la proliferación benigna hasta el cáncer invasivo. Se ha correlacionado el grado de disminución de 5-metil-citosina con el grado de agresividad del tumor (30).

A pesar de que la “desmetilación” de genes específicos ocurre en el contexto de una hipometilación global del ADN, se piensa que muchos de los efectos surgen por la activación de elementos transposables y retrovirus endógenos presentes en el genoma humano y por pérdida de la impronta. Estos efectos permiten mutaciones genómicas y recombinaciones cromosómicas aberrantes. Adicionalmente, la hipometilación de regiones centroméricas es muy común en tumores humanos y puede jugar un papel en la aneuploidía, que frecuentemente presentan las células cancerosas (31).

4.5.1.2 HIPERMETILACIÓN FOCAL DE

REGIONES PROMOTORAS

El evento epigenético relacionado al cáncer mejor estudiado es probablemente la hipermetilación de las islas CpG asociadas a las regiones promotoras de genes supresores de tumores. Una región promotora es una secuencia de ADN que facilita la transcripción de un gen específico.

Estos promotores, generalmente, se encuentran cerca del gen que regulan y están invariablemente desmetilados en tejidos sanos, pero pueden hipermetilarse con la consecuente silenciación génica. Actualmente, esta hipermetilación focal es considerada un paso crítico hacia la formación tumoral.

La presencia de hipermetilación en las islas CpG de regiones promotoras afecta genes que regulan casi todas las funciones celulares, tales como ciclo celular, interacción célula-célula e invasión, apoptosis, metabolismo carcinógeno, respuesta hormonal, entre otros; todos ellos implicados en el desarrollo tumoral.

La lista de genes asociados a cáncer que se ven afectados por este mecanismo de disrupción génica crece de manera estable. De hecho, esta marca epigenética comienza a exceder en número a aquellos genes que se encuentran mutados en tumores humanos (32).

Los distintos tipos de cáncer presentan alteraciones epigenéticas específicas: inactivación de genes supresores tumorales, translocaciones cromosómicas que afectan a modificadores de histonas, pérdida de impronta génica.

Los genes particulares que se encuentran hipermetilados en células tumorales son bastante específicos del tejido que las origina (33). Se han definido perfiles específicos de hipermetilación de genes en distintos tumores o “metilomas”. Estas firmas de metilación diferencial pueden servir para diferenciar entre tumores del mismo tipo. Los patrones de metilación del DNA asociados con el desarrollo y progresión de tumores tienen un uso potencial en clínica. Hay marcadores de DNA hipermetilado que se están investigando como herramientas complementarias de diagnóstico, como factores pronóstico y predictores de la respuesta al tratamiento. Así, la detección de islas CpG hipermetiladas en fluidos biológicos y suero se pueden utilizar para el diagnóstico precoz en cáncer o para el posterior seguimiento. La hipermetilación de genes específicos y los perfiles del metiloma global del DNA se pueden aplicar al pronóstico una vez detectado el tumor, y

la hipermetilación de islas CpG, como predictor de la respuesta a quimioterapia y hormonoterapia (34).

4.5.2 ALTERACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE HISTONAS

Una de las rutas epigenéticas más importantes en la generación del cáncer, involucra el patrón aberrante de modificación de histonas en los promotores génicos.

Las modificaciones postraduccionales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, entre otros) son “leídas” por diferentes proteínas y complejos involucrados en la remodelación de la cromatina y activación o represión transcripcional, lo que se definió anteriormente como “código de las histonas” (35).

Una de las modificaciones de histonas más estudiada a nivel de las regiones promotoras es la acetilación de residuos de lisina. Esta modificación exige el balance entre las enzimas “histonas acetiltransferasas” (HATs) y las “histonas desacetilasas” (HDACs). En general, la presencia de lisinas acetiladas en las “colas de histonas” se asocia a una cromatina menos condensada y un estado transcripcional más activo. Por el contrario, los residuos desacetilados se asocian a hetercromatina y silenciamiento génico transcripcional.

Como hemos explicado anteriormente, las células tumorales tienen patrones de expresión génica patológicos. Además de la hipermetilación focal del ADN en las regiones promotoras, el silenciamiento génico puede ocurrir también por alteración de los patrones de funcionamiento de las “histonas desacetilasas” en las regiones promotoras, lo que lleva a hipoacetilación de las histonas y represión de la cromatina.

4.5.3 SILENCIAMIENTO POR ARN DE INTERFERENCIA

En años recientes, se ha puesto empeño en comprender el papel que juegan los microARNs en el desarrollo del cáncer. Estos ARNs pequeños son moléculas de ARN cortas y no-codificantes que funcionan como reguladores transcripcionales de la expresión génica. Los miARNs regulan genes, incluyendo aquellos que regulan funciones celulares importantes (proliferación celular, diferenciación y apoptosis) (36). Por esta razón, la desregulación de la expresión de miARNs puede considerarse un evento importante en el desarrollo del cáncer.

Se ha descubierto que los perfiles de expresión de

miARN difieren substancialmente entre tejidos sanos y aquellos derivados de tumores, e incluso difieren entre diferentes tipos de tumor. Algunos de estos estudios demuestran que la “regulación negativa” (*down-regulation*) de estos miARNs es un evento común en el cáncer y sugieren que alguno de ellos pueden actuar como genes supresores tumorales putativos (37).

5. EPIGENÉTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

5.1 DETECCIÓN DEL CÁNCER POR METILACIÓN DEL ADN

El conocimiento acerca de las alteraciones moleculares asociadas al proceso de tumorigénesis ha dado lugar al desarrollo de nuevas estrategias para establecer los estados de riesgo que presenta el cáncer, su detección aun más precoz y monitorización del pronóstico.

La detección de hipermetilación de los “islas CpG” de las regiones promotoras es una de las aproximaciones más prometedoras en este aspecto. Se sabe que los cambios en los patrones de metilación del ADN ocurren tempranamente en el proceso tumoral y por ende, con potencial como indicador de enfermedad existente, e incluso del riesgo de padecer la enfermedad en un futuro.

El uso de las modificaciones epigenéticas y en particular, la metilación del ADN en la práctica clínica requiere del uso de medios rápidos, sencillos y sensibles para la detección de la hipermetilación de las “islas CpG” de los genes supresores tumorales.

Los tumores humanos muestran perfiles específicos de hipermetilación de genes supresores tumorales. Esto significa que por lo general, uno o más genes se encuentran hipermetilados en cada tipo de tumor. El perfil de hipermetilación de promotores difiere para cada tipo de tumor y provee, entonces, grupos de genes que se encuentran específicamente silenciados en cada variedad de cáncer.

Una vez que los perfiles específicos de hipermetilación de promotores para cada tipo de tumor estén bien definidos, los marcadores de metilación del ADN pueden ser de utilidad en la práctica clínica para detección neoplásica, identificación de la conducta del tumor, predicción sobre la respuesta al tratamiento y terapias cuyas dianas son los genes supresores tumorales hipermetilados.

La emergencia de una nueva tecnología que se basa en la modificación del ADN por bisulfito ha

hecho una aproximación simple para detectar citosinas metiladas en el genoma.

Uno de estos métodos depende de la reacción del bisulfito sódico con las citosinas que no se encuentran metiladas de una monohebra de ADN, las cuales en un medio acuoso dan lugar a un uracilo. Por el contrario, las citosinas que sí están metiladas no reaccionan con el bisulfito y permanecen como 5-metilcitosinas. El producto de esta reacción se somete a amplificación por PCR específica para metilación (MSP, *Methylation-specific PCR*) (38).

Otros métodos incluyen técnicas basadas en PCR en “tiempo real”, tal como es el caso de “Methylight” (39). Esta tecnología utiliza una sonda fluorescente que se une selectivamente a los ADN metilados. Esta técnica puede detectar un alelo metilado en un trasfondo de alrededor de 1 000 a 10 000 alelos. De esta manera, un patrón de metilación aberrante puede ser fácilmente detectado.

Adicionalmente, la utilización de estos métodos para detectar metilación del ADN en pequeñas cantidades de ADN permite la detección de hipermetilación en fluidos biológicos.

El uso de marcadores de metilación de ADN en el diagnóstico del cáncer tiene algunas ventajas sobre los marcadores genéticos (39):

Primero, las mutaciones ocurren en múltiples sitios y pueden ser de diferentes tipos, mientras que la hipermetilación de promotores ocurre dentro de la misma región de un gen dado en cada forma de cáncer. Segundo, la modificación por bisulfito del ADN ligada a MSP, permite la detección de hipermetilación del ADN en un fondo de células sanas y haciendo uso de pequeñas cantidades de ADN, mientras que cantidades mayores de ADN son necesarias para detectar mutaciones. Actualmente, la hipermetilación del ADN está siendo utilizado como una herramienta para detectar células cancerosas en todo tipo de biopsias y fluidos biológicos, incluidos lavado broncoalveolar, nódulos linfáticos, esputo, orina, semen, lavado ductal, saliva, sangre y heces.

Otro aspecto interesante es que la silenciamiento de genes supresores tumorales asociada a hipermetilación aberrante de islas CpG, se encuentra frecuentemente en estadios tempranos de la progresión tumoral y está presente en lesiones pre-malignas. Así, la metilación del ADN es un evento epigenético presente en lesiones premalignas o precursoras que pudieran ser muy útiles para la detección precoz del cáncer.

5.2 TERAPIA EPIGENÉTICA

La inactivación heredable de genes relacionados al cáncer por alteración de la metilación del ADN y modificación de la cromatina ha llevado a la conclusión de que la cromatina silenciada puede representar una diana terapéutica viable. Así, una nueva aproximación terapéutica, la “terapia epigenética” se ha desarrollado, donde drogas capaces de modificar la cromatina o la metilación del ADN están siendo utilizadas solas o combinadas para intervenir en los desenlaces terapéuticos.

Los análogos de nucleósidos, 5-azacitidina (Vidaza), 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabine) y la zebularina son inhibidores de la metilación del ADN y constituyen poderosos agentes hipometilantes que inhiben la proliferación celular (40).

Estas drogas son incorporadas al ADN de células en replicación, luego de ser metabolizadas para formar un deoxinucleósido trifosfato. Una vez incorporadas al ADN, interactúan con las DNMTs (ADN metiltransferasas) para dar lugar a intermediarios covalentes, lo cual finalmente, inhibe la metilación del ADN en las sucesivas síntesis de ADN.

La reversión de la metilación del ADN aberrante con agentes con actividad hipometilante resulta no solo en reactivación de la expresión génica sino también en actividad clínica anticancerosa, en particular en leucemias y síndromes mielodisplásicos (SMD). Consecuentemente, vidaza y decitabine han sido aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de estas enfermedades. La zebularina, también un inhibidor de la metilación, se encuentra todavía en estadios más tempranos de desarrollo clínico.

Otros ensayos clínicos están puestos en marcha para la utilización de inhibidores de las HDACs o desacetilasas de histonas. Algunas de estas, tales como el ácido fenilbutírico o el ácido valproico han sido utilizadas en la práctica clínica para el tratamiento de otras condiciones. Estas drogas inhiben a todas las desacetilasas y aún no está claro si su eficacia en el tratamiento de ciertas malignidades es debida a la inhibición de la desacetilación de histonas o por algún otro mecanismo.

De esta manera, exponemos de manera breve, el potencial del estudio de la epigenética en la aplicación clínica. El campo de la epigenética es uno con un futuro arrollador para el entendimiento del comportamiento de numerosas patologías, su detección precoz y su consecuente tratamiento.

CONSIDERACIONES FINALES

- La epigenética tiene la capacidad de cambiar la expresión de los genes, sin producir cambios en la secuencia del ADN.
- Propone la importancia de la interacción entre el genoma y el ambiente. El vínculo íntimo entre el ambiente y el genoma debe ser objeto de futuros estudios.
- El papel de los factores nutricionales ha sido documentado de manera experimental (gen agouti). Los cambios en la dieta conducen a cambios en el fenotipo.
- Se reconoce el papel central de la estructura cromatínica (nucleosoma) y sus diferentes grados de compactación (eucromatina, heterocromatina) en la expresión génica.
- Los mecanismos epigenéticos fundamentales de represión o activación de los genes son:
 1. Patrones de metilación del ADN
 2. Modificación de las histonas
 3. Sistemas de ARN interferente.
- Estos mecanismos se interrelacionan para dar lugar a procesos epigenéticos más complejos, como es el caso del desarrollo embrionario, impronta genómica y desarrollo de patologías.
- En el cáncer, se han reconocido patrones aberrantes de los sistemas epigenéticos, con mayor relevancia los cambios de patrones de metilación:
 1. hipometilación global del genoma tumoral con
 2. hipermetilación focal de genes supresores tumorales
- Estos cambios son evidentes histológicamente por alteraciones de la arquitectura nuclear y constituyen la base de los criterios utilizados para el diagnóstico histológico.
- El cáncer lo podemos definir actualmente, como una disregulación genética y epigenética, de carácter hereditario, que conduce a una modificación aberrante del fenotipo celular.
- La epigenética molecular ofrece aplicaciones importantes en el diagnóstico precoz del cáncer y otras patologías y su pronóstico.
- Abre las puertas a posibilidades terapéuticas futuras.

REFERENCIAS

1. Lamarck JB P. Zoological philosophy. Chicago: Chicago Press; 1809.
2. Darwin Ch. El origen de las especies. Madrid: Editorial EDAF; 1985.
3. Baldwin J A M. A new factor in evolution. American Naturalist. EE.UU. 1896:30-44.
4. Kirschner M, Gerhart J. The plausibility of life: Resolving Darwin's dilemma. Yale University Press, New Haven, CT, 2005.
5. Waddington C H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters, Nature. 1942;150:563-565.
6. Kato T, Iwayama Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K. Gene expression and association analyses of lym in bipolar disorder and schizophrenia. Mol Psychiatry. 2005;10(11):1045-1055.
7. Kato T, Iwamoto K, Kakiuchi C, Kuratomi G, Okasaki Y. Genetic or epigenetic difference causing discordance between monozygotic twins as a clue to molecular basis of mental disorders. Molecular Psychiatry. 2005;10(7):622-630.
8. Fraga M, Ballestar E, Paz M, Ropero S, Setien. Epigenetic differences arise during lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(30):10604-10609.
9. Herráez Á., Luque J. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid: Harcourt; 2000.p.31-36.
10. Nelson DL, Cox MM. Lehninger, Principios de Bioquímica. 3ª edición. Barcelona: Omega. 2001. 2001.p.907-910.
11. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical application. CMAJ, Londres, UK; 2006;174:341-348.
12. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. Nat Rev Genet. 2000;1:11-19.
13. Esteller M. Epigenetics in biology and medicine. CRC Press. EE.UU: 2009.p.4.
14. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. Annu Rev Biochem. 1983;52:93-124.
15. Bestor TH. The DNA methyltransferases in mammals. Hum Mol Genet. 2000;9:2395-2402.
16. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. Genes Dev. 1992;6:705-714.
17. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16:6-21.

18. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: Targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5293-5300.
19. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.
20. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med.* 2007;13:363-372.
21. Jenuwein T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 2006;273:3121-3135.
22. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129:823-837.
23. He L, Hannon GJ. MicroRNA: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5:522-523.
24. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell.* 2004;116:281-297.
25. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2001;2:21-32.
26. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol.* 2001;195:97-110.
27. Maher ER, Afnan M, Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod.* 2003;18(12):2508-2511.
28. Maher ER. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet.* 2005;14 Spec No 1:R133-8.
29. Lotem J, Sachs L. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene.* 2006;25:7663-7672.
30. Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. En: Melanie Ehrlich, editora. *DNA alterations in cancer: Genetic and epigenetics changes.* Eaton, Natick, 2000.p.273-291.
31. Whitelaw E, Martin DI. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variations in mammals. *Nat Genet.* 2001;27:361-365.
32. Esteller M. Epigenetic gene silencing cancer: The DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet.* 2007;16(1):R50-R59.
33. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile in human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3225-3229.
34. Laird PW. Oncogenic mechanism mediated by DNA methylation. *Mol Med Today.* 1997;3:223-229.
35. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell.* 2002;111:285-291.
36. Miska EA. How Micro RNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet.* 2005;5:563-568.
37. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:857-866.
38. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9821-9826.
39. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: A profile of methods and applications. *Biotechniques.* 2002;632:636-649.
40. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457-463.