

Trabajo Fin de Máster en Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida



**¿AFECTAN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN
ASISTIDA A LA HERENCIA EPIGENÉTICA, Y LA
HERENCIA EPIGENÉTICA A LA FERTILIDAD?:
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



ALUMNA: MIRIAM GUZMÁN ALMANSA
TUTORA: BEATRIZ AMOROCHO LLANOS
ALCOBENDAS, 2021/2022

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 METILACIÓN DEL DNA	5
2.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS	6
2.3 RNAs NO CODIFICANTES (NON-CODING RIBONUCLEIC ACID; ncRNA)	7
2.4 HERENCIA EPIGENÉTICA	8
2.5 REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN EMBRIONES.....	8
2.6 REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES (PGCS).....	11
2.7 ENFERMEDADES EPIGENÉTICAS	12
2.8 TRASTORNOS POR ANOMALÍAS EN LA IMPRONTA GENÓMICA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA QUE SE ASOCIAN CON ANOMALÍAS EPIGENÉTICAS	15
5.1.1 FECUNDACIÓN IN VITRO Y CULTIVO EMBRIONARIO	16
5.1.2 INYECCIÓN INTRACITOMPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (<i>INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES; ICSI</i>)	18
5.1.3 CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES	19
5.1.4 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (<i>DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL; DGP</i>) Y ECLOSIÓN ASISTIDA.....	20
5.2 TRASTORNOS DE IMPRONTA Y TRA.....	22
5.3 EPIGENÉTICA EN LA INFERTILIDAD MASCULINA.....	23
5.3.1 PERFIL EPIGENÉTICO EN LOS ESPERMATOZOIDES NORMALES	23
5.3.2 MODIFICACIONES DE HISTONAS	24
5.3.3. METILACIÓN DEL DNA	25
5.3.4 RNA NO CODIFICANTE	25
5.3.5 MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES ABERRANTES.....	25
5.3.6 FACTORES EXTERNOS Y VARIACIONES DEL DNA ESPERMÁTICO EN HUMANOS.....	27
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN/ABSTRACT

En los últimos años son numerosos los estudios que han reportado un aumento de trastornos de impronta en niños concebidos mediante técnicas de reproducción asistida. La epigenética se define como “alteraciones químicas de los nucleótidos o proteínas del DNA que controlan la expresión génica pero no alteran la secuencia del DNA”. Los patrones epigenéticos se reprograman en un estadio temprano del embrión y luego se vuelven a establecer, pero existen ciertos genes, llamados genes de impronta, que no lo hacen. La impronta genómica es un fenómeno en el cual se expresa únicamente una copia de un gen, ya sea materno o paterno, mientras que la otra copia se mantiene silenciada. Una alteración en el control de la epigenética y en la expresión de los genes de impronta puede causar trastornos graves en las personas que lo padecen. El objetivo de esta revisión ha sido realizar una búsqueda bibliográfica por las diferentes bases de datos para conocer si las técnicas de reproducción alteran los patrones epigenéticos y si las anomalías epigenéticas afectan en la fertilidad y a la descendencia. En varios estudios se ha asociado distintas técnicas de reproducción asistida (fecundación in vitro, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, etc) con un aumento en la frecuencia de aparición de trastornos epigenéticos y de impronta, aunque no se puede concluir con certeza que estos errores se deban a las técnicas de reproducción asistida y no a las alteraciones epigenéticas de los progenitores. En hombres infértiles se ha observado una asociación entre la infertilidad y las modificaciones epigenéticas. En esta revisión se plantea la necesidad de aumentar el número de estudios epidemiológicos y de metilación global del genoma para evaluar las implicaciones de las TRA en la salud.

Palabras clave: técnicas de reproducción asistida, trastornos de impronta, epigenética.

ABSTRACT

In recent years, numerous studies have reported an increase in imprinting disorders in children conceived by assisted reproductive technology. Epigenetics is defined as "chemical modifications of DNA nucleotides or proteins that control gene expression but do not alter the DNA sequence". Epigenetic patterns are early reprogrammed in the embryo and then are reestablished, but there are certain genes, called imprinting genes, that don't do it. Genomic imprinting is a phenomenon in which only one copy of a gene, either maternal or paternal, is expressed, while the other copy is silenced. An alteration in epigenetics control and in the expression of imprinting genes can induce serious disorders in people who suffer it. The aim of this project is to conduct a bibliographic revision in order to know if reproductive technology alter epigenetic patterns and if epigenetic abnormalities affect fertility and offspring. Several studies have associated different assisted reproduction technologies (in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, etc.) with an increase in the frequency of epigenetic and imprinting disorders, although it cannot be concluded with certainty that these errors are due to assisted reproduction technology and not to epigenetic alterations of the parents. An association between infertility and epigenetic modifications has been observed in infertile men. This review suggests the need to increase the number of epidemiological and genome-wide methylation studies to assess the health implications of ART.

Keywords: assisted reproductive technologies, imprinting disorders, epigenetic.

2. INTRODUCCIÓN

Todas las células del cuerpo humano tienen un mismo complemento de DNA (*Deoxyribonucleic Acid*; DNA) nuclear que codifica proteínas y otros productos génicos y que se origina en una sola célula en el momento de la concepción. Asimismo, los organismos pluricelulares poseen tejidos especializados que desempeñan funciones fisiológicas distintas. Sería lógico preguntarse, teniendo todas las células de un organismo el mismo genoma, cómo es posible que cada tejido tenga una función diferente. Esto se debe a que cada tejido tiene unos perfiles de expresión génica distinta. Se conoce bien la herencia mendeliana o genética pero no tanto sobre la herencia epigenética. Conrad Waddington introdujo el término epigenética por primera vez en 1942. La definió como "la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan origen al fenotipo". En un comienzo la epigenética incluía todas las vías moleculares que modulan la expresión de un genotipo en un fenotipo particular. Este significado ha ido cambiando con el tiempo y actualmente se acepta de forma genérica la definición: "alteraciones químicas de los nucleótidos o proteínas del DNA que controlan la expresión génica pero no alteran la secuencia del DNA (1)".

Dependiendo de la disciplina biológica el término epigenética posee distinta connotación. En genética del desarrollo, alude a los procesos de regulación genética que no implican modificaciones en la secuencia del DNA. En biología del desarrollo, hace referencia a la dependencia de factores internos (regulación genética, dinámica celular, etc.) y externos (temperatura, humedad, radiación, etc.) en los procesos embriológicos. En biología evolutiva, comprende los mecanismos de herencia no genética. Por último, en genética de poblaciones, se refiere a la variación fenotípica causada por las distintas condiciones del entorno(2).

Existen diversos mecanismos mediante los cuales el organismo regula la expresión de los genes.

2.1 METILACIÓN DEL DNA

La metilación es un proceso epigenético que regula la expresión génica de dos formas, de manera directa al evitar la unión de factores de transcripción y de forma indirecta ayudando a la cromatina a adquirir la estructura “cerrada”. La metilación de la citosina (una de las bases nitrogenadas del DNA junto con la adenina, guanina y timina) ocurre principalmente en la posición 5 de la base citosina en el palíndromo 5'-CpG-3' (5-cytosine-phosphate-guanine-3'; 5'-CpG-3') del DNA. Estos dinucleótidos no se sitúan aleatoriamente, sino que se concentran en regiones genómicas denominadas islas CpG. Estas regiones tienen un tamaño de 200 pares de bases (*base pair*; pb) a varias kilobases. Las islas CpG se ubican normalmente dentro de los promotores de genes y en el caso de genes activos se hallan no metiladas, mientras que en el caso de genes inactivos están metiladas. También existen dinucleótidos CpG en exones, intrones y regiones 5' y 3' no traducidas, aunque su función es incierta (3).

La metilación del DNA es catalizada por DNA metiltransferasas (*DNA methyltransferases*; DNMT) y consiste en la transferencia de un grupo metilo de la SAM (*S-adenosyl-L-methionine*; SAM) al carbono 5 de la citosina. En mamíferos se han identificado tres DNMT activas que emplean SAM como donador de grupos metilo: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Existe una cuarta DNMT, la DNMT3L que actúa como cofactor y se expresa en células germinales. La adición de grupos metilo a citosinas no metiladas se denomina metilación de novo y está catalizada por enzimas de la familia DNMT3. Las enzimas principales de establecer la metilación del embrión son DNMT3A y DNMT3B. Por otro lado, DNMT1 se encarga de mantener el patrón de metilación durante los procesos de reparación por lo que es un mecanismo ideal para conservar la memoria epigenética. Esta DNMT es la más abundante en células somáticas (4).

El DNA también se puede desmetilar de forma pasiva o activa. Cuando DNMT1 comienza a fallar en el proceso de replicación y dejan de reconocerse las cadenas hemimetiladas, y, como consecuencia, no se metila la cadena naciente, se habla de la desmetilación pasiva del DNA. La desmetilación activa se da mediante las proteínas TET (*Ten Eleven Translocation proteins*; TET). Éstas actúan oxidando la 5mC (5-methylcytosine; 5Mc) a 5hmC (5-Hydroxymethylcytosine; 5hmC), 5fC (5-Formylcytosine; 5fC) y 5-caC (5-carboxylcytosine; 5caC) sucesivamente. La escisión mediada por la DNA glicosilasa de timina (*Thymine DNA Glycosylase*; TDG) de 5fC y 5caC, junto con la

reparación por escisión de base (*Base Excision Repair*; BER) da como resultado la desmetilación y la sustitución de estas bases por citosinas desmetiladas (5).

2.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

La cromatina (material por el que está compuesto los cromosomas, se encuentra en el núcleo de la célula) existe en dos formas funcionales diferentes: de manera condensada, generalmente sin actividad reguladora del DNA, llamada heterocromatina, y una forma más dispersa que genera el ambiente para los procesos reguladores del DNA, llamada eucromatina. Los nucleosomas constituyen la unidad fundamental de la cromatina y están formados por dos vueltas de DNA (147 pares de bases) alrededor de un octámero de dos subunidades de histonas H2A, H2B, H3 y H4, que es un tipo de proteína que se encuentra en los cromosomas. Existe otra histona H1, que se encuentran en la superficie y que ancla el DNA al nucleosoma. La cromatina condensada dificulta los procesos celulares por lo que es susceptible a sufrir cambios conformacionales que controlen la accesibilidad de las moléculas. Se sabe que hay al menos 80 tipos de modificaciones de histonas distintas que afectan a más de 60 residuos. Algunas de las modificaciones que sufren las histonas son acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, etc. En este trabajo se va a hablar sobre la acetilación y metilación ya que son las más estudiadas (6).

La metilación de las histonas es una de las modificaciones postranscripcionales más importantes. Esta metilación se produce regularmente en el aminoácido lisina (K) de las histonas H3 y H4. La metilación está catalizada por la enzima histona metiltransferasa (*Histone Methyltransferases*; HMTs) y emplea SAM como donador de grupos metilo a los residuos de lisina. Los aminoácidos lisina pueden estar tanto mono, di y trimetilados y actúan como señales activas o represivas para la expresión génica. De forma general H3K4, H3K36 y H3K79 se plantean como marcas activas, situadas en regiones génicas transcritas de forma activa en la cromatina, y H3K9, H3K27 y H4K20 se consideran marcas represivas situadas en regiones génicas silenciadas en la cromatina condensada. La metilación de las histonas también puede ocurrir en los residuos de arginina (R).

Antes de descubrirse la primera desmetilasa se pensaba que la metilación de las histonas era irreversible, pero actualmente se conocen varias histonas desmetilasas de residuos K y R mediante amino-oxidación, hidroxilación o deiminación (7).

La acetilación de las histonas ocurre mediante la transferencia de un grupo acetilo a un grupo amino de la lisina en las colas N terminales de las histonas, proceso catalizado por (*Histone Acetyltransferases*; HAT) (7). Las HAT se pueden clasificar en las HAT tipo A, enzimas nucleares que catalizan la acetilación de las histonas presentes en la cromatina y en HAT tipo B, enzimas citoplasmáticas que se cree que acetilan histonas recién sintetizadas (6). La acetilación hace que la lisina adquiera una carga parcialmente negativa inhibiendo la unión entre ellas y entre el DNA, también cargado negativamente, descompactando la cromatina y permitiendo la transcripción. Por tanto, la acetilación puede considerarse como una marca activa de las histonas. Por el contrario, la deacetilación se considera una marca represora que no permite la transcripción del DNA y este proceso está reglado por las deacetilasas de histonas (*Histone Deacetylases*; HDAC) (7). Las HDAC se pueden clasificar en clase I, situadas en el núcleo y relacionadas con la regulación epigenética, HDAC clase II con funciones implicadas en la diferenciación celular y HDAC clase III implicadas en la regulación del metabolismo y la transcripción (6).

2.3 RNAs NO CODIFICANTES (NON-CODING RIBONUCLEIC ACID; ncRNA)

Por lo general, el genoma humano transcribe hasta un 75% del DNA genómico, del cual solo un 3% corresponde a genes codificantes de proteínas. Dentro de ese 75% de transcritos se encuentran los denominados ncRNAs, necesarios para la regulación epigenética de la expresión génica. Los ncRNA se pueden clasificar dependiendo de su tamaño y función en RNA de interferencia pequeños (*small interfering RNA*; siRNA) los microRNA (*microRNA*; miRNA) y los ncRNA largos (*long non-coding RNA*; lncRNA). Los ncRNA pequeños y medianos tienen función reguladora de la expresión génica a nivel de la postranscripción. Los lncRNAs actúan a nivel pretranscripcional acumulando complejos proteicos en regiones concretas del genoma, considerándose los ncRNAs clave en la regulación de la expresión génica a través de modificaciones epigenéticas. Tienen un papel muy importante en los procesos de desarrollo como la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica (3).

2.4 HERENCIA EPIGENÉTICA

En primer lugar, se va a explicar la herencia célula-célula. La epigenética regula la expresión diferencial de los genes siendo la responsable de que, a pesar de que todas las células de un organismo posean el mismo genoma, existan distintos tipos celulares con sus diferencias morfológicas y funcionales. De esta forma, células que presentan un patrón epigenético no pueden perder este patrón y desdiferenciarse, dando lugar a al mismo tipo de células hijas.

Por otro lado, se encuentra la herencia epigenética transgeneracional. Teniendo en cuenta que la epigenética se reprograma, es decir, los patrones epigenéticos se pierden y se instauran de nuevo en línea germinal en las primeras etapas del desarrollo embrionario, podría considerarse la no existencia de herencia epigenética; Sin embargo, se ha observado que en gestantes expuestas a determinados agentes ambientales que afectan a los procesos epigenéticos, las posibles variaciones epigenéticas pueden ser heredadas por generaciones posteriores. Aunque aún hay mucho que se desconoce sobre este tipo de herencia, lo que sí se sabe es que hay regiones del genoma que escapan a este modelo de herencia (8).

2.5 REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN EMBRIONES

Como se ha comentado, tras la fecundación, los patrones epigenéticos se reprograman en los primeros estadios del desarrollo embrionario, dando lugar a células totipotentes. Es a partir del estadio de mórula cuando surgen los patrones epigenéticos. La fusión del DNA materno y paterno dará lugar al DNA del blastocisto, lo que ocurre en la reprogramación epigenética es una desmetilación masiva de los DNA paternos que más tarde se reescriben diferencialmente según el tipo de célula. La desmetilación del DNA en el genoma materno y paterno ocurre de forma diferente. EL DNA materno se desmetila pasivamente por la pérdida de actividad de la DNMT1. Por otro lado, el DNA paterno se desmetila activamente por acción de las proteínas TET (en concreto la TET3) (8).

Existen excepciones, como los genes de impronta y los retrotransposones, que no se reprograman y mantienen la metilación del DNA.

En las células diploides de mamíferos, la gran parte de los genes se expresan a partir de los alelos (versiones alternativas que puede tener un mismo gen) paternos y

maternos siendo estos los genes con expresión bialélica. La impronta genómica es un fenómeno en el cual se expresa únicamente una copia de un gen, ya sea materno o paterno, mientras que la otra copia se mantiene silenciada. Es decir, que, para un gen, si la copia materna se expresa, la copia del padre no lo hará y se mantendrá silenciada, y lo mismo ocurre de forma inversa. Este control en la expresión está regulado por marcas epigenéticas y no por cambios en la secuencia de DNA. Para explicar la impronta, la teoría más aceptada es la teoría del parentesco. Se ha visto en diferentes estudios que el genoma heredado de la madre podría ser más importante para el desarrollo embrionario, mientras que el material genético procedente del padre podría ser más importante para el desarrollo de los tejidos extraembrionarios (placenta y membranas). Que la impronta ocurra predominantemente en genes relacionados con el crecimiento fetal de mamíferos euterios, da consistencia a esta teoría. Un fallo en la expresión o silenciamiento de los genes de impronta puede causar diferentes síndromes, dependiendo del gen donde se produzca el fallo (8).

La mayoría de los genes de impronta genómica se agrupan en regiones genómicas que, además, contiene RNA no codificante y regiones de control de impronta genómica (*Imprint Control Region; ICR*) (8). Para lograr la expresión específica de uno de los alelos, los cromosomas se deben diferenciar mediante algún tipo de marca epigenética, las regiones críticas que presentan esta marca reciben el nombre de región diferentemente metilada (*Differentially Methylated Region; DMR*). Existen dos tipos de DMR, las DMR germinales en las que los cambios epigenéticos vienen definidos desde los gametos y se mantienen a lo largo del desarrollo y las DMR somáticas en las que los cambios epigenéticos se establecen desde la fecundación. Son la DMR germinales los que actúan como ICR (8).

Los ICR regulan la expresión génica de diferentes maneras: el ICR coincide con la región promotora de un gen, de manera que, la metilación del DNA y las modificaciones represoras en las histonas que ocurren en uno de los alelos generan su silenciamiento (imagen 1).

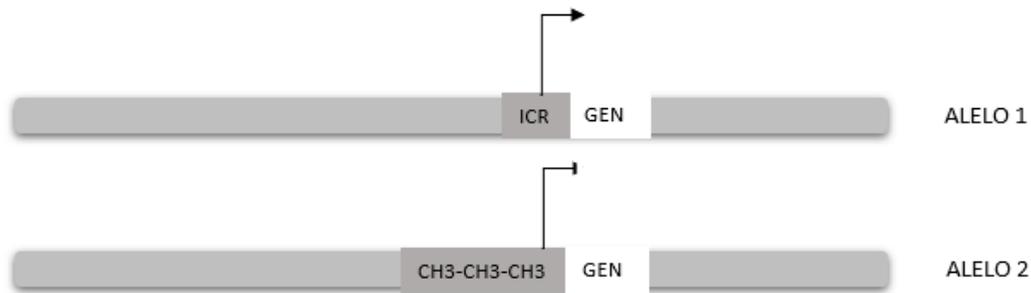


Imagen 1. Regulación de la expresión génica. En el alelo 1 la ICR no se encuentra metilada, por lo que el gen se expresa. En el alelo 2 la ICR se encuentra metilada, por lo que habrá represión de la expresión y el gen está silenciado. Adaptado de Campubrí y Blanco, 2018.

En otro caso, la ICR coincide con el promotor de un gen no codificante que expresa un RNA antisentido (es decir, un RNA no codificante, de manera que, uno de los alelos quedará silenciado y el otro, al presentar su ICR modificaciones epigenéticas que impidan la expresión de RNA antisentido se expresará (imagen 2).

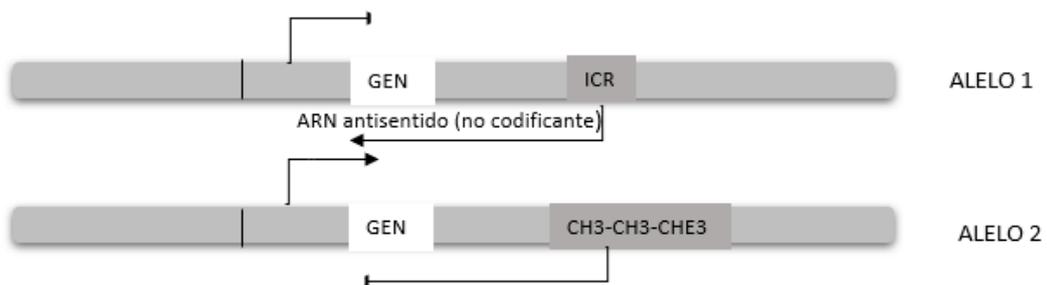


Imagen 2. El ICR del alelo 1 es el promotor de un gen que expresa un RNA antisentido, de manera que el gen de impronta del alelo 1 no se expresa. El ICR del alelo 2 se encuentra metilado, por lo que el RNA antisentido no se expresa y el gen de impronta, al no estar silenciado, se expresa. Adaptado de Campubrí y Blanco, 2018.

El último mecanismo mediante el cual los ICR regulan la expresión génica se realiza mediante secuencias activadoras (enhancers). En los alelos hay dos genes distintos separados por un ICR, de manera que, si se expresa uno de los genes, el otro no lo hará y viceversa. En este caso, el ICR se sitúa en una región intragénica a la que se unen proteínas aisladoras de la cromatina en ausencia de metilación, expresándose el gen más cercano al enhancer. Si el ICR está metilado, las proteínas aisladoras no se unen, formándose un *loop* (lazo) de la cromatina, quedando en contacto con el gen más lejano, que es el que se expresa. Por tanto, si un alelo tiene el ICR metilado, el otro alelo no lo tendrá (imagen 3) (8).

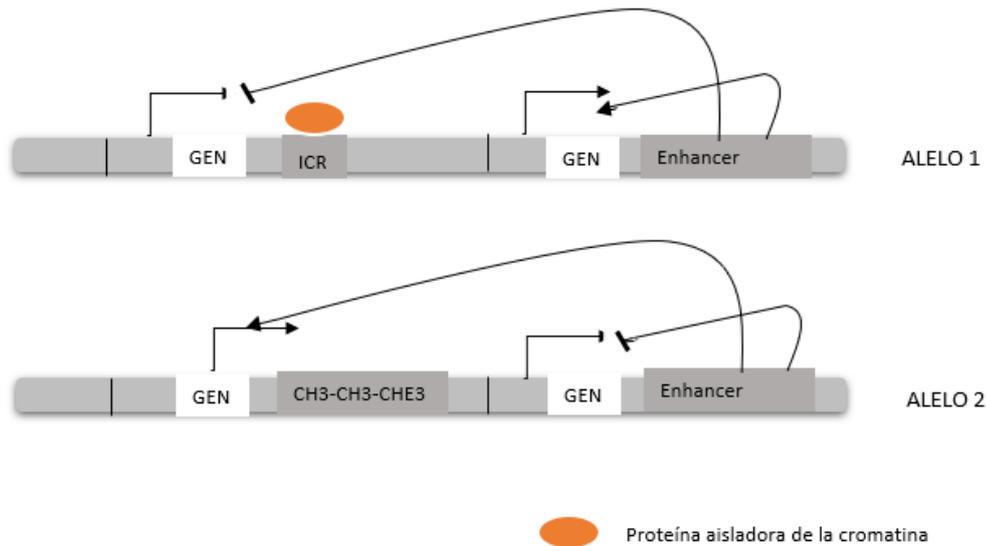


Imagen 3. En el alelo 1 el ICR no se encuentra metilado, de manera que las proteínas aisladoras de la cromatina se unen a él y se expresa el gen más cercano al enhancer. En el alelo 2 el ICR se encuentra metilado, por lo que las proteínas aisladoras de la cromatina no se unen a él, se formará un loop de manera que el enhancer queda cercano al gen más lejano y se expresará el ese gen. Por lo tanto, si en un alelo se expresa un gen, en el alelo 2 se expresa el otro gen. Adaptado de Campubrí y Blanco, 2018.

2.6 REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES (PGCS)

Las células germinales primordiales (*primordial germ cell*; PGC) son la población fundadora de la línea germinal, de ellas surgen los ovocitos y los espermatozoides. Son, por tanto, las encargadas de transmitir la información genética de una generación a otra.

Se ha hablado de la reprogramación que ocurre en el embrión durante el desarrollo, que sucede durante la preimplantación. En esta, los genes regulados por impronta genómica son comunes en todos los tipos celulares y se van a mantener durante el desarrollo embrionario. Pero existe una segunda ola de reprogramación, la reprogramación específica de las PGC, que ocurre entre la especificación y la entrada meiótica y que es una excepción a la situación de los ICRs ya que, en este caso, los genes de impronta se deben borrar (8).

En la segunda ola de reprogramación existe una desmetilación del DNA más rigurosa que en la primera ola, afectando incluso a genes de impronta y a elementos repetitivos que escapan de la desmetilación en la primera ola. El objetivo de la segunda ola es eliminar las marcas epigenéticas heredadas de los progenitores en las PGC diploides,

para que sean reemplazadas por marcas activadoras o represoras en los ICRs específicas de género. Lo que se pretende es evitar que el 50% de los gametos haploides (estado en el que la célula solo tiene un juego de cromosomas), procedentes de los PGCs diploides (estado en el que las células tienen juegos completos de cromosomas), sean portadores de la copia metilada y el otro 50% sean portadores de la no metilada, dando lugar a fenotipos anómalos. La metilación del DNA de los ICRs, en este caso, se borra por acción de las proteínas TET y la conversión de 5mC en 5hmC. Posteriormente, se adquieren las marcas de metilación específicas para el alelo materno o paterno, según el sexo del embrión. Es decir, en la gametogénesis femenina las marcas epigenéticas heredadas de los progenitores se borran y se establece la metilación específica materna en todos los ICRs del genoma en todos los ovocitos. Lo mismo ocurre en la gametogénesis masculina, pero estableciéndose patrones paternos.

Por tanto, mientras que el objetivo de la segunda ola de reprogramación es eliminar las marcas epigenéticas en las PGC, el objetivo de la reprogramación embrionaria (primera ola), es el reinicio del epigenoma para reemplazar marcas específicas (exceptuando genes de impronta) de los gametos unipotentes por marcas de células diploides totipotentes, pudiendo el embrión activar su genoma y convertirse en un organismo completo (8).

2.7 ENFERMEDADES EPIGENÉTICAS

La secuencia de DNA no es el único determinante del fenotipo y de las anomalías genéticas. En los últimos años se han estado estudiando las enfermedades causadas por anomalías epigenéticas. Algunas de las enfermedades causadas por fallos epigenéticos son el cáncer, por hipermetilación en regiones promotoras específicas y por hipometilación global del DNA y/o pérdida o ganancia de acetilación o metilación de las histonas; enfermedades autoinmunes como por ejemplo la artritis reumatoide, por alteraciones en el patrón epigenético normal de la metilación del DNA y en las modificaciones de histonas, que se han visto en células estromales e inmunitarias; enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple o el Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (10)

2.8 TRASTORNOS POR ANOMALÍAS EN LA IMPRONTA GENÓMICA

En humanos la importancia de la impronta genómica se puede observar en los distintos síndromes causados por variaciones en los genes de impronta. Las enfermedades de impronta son muy raras, pero muy graves, confirmando la importancia de la correcta expresión monoalélica de estos genes para el correcto desarrollo neurológico, embrionario y de los tejidos extraembrionarios.

Se conocen cuatro posibles causas de las enfermedades provocadas por alteraciones en la impronta (*Imprinting Diseases; ImpDis*):

- a. Disomía uniparental (*Uniparental Disomy; UPD*): se expresan los alelos.
- b. Variación en el número de copias de la región regulada por impronta (*Copy Number Variation; CNV*): deleciones y duplicaciones cromosómicas.
- c. Patrón de metilación del DNA aberrante en las ICR.
- d. Mutaciones genéticas en la copia activa de genes regulados por impronta.

Los fenotipos clínicos de estos trastornos son muy variados, y a menudo su diagnóstico es complejo, ya que diferentes trastornos pueden presentar rasgos iguales. En la actualidad se conocen 12 ImpDis, estos son algunos ejemplos de trastornos de impronta mejor caracterizados:

- I. Síndrome de Prader-Willi (*Prader-Willi Syndrome; PWS*): se caracteriza por discapacidad intelectual leve, bajo peso al nacer, pero apetito voraz luego de la lactancia que termina en obesidad. Los pacientes con síndrome de Prader-Willi tienen una deleción en el cromosoma 15q11-13 en el cromosoma paterno o, en menor medida, tienen UPD materno del cromosoma 15.
- II. Síndrome de Angelman (*Angelman Syndrome; AS*): se caracteriza por discapacidad intelectual grave, microcefalia y risas frecuentes. Se da por una deleción del cromosoma 15q11-13 del cromosoma materno, o, en menor medida UPD paterno del cromosoma 15.
- III. Síndrome de Silver-Russell (*Silver-Russell Syndrome; SRS*): se caracteriza por una restricción del crecimiento, ya sea pre y/o posnatal, cara pequeña y con forma triangular y asimetría esquelética. Los pacientes con este síndrome presentan UPD en el cromosoma 7 materno o hipometilación en el cromosoma 11p15.5 paterno.
- IV. Síndrome de Beckwith-Wiedemann (*Beckwith-Wiedemann Syndrome; BWS*) se caracteriza por un crecimiento excesivo pre y/o posnatal, de la placenta, macroglosia y

predisposición a tumores embrionarios. Se da por una desregulación de la región de impronta 11p15.5, normalmente una hipometilación de origen materno.

Otros trastornos de impronta son: Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria, discapacidad intelectual tipo Birk-Barel, Síndrome de Temple, pubertad precoz, Síndrome Schaaf-Yang, Síndrome de Kagami-Ogata, pseudohipoparatiroidismo, UPD(20)mat (9).

La hipótesis planteada se relaciona con la alteración de la regulación epigenética en la aplicación de las TRA y su influencia en la fertilidad.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar una búsqueda bibliográfica para conocer si las distintas técnicas de Reproducción Asistida alteran los patrones epigenéticos y cómo las anomalías epigenéticas afectan a la fertilidad y a la descendencia de los progenitores.

Como objetivos secundarios se plantea conocer cuál es la técnica en la que se ha visto mayor número de alteraciones epigenéticas e investigar cuál es el fallo epigenético que más se repite y qué factores causan estos fallos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos como NCBI, Pubmed, Scielo y Science y en la biblioteca CRAI Dulce Chacon de la Universidad Europea. Se han empleado las siguientes palabras clave o combinaciones de ellas: epigenética, metilación del DNA, modificación de histonas, herencia epigenética, enfermedades epigenéticas, criopreservación, infertilidad masculina y factores ambientales. Para la elaboración del trabajo se han empleado artículos de investigación científica con índice de impacto preferiblemente alto, y con fecha relativamente reciente, para lo que se ha tenido que filtrar los resultados. Debido a la dificultad para encontrar la información requerida se ha ampliado la búsqueda a artículos con un menor índice de impacto. En cada apartado se ha optado por un tipo de recurso diferente. En el caso de la introducción, la información empleada ha sido artículos de revisión y libros

sobre epigenética en menor medida, que aportan una visión general sobre la epigenética, los distintos mecanismos y la herencia epigenética. Para realizar los resultados y discusiones se han empleado revisiones bibliográficas que agrupan estudios realizados en humanos principalmente, y en animales, asimismo, se ha utilizado estudios experimentales, metaanálisis y capítulos de libros sobre epigenética e infertilidad masculina.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) es el último recurso al que las parejas infértiles acuden con la esperanza de poder tener un recién nacido vivo en casa. Si bien, estos procedimientos se aceptan como seguros, se ha visto en diferentes estudios que niños concebidos por TRA pueden presentar mayor predisposición a diversas complicaciones perinatales y posnatales, como bajo peso al nacer, cáncer infantil, malformaciones cardíacas, etc. Además, determinados estudios han sugerido que niños nacidos mediante TRA muestran una alta incidencia de alteraciones epigenéticas somáticas y trastornos de impronta como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Angelman y el síndrome de Silver-Russell. Hay autores que hablan de riesgos aumentados del orden de 3X a 16X si se compara con niños concebidos de forma natural (11).

5.1 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA QUE SE ASOCIAN CON ANOMALÍAS EPIGENÉTICAS

La estimulación ovárica controlada (*Controlled Ovarian Stimulation*; COS) tiene un papel importante en los ciclos de reproducción asistida. Sin embargo, se ha visto que las gonadotropinas exógenas interfieren en los patrones normales de metilación materna durante la maduración de los ovocitos (13). Este hecho se ha observado en niños con trastornos epigenéticos concebidos mediante técnicas FIV (Fecundación in vitro; FIV) incluso cuando el único procedimiento ha sido la estimulación ovárica (8).

La COS puede interrumpir el establecimiento de improntas en el ovocito en desarrollo ya que el establecimiento de las improntas coincide con la maduración de estos. También puede suceder que aquellos ovocitos que de forma natural no

madurarían, lo hagan, pudiendo portar genes improntados de manera incompleta (13). Asimismo, se ha visto que mujeres con un hijo concebido por estimulación ovárica presentan más anomalías cardíacas que los controles con concepción natural, según un metaanálisis el riesgo de cardiopatía coronaria aumentó significativamente en el grupo de FIV/ICSI en comparación con un grupo de concepción espontánea, con un OR de 1,45 (12).

En humanos, es complicado diferenciar entre los efectos de la COS y otros factores que contribuyen a la infertilidad, sin embargo, en estudios con ratones se han observado los efectos nocivos que tiene la estimulación ovárica sobre la impronta genómica: alteración de la reprogramación epigenética, alteración del entorno fisiológico del útero y la implantación y, modificación de histonas (que tienen un papel importante en la regulación epigenética de la placenta) (8).

En este sentido, aún queda mucho por estudiar, pero dado que es difícil conocer los efectos de la COS en humanos, sí sería recomendable disminuir lo máximo posible las dosis exógenas de hormonas (8).

5.1.1 FECUNDACIÓN IN VITRO Y CULTIVO EMBRIONARIO

Para el correcto desarrollo embrionario, y el éxito de los tratamientos FIV, uno de los requisitos es tener tanto medios como condiciones de cultivo idóneos. Sin embargo, no existe un consenso sobre cuál es el medio de cultivo ideal. El empleo de distintos medios en la práctica como el cultivo prolongado hasta blastocisto podría alterar el establecimiento de la impronta en el embrión, según el medio empleado (13).

Se ha reportado en varios ensayos la interrupción de la metilación en varios genes de impronta debido al cultivo in vitro. En un estudio referenciado por Sciorio et al., 2022 realizado en ovocitos de ratones que se cultivaron in vitro o en oviducto femenino se observó que los ovocitos cultivados in vitro podían sufrir una amplia gama de cambios en las vías celulares, de desarrollo y metabólicas. En estudios realizados en embriones bovinos se han obtenido resultados similares (14). Los trastornos más estudiados en bovinos son el síndrome de sobrecrecimiento (*Large Offspring Syndrome*; LOS) y el síndrome de ascendencia anormal (*Abnormal Offspring Syndrome*; AOS). El AOS

supone placentación e implantación incorrectas, un fenotipo demasiado grande, deformaciones congénitas e incluso aborto. Por otro lado, en varios estudios se ha visto que LOS surge de una reprogramación epigenética errónea en las primeras etapas de desarrollo, por lo que va a haber una expresión de genes de regulación epigenética anormal (8). En humanos también se ha estudiado cómo afectan los distintos medios de cultivos en los embriones. En un análisis también referenciado por Sciorio et al., 2022 donde se cultivaron embriones humanos en dos medios distintos se vio una expresión diferente en 951 genes implicados en la apoptosis, el metabolismo y la regulación del ciclo celular. Un ensayo clínico aleatorizado estudió la metilación del DNA de genes de impronta en placentas de mujeres sometidas a FIV donde los embriones se incubaron en dos medios distintos, pero no se observaron diferencias significativas, ni tampoco al compararlo con placentas concebidas de forma natural. Lo que sí se observó en uno de los estudios es el síndrome de sobrecrecimiento, debido a una regulación epigenética anormal. Lo que se reportó en este estudio fue una mala regulación de varios genes de impronta en riñón, cerebro e hígado en fetos procedentes de TRA (14).

No se conoce bien el motivo por el que los diferentes medios de cultivo alteran la expresión génica y conducen a alteraciones de impronta. Una de las hipótesis postula que, en condiciones in vitro, se altera la DNMT1. Debido al retraso que hay en condiciones in vitro para la segmentación embrionaria, la traslocación de DNMT1 al núcleo podría ocurrir en una etapa del desarrollo incorrecta. Otra hipótesis teoriza una alteración en los factores que participan en el mantenimiento de los patrones de impronta como DNMT, proteínas relacionadas o modificaciones en la estructura de la cromatina por estrés en el cultivo in vitro. Además, otra de las teorías defiende que las proteínas, los componentes o el suero que componen los medios de cultivo parecen afectar el desarrollo de los embriones preimplantacionales. Aunque no se sabe cuál es el componente que afecta, se piensa que está relacionado con un fallo en el ciclo celular de uno de los mecanismos del mantenimiento de la impronta (11).

5.1.2 INYECCIÓN INTRACITOMPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (*INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES*; ICSI)

La ICSI fue realizada por primera vez por Palermo y colaboradores en 1992 y se introdujo en la práctica clínica sin pruebas experimentales previas ni validación clínica en modelos animales, por lo que existen varias preocupaciones sobre la seguridad de este procedimiento y sobre los riesgos que existen para la descendencia (14). La técnica ICSI supone la fecundación mediante la inyección de un solo espermatozoide en el ovocito. La selección de espermatozoides morfológicamente normales bajo el microscopio podría no ser tan rigurosa in vivo, además, muchas veces estos espermatozoides tienen movilidad reducida y/o morfología anormal. La inyección de espermatozoides con estas características puede provocar una mayor incidencia de anomalías en la descendencia. Además, se ha visto que pacientes con oligozoospermia (definida según la OMS (2010) como “el bajo recuento de espermatozoides en el eyaculado”, por debajo de los 15 millones de espermatozoides por mililitro) o azoospermia (definida según los parámetros de la OMS (2010) como “la ausencia de espermatozoides en la muestra de eyaculado en su análisis inicial y ausencia de espermatozoides tras la centrifugación”) poseen mayor incidencia de anomalías cromosómicas como deleciones del cromosoma Y y cariotipos anormales que pueden transmitir a sus hijos. Mediante este procedimiento se evita la selección natural en la membrana del ovocito, hecho que ocurre tanto en el embarazo natural como en FIV convencional. Asimismo, en la ICSI la membrana celular del ovocito se rompe y se introduce, junto con el espermatozoide, material extraño. Por último, el uso de polivinilpirrolidona podría provocar mutaciones puntuales, debido a la exposición a sustancias químicas y ambientales (13).

Actualmente, la ICSI es el principal procedimiento que se aplica en parejas infértiles. Varios investigadores han observado que errores de impronta pueden tener su origen en una espermatogénesis anormal que luego se puede transmitir al embrión mediante ICSI. Se ha visto, por ejemplo, en hombres con oligozoospermia y azoospermia una hipometilación del DNA en el locus del gen H19 (13). Otro estudio analizó el esperma de 97 hombres infértiles y se observó que un 14,4% de los pacientes presentaban alteraciones en genes con impronta paterna y un 20,6% en genes con impronta materna(13). Estos defectos se observaron sobre todo en hombres oligospermicos, por

lo que los autores concluyeron que hombres infértiles con parámetros seminales alterados tienen un mayor riesgo de transmitir improntas incorrectas a su descendencia. Por el contrario, otros estudios que han analizado los niveles de metilación del DNA en diferentes genes no han mostrado un mayor riesgo de alteraciones epigenéticas en niños nacidos por TRA. Tampoco han observado diferencias significativas de impronta en niños concebido de forma natural vs ICSI. No está claro por lo tanto, si los defectos epigenéticos se deben a los propios procedimientos de reproducción asistida o a factores de los padres (13).

5.1.3 CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

El método más empleado actualmente para la criopreservación de ovocitos y embriones es la vitrificación. La vitrificación emplea una alta concentración de crioprotectores con velocidades de enfriamiento y calentamiento ultrarrápidas, obteniendo como resultado un estado vítreo que reduce la sensibilidad al enfriamiento y los daños que sufren los embriones y los ovocitos por cristalización del hielo. La tasa de supervivencia es bastante alta, aunque la exposición a altas concentraciones de crioprotectores es tóxica. Aunque se desconoce en gran medida el efecto de la vitrificación y desvitrificación en la impronta genómica y en el estado de metilación, diferentes estudios han comenzado a analizar los riesgos que la criopreservación de ovocitos y embriones pueden generar en la epigenética (12).

La mayoría de los estudios se han realizado en animales, principalmente bovinos y murinos, pero las técnicas empleadas y los genes estudiados son muy diferentes, por lo que no se pueden sacar conclusiones sólidas. Aun así, en cuanto a la metilación del DNA, en dos de los estudios referenciados por Barberet et al., 2020 se ha encontrado una disminución en la metilación general del DNA después de la vitrificación de ovocitos. En otro de los análisis referenciados sobre de modificación de histonas solo se ha analizado en animales, y parece que la vitrificación conduce a un aumento en los niveles de acetilación de las histonas H4 y H3. Por último, un estudio realizado en ratones comparó el transcriptoma de miRNA de ovocitos frescos y vitrificados, veintidós miRNA se expresaron diferente en los dos grupos. En humanos no se han encontrado estas referencias (15).

5.1.4 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (*DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL; DGP*) Y ECLOSIÓN ASISTIDA.

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP), es una técnica que permite la selección de embriones FIV con dotación genética normal en parejas con riesgo de transmitir enfermedades monogénicas y anomalías numéricas o estructurales de los cromosomas. Para realizar un DGP se requiere la biopsia del embrión, que se puede hacer en tres etapas distintas: corpúsculo polar, embrión o blastocisto. Esta técnica se suele realizar en estado de blastocisto. Normalmente, en día tres, el embrión se somete a una eclosión asistida, es decir, a una serie de pulsos láser para facilitar el abandono de la zona pelúcida embrionaria en D5/D6 de desarrollo. Esta técnica (eclosión asistida), también se utiliza en algunos laboratorios FIV porque se piensa que mejora las tasas de embarazo clínico, pero los riesgos epigenéticos que puedan tener aún no se conocen (13).

En ratones, en uno de los estudios referenciados por Ziru Jiang et al., 2017 se ha observado una descendencia anormal tras biopsia para DPG: mayor peso corporal y menor estímulo acústico, pudiendo suponer un factor de riesgo para trastornos metabólicos y psiquiátricos. Otra de los análisis del artículo reportó la alteración de 17 proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas. Otra investigación englobada en esta revisión, sin embargo, concluyó que era la condición de los padres y no el procedimiento de DGP el factor de riesgo en niños con resultados obstétricos y neonatales adversos en humanos. Por último, otro estudio postuló la misma teoría, demostrando que el DGP no estaba asociado a mayor riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer (13).

De otra parte, un estudio referenciado por Osman et al., 2018 analizó cómo afecta la aplicación de pulsos láser sobre embriones de ratón preimplantados. Se observó que la expresión de los niveles de DNMT se redujeron en embriones de dos células expuestos al láser, mientras que no hubo diferencias significativas en embriones de seis y ocho células cuando se sometieron al láser cuando se compararon con embriones no expuestos (12).

Los resultados son contradictorios y existen muy pocos estudios en humanos para poder concluir si estas técnicas afectan a la epigenética.

En la tabla 1 se expone un resumen de los distintos procesos que se pueden seguir en un tratamiento de reproducción asistida y los efectos epigenéticos que se han presenciado en los distintos estudios.

PROCESOS DE LOS TRA	EFEECTO EPIGENÉTICO
Hiperestimulación ovárica	<p>Interfiere en los patrones de metilación materna.</p> <p>Interrumpe el establecimiento de las improntas del ovocito.</p> <p>Mayor número de anomalías cardiovasculares en descendientes de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica.</p> <p>Altera la reprogramación epigenética en ratones.</p> <p>Modificaciones de las histonas alteradas en comparación con estimulación natural en ratones.</p>
Cultivo embrionario y FIV	<p>Interrumpe la correcta metilación en genes de impronta.</p> <p>En bovinos produce síndrome de sobrecrecimiento y síndrome de la descendencia anormal.</p> <p>Expresión diferencial en 951 genes.</p> <p>En la descendencia de pacientes sometidos a este tratamiento se ha visto mala regulación en genes de impronta del riñón, cerebro e hígado.</p>
ICSI	No se conoce si las modificaciones observadas se deben a la técnica en sí o a los factores paternos.
Criopreservación	<p>En animales provocan hipometilación general del DNA y un aumento de la acetilación de H4 y H3.</p> <p>No se pueden obtener conclusiones sólidas.</p>
DGP y eclosión asistida	<p>Descendencia anormal: mayor peso corporal y menor estímulo auditivo.</p> <p>Alteraciones en 17 proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas en descendientes.</p> <p>Menor nivel de DNMT.</p> <p>Otros estudios no han observado esta relación.</p>

Tabla 1. Tabla resumen de las diferentes técnicas de reproducción asistida y los efectos epigenéticos que causa. Diseño propio.

5.2 TRASTORNOS DE IMPRONTA Y TRA

En los últimos años, aumenta cada vez más el número de informes que sugieren una relación entre los TRA y las ImpDis, al haber mayor número de recién nacido vivos con estos trastornos nacidos mediante TRA que los esperados por concepción natural. Existen diferentes estudios que han analizado esta relación (16).

Cortessis Vk y su grupo realizaron un metaanálisis y estimaron el riesgo de los distintos trastornos de impronta después de TRA. Lo esperado tras el estudio es que de 10.000 nacidos vivos tras TRA, 3,9 niños serán diagnosticados con AS y BWS, 2,2 con PWS y 1,5 con SRS. En total habrá 11,5 casos de niños nacidos con trastornos de impronta. La frecuencia esperada para estos trastornos es de 2 por cada 10.000 niños en la población general (16). En otra revisión bibliográfica mencionada por Sciorio et al., 2022 se observó una asociación positiva entre los procedimientos de FIV e ICSI y BWS, con un riesgo relativo de 5,2 sin embargo, no observaron asociación para AS, o PWS, sino una asociación positiva con problemas de fertilidad. En cuanto a SRS no se obtuvo un valor significativo y no se pudo asociar a TRA. Un estudio epidemiológico, también mencionado en este artículo, realizado en Dinamarca y Finlandia reportó una mayor tasa de probabilidades con un odds ratio de 3,07 para BWS en niños nacidos tras TRA, pero no observó este hecho para PWS, SRS y AS. Otra alusión se hace a un estudio epidemiológico realizado en Japón, en el que se reclutaron pacientes con trastornos de impronta y se observó frecuencias aumentadas de 4,46 y 8,91 veces para BWS y SRS asociadas con ART. La frecuencia de PWS fue 3,44 mayor de lo previsto en pacientes sometidos a TRA. No se observó un aumento para pacientes con AS. En este mismo estudio también se analizó la metilación del DNA, y se observó que en pacientes con BWS y SRS las tasas de error de metilación del DNA fue significativamente mayor en pacientes sometidos a TRA que en pacientes con estas enfermedades y no sometidos a TRA (14).

Un estudio prospectivo referenciado por Kopca et al., 2021 analizó la asociación de BWS y siete niños nacidos mediante TRA sin antecedentes del trastorno. Cinco de los niños con esta enfermedad tenían una impronta anormal en el mismo gen, el gen LIT1 debido a la hipometilación del DMR de LIT1. Uno de ellos, además, también presentaba

hipometilación en H19 DMR. Solo uno de ellos mostró un patrón de metilación normal en ambos genes, por lo que se observó que niños con BWS nacidos mediante TRA presentaban perfiles de metilación anormales y genes impresos similares. Otros estudios han reportado mayor riesgo de descendencia de AS en parejas subfértiles sometidas a ICSI e hiperestimulación ovárica (11).

5.3 EPIGENÉTICA EN LA INFERTILIDAD MASCULINA

La incidencia de la infertilidad masculina es de alrededor del 50% en las parejas infértiles, aunque en la mayoría de los casos la patología es desconocida. Las TRA ayudan a los hombres infértiles a tener hijos propios, pero, al igual que ocurría en mujeres infértiles, estas técnicas pueden tener un riesgo de transmisión de alteraciones genéticas y epigenéticas.

Los espermatozoides son células diferenciadas que proporcionan el genoma paterno haploide al embrión. Como ya se ha explicado, la importancia biológica de los espermatozoides no se encuentra solo en su secuencia de DNA, sino también en la información epigenética. Los distintos mecanismos epigenéticos son fundamentales para modular la cromatina de los espermatozoides, que, posteriormente, fecundan el ovocito y participan en la embriogénesis temprana (17).

La espermatogénesis es un proceso complejo de diferenciación, propenso a errores, que puede derivar en la infertilidad masculina. Varios estudios han evidenciado marcas epigenéticas anormales en sémenes procedentes de pacientes con alteraciones en la fertilidad o con malos parámetros seminales (18).

5.3.1 PERFIL EPIGENÉTICO EN LOS ESPERMATOZOIDEOS NORMALES

Los cromosomas de los espermatozoides se disponen en forma similar a una horquilla, con los centrómeros confinados en el núcleo y los telómeros en la periferia. El DNA de los espermatozoides está seis veces más condensado que los cromosomas mitóticos, al estar repleto de proteínas básicas específicas, las protaminas; por lo tanto, la cromatina del esperma está altamente empaquetada. Existen dos tipos de protaminas: la protamina P1 y la protamina P2. La protamina P1 está presente en todas

las especies de mamíferos, mientras que la P2 solo está en algunas. Estas proteínas tienen varias funciones, como permitir un movimiento más rápido a los espermatozoides, permitiendo así la fecundación del ovocito. Asimismo, están implicadas en el establecimiento de las líneas de impronta paterna durante la espermatogénesis. En humanos, el reemplazo de histonas por protaminas involucra un grupo de proteínas específicas ricas en arginina y lisina, conocidas como proteínas nucleares de transición (*Transition nuclear proteins: TNP*). Las principales TNP son TNP1, que es importante en el inicio de la condensación de la cromatina y en el cese de la actividad transcripcional durante la espermatogénesis, y la TNP2, que está relacionada con dos genes de la protamina. Un 5-10% del componente de nucleohistona se retiene dentro de la cromatina espermática y participa en la regulación epigenética. Se cree que la expresión de los TNP regula cambios en la cromatina que se producen como parte del proceso de condensación (18).

5.3.2 MODIFICACIONES DE HISTONAS

Las modificaciones de histonas, como ya se ha explicado en la introducción, son un tipo de marcas epigenéticas que pueden transmitirse de padres a hijos. Al igual que ocurría con el resto de las células, durante la mitosis y la meiosis el DNA de las células germinales masculinas se empaqueta en nucleosomas compuestos por histonas, los cuales son susceptibles a modificaciones covalentes tales como metilación, acetilación, ubiquitinación, etc. Aunque la mayoría de las histonas se reemplazan por protaminas durante la elongación de las espermátidas, hay nucleosomas que escapan de la sustitución y se retienen en el esperma maduro. Estos nucleosomas se enriquecen en secuencias ricas en CpG que no tienen metilación del DNA. Se ha visto que la histona H3.3 no canónica trimetilada en K4 es abundante en estos nucleosomas, al igual que las histonas H3.1 y H3.2 canónicas trimetiladas en K37. También se han reportado la presencia de otras histonas no canónicas en estos nucleosomas, como la TH2B, que se observó en humanos (18).

5.3.3. METILACIÓN DEL DNA

La metilación y desmetilación del DNA de novo es esencial para el funcionamiento normal del espermatozoides maduro y del embrión temprano. Los estudios de metilación del DNA de espermatozoides a gran escala han revelado el perfil de metilación de los espermatozoides, que tiende a la hipometilación, con distintas funciones de loci hipometilados versus hipermetilados. Los promotores de genes hipometilados se asocian a la espermatogénesis y a los procesos de desarrollo embrionario temprano. Además, parece que las secuencias de DNA repetitivo suelen estar metiladas en los espermatozoides seguramente para evitar la actividad de retrotransposición (8).

5.3.4 RNA NO CODIFICANTE

Los ncRNA están implicados en la regulación de la producción de espermatozoides. Los linajes germinales masculinos expresan distintas clases de ncRNA. Se ha observado que miRNA expresados en espermatozoides, participan en la regulación negativa postranscripcional de TNP2 durante la espermatogénesis. TNP2, junto con TNP1 facilita el reemplazo de las histonas por protaminas en la cabeza del espermatozoide. Los lncRNA por su lado, se regulan durante el desarrollo de la línea germinal masculina y pueden actuar regulando la expresión génica tanto a nivel transcripcional como postranscripcional por mecanismos genéticos y epigenéticos. En los testículos, los perfiles de lncRNA se pueden detectar en diferentes edades y etapas de desarrollo. En humanos, se ha asociado la expresión de lncRNA con la motilidad de los espermatozoides (18).

5.3.5 MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDEOS ABERRANTES

Como se ha comentado en apartados anteriores, la metilación del DNA tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo de los espermatozoides, por lo que un fallo en este punto puede conducir a la infertilidad masculina (18). Otros estudios han reportado una relación directa entre la infertilidad masculina y la metilación aberrante del DNA en loci específicos: genes de impronta, genes críticos para la espermatogénesis y regiones del DNA repetitivo (8). Varios

estudios sobre genes candidatos han demostrado una asociación entre parámetros seminales anormales y una metilación aberrante del DNA en genes de impronta (18). Uno de los análisis referenciados por Hassani et al., 2022 sobre metilación de todo el genoma realizado en hombres infértiles y fértiles reportó que cambios de metilación en varios genes se relaciona con un menor recuento y motilidad de los espermatozoides. Otra publicación en la que se analizó aberraciones de metilación en el DNA espermático reportó unos niveles de metilación más altos en hombres infértiles idiopáticos en comparación con hombres fértiles. Una hipometilación de H19 se asoció con unos parámetros deficientes del semen. Otros estudios también mencionados en este artículo han informado que los niveles de expresión de TET1-3 son fundamentales para la fertilidad masculina, y que las modificaciones en el patrón de 5hmC en los espermatozoides está asociada con la infertilidad masculina (18). Otros autores han informado variaciones de DNMT3A y DNMT3L en pacientes infértiles con anomalías en la metilación del DNA espermático en loci de impronta (8).

En cuanto a las modificaciones de las histonas, un grupo de investigadores han encontrado en muestras de semen anormales alteraciones en las modificaciones de las histonas en comparación con muestras de semen normales. Por ejemplo, defectos en el reemplazo o en las modificaciones de las histonas pueden derivar en azoospermia, oligospermia o teratozoospermia. En general, desviaciones en el código de histonas se han relacionado con una incompetencia de los espermatozoides y una disminución de la fertilidad (8).

Por último, se ha estudiado la remodelación de la cromatina y los RNA no codificantes. La remodelación de la cromatina es un proceso mediante el cual los espermatozoides empaquetan grandes cantidades de DNA en un núcleo pequeño. Esta compactación, se ha visto que se correlaciona positivamente con la motilidad, la concentración y la viabilidad. Por otro lado, son muchos los lncRNA que se han identificado potenciales para el desarrollo de los espermatozoides y la infertilidad masculina, pero solo unos pocos han sido realmente caracterizados en espermatozoides diferenciados. Por ejemplo, el gen DMR (relacionado con DMRT1) se dirige a los RNAm (*messenger RNA*; RNAm) de DMRT1, un factor de transcripción relacionado con el desarrollo de células germinales y con la diferenciación de espermatogonias y Sgpa-

lncRNA1/2, que tiene un papel importante en la preservación de la pluripotencia de las espermatogonias. Aunque se han detectado en espermatozoides, ambos se expresan en espermatogonias inicialmente. En cuanto a los sncRNAs, se han comenzado a caracterizar miRNA en la regulación de la espermatogénesis humana. Se ha visto la producción de muchos miRNA involucrados en la preservación del nicho de las espermatogonias, así como miRNA que promueven la diferenciación de las espermatogonias. También se producen miRNA que regulan procesos de apoptosis, el reordenamiento de la cromatina, la maduración de los espermatozoides o la transcripción de proteínas de transición y genes protamina (8).

5.3.6 FACTORES EXTERNOS Y VARIACIONES DEL DNA ESPERMÁTICO EN HUMANOS

Es bien conocido que el estilo de vida puede influir en la predisposición de ciertas enfermedades tales como la diabetes tipo 2, la obesidad, el cáncer, etc. Estudios recientes han evidenciado que el estilo de vida de una generación puede modificar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas en generaciones posteriores debido a los efectos parentales. Las modificaciones epigenéticas de los gametos influenciadas por el ambiente permiten explicar la transmisión de la plasticidad del desarrollo entre generaciones. Son muchas las limitaciones existentes para estudiar los factores ambientales sobre el epigenoma del ovocito, siendo más conocidos estos efectos sobre el epigenoma espermático (19). Cabe destacar que las modificaciones epigenéticas afectan en mayor proporción a células germinales más que a espermatozoides, ya que poseen una cromatina altamente condensada y más resistente a las perturbaciones externas (17).

5.3.6.1 EDAD

Ciertos estudios han reportado un aumento de la metilación del DNA espermático con la edad. Además, se ha visto que las variaciones del epigenoma en espermatozoides humanos asociadas a la edad están relacionadas con genes implicados en enfermedades neuropsiquiátricas en la vida adulta. En una investigación realizada en ratones referenciada por Joan Blanco y su grupo comparó la metilación de todo el genoma de los espermatozoides de ratones jóvenes y ratones viejos y se observó que

los descendientes de padres de edad avanzada tenían mayor número de anomalías de metilación del DNA, similares a las observadas en el espermatozoides paterno. Estas anomalías de metilación, asimismo, estaban implicadas en la desregulación transcripcional de genes relacionados con el autismo y la esquizofrenia (17).

5.3.6.2 OBESIDAD

La obesidad puede provocar infertilidad por diferentes causas. Es un hecho que la obesidad provoca una mayor incidencia de epimutaciones espermáticas, por lo que hay quienes lo consideran un factor que contribuye a la infertilidad masculina. Se han detallado diferencias de metilación del DNA espermático en CpG específicos de genes de impronta en hombres con sobrepeso en comparación con hombres con peso normal. También se ha visto diferencias en la expresión de RNA no codificantes pequeños en un estudio del epigenoma de espermatozoides de hombres delgados y obesos (17). En un estudio animal mencionado por Donkin et al., 2018 sobre obesidad inducida por dieta en los padres, se observó que una dieta alta en grasas reprograma el epigenoma de los espermatozoides (19). Otros autores han observado que la obesidad también altera la acetilación de histonas (17).

Se cree que la razón por la que la obesidad impulsa alteraciones epigenéticas es resultado de varios factores: una de las causas que más peso tiene son las alteraciones endocrinas. La obesidad se ha asociado con hipogonadismo, de manera que se crea un microambiente alterado en el testículo que puede provocar cambios en el desarrollo normal del epigenoma del espermatozoide. Otros estudios han teorizado que las variaciones en el epigenoma relacionadas con la obesidad se deben a un aumento de la temperatura escrotal, lo que lleva a una hipertermia testicular y la producción posterior de especies reactivas de oxígeno. El daño al DNA inducido por el estrés oxidativo podría alterar la función de DNMT dando lugar a alteraciones en la metilación del DNA. La producción de ROS se ha asociado tanto a hipometilación como a hipermetilación del DNA (17).

5.3.6.3 ALTERADORES ENDOCRINOS

Los alteradores endocrinos (*Endocrine Alteradors*; DE) son un conjunto heterogéneo de sustancias químicas exógenas que pueden mimetizar o antagonizar las funciones de las hormonas endógenas afectando a la salud reproductiva (20). En

modelos animales se ha visto que la exposición a altas dosis de DE provoca enfermedad testicular y ovárica. Los DE actúan en el momento de la reprogramación del epigenoma de la célula germinal por lo que diversos autores han asociado la exposición a DE con una perturbación del epigenoma espermático, alterando la metilación del DNA y por tanto, en problemas de fertilidad (17). Algunos de los DE estudiados son el fungicida vinclozolin que se ha asociado a patrones aberrantes de metilación del DNA que los espermatozoides transmiten a generaciones futuras, induce la apoptosis de las células germinales primordiales reduciendo la fertilidad masculina y altera los patrones de ncRNA. La carbendazim y el clorotalonil (dos fungicidas) a dosis bajas interrumpen la espermatogénesis por una alteración de la metilación global de DNA y la metilación de histonas, según un estudio realizado en ratones. Análisis realizados tanto en animales como en humanos sugieren que los DE pueden interferir con la maduración de la cromatina espermática, por ejemplo, vinclozolin o BPA (*bisphenol A*: BPA) presentan una morfología del DNA espermático alterada como consecuencia de una cromatina alterada. También se ha observado en humanos una descondensación severa de la cromatina luego de la exposición a p,p'-DDE (*Dichlorodiphenoxydichloroethylene*: p,p'-DDE). En otros estudios, se ha visto que según el tiempo de exposición de BPA existen cambios la acetilación de determinadas histonas, por ejemplo, la exposición leve a BPA aumenta los niveles de H3K27, mientras que la exposición prolongada aumenta los niveles de H3K9. Por otro lado, disminuye los niveles de RNAm de DNMT1 así como los niveles de H3K7me (20). La exposición de compuestos derivados del plástico como BPA, bis(2-etilhexil)ftalato y dibutilftalato (DBP) a varias generaciones de machos y se asoció con una metilación diferencial en 197 promotores (19). La atrazina, que es un herbicida, se ha observado en ratones que provoca una disminución global de H3K4Me3 y una desregulación de la transcripción, causando errores en la meiosis y en la espermatogénesis y reduciendo la producción de espermatozoides (19).

En la tabla 2 se presenta un resumen de los DE tratados y sus efectos en el epigenoma de los espermatozoides y en la infertilidad masculina.

ALTERADOR ENDOCRINO	EFFECTO EN EL EPIGENOMA DE LOS ESPERMATOZOIDES	EFFECTO SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA
BPA	Aumenta los niveles de H3K27Ac y K3K9. Disminuye los niveles de H3K27me3. Altera la estructura de la cromatina del DNA espermático. Produce una metilación diferencial de 197 promotores. Altera la metilación del promotor del receptor de estrógenos alfa.	Disminuye la calidad espermática. Altera la espermatogénesis. Inhibe la replicación del DNA conduciendo a su apoptosis y a estrés oxidativo.
Atrazina	Disminuye los niveles de H3K4Me	Error en la meiosis espermática. Desregulación de la transcripción en espermatozoides. Disminuye la producción de espermatozoides.
Vinclozolin	Induce apoptosis de células germinales primordiales. Produce un patrón diferencial de metilación del DNA. Altera ncRNA.	Disminuye la fertilidad.
Carbendazima y clorotalonin	Altera la metilación global del DNA espermático. Altera la metilación de ciertas histonas.	Interrumpe la espermatogénesis.
p,p'-DDE	Descondensa la cromatina	
DEP y DBP	Produce una metilación diferencial de 197 promotores.	

Tabla 2. Resumen de los efectos de los alteradores endocrinos en el epigenoma y en la fertilidad masculina. Diseño propio.

5.3.6.4 ALCOHOL

La asociación entre el consumo de alcohol y la infertilidad masculina sigue siendo controvertida, sí se ha demostrado que el consumo de alcohol ejerce un efecto perjudicial sobre la integridad del DNA a causa del daño oxidativo inducido por su ingesta. Las variaciones en el DNA por ingesta de alcohol se han observado a nivel de

metilación debido a las ROS que se producen, observándose asimismo, disminuciones en la actividad DNMT1 (18).

5.3.6.5 TABACO

Con el tabaco ocurre lo mismo que con el alcohol, no se ve una clara relación entre el consumo de cigarrillos y la infertilidad masculina, aunque sí existe una asociación clara entre fumar tabaco y la generación de ROS durante la espermatogénesis, produciéndose una alteración en la integridad del DNA espermático. Entre los daños ocasionados en el DNA se observan efectos marginales en la metilación del DNA. La exposición crónica al tabaco también provoca una proporción elevada de histonas frente a protaminas, una mayor acetilación global de ciertas histonas y la metilación anormal de genes de impronta (21).

En la tabla 2 se presenta un resumen de los factores externos que pueden afectar al epigenoma de los espermatozoides.

FACTORES EXTERNOS	EFEECTO EN EL EPIGENOMA DE ESPERMATOZOIDEOS
Edad	Aumenta la metilación del DNA espermático, Variaciones del epigenoma en espermatozoides humanos se asocia con enfermedades neuropsiquiátricas en la vida adulta. En ratones desregulan la transcripción de genes relacionados con autismo y esquizofrenia.
Obesidad	Altera la metilación del DNA en islas CpG de genes de impronta. Diferente expresión de ncRNA al comparar con normopeso. Defectos en la reprogramación epigenética. Altera la acetilación de histonas.
Alteradores endocrinos	Perturban el epigenoma espermático: altera la metilación del DNA y la metilación y acetilación de las histonas. Interfieren en la maduración de la cromatina espermática.
Alcohol	Altera metilación del DNA por daño oxidativo por la generación de ROS. Disminuye la actividad DNMT1.
Tabaco	Efectos marginales en la metilación del DNA Eleva la proporción de histonas frente a protaminas Mayor acetilación de histonas Metilación anormal de genes de impronta

Tabla 3. Tabla resumen de los factores externos y sus efectos sobre el epigenoma espermático. Diseño propio.

6. CONCLUSIONES

Se ha visto en esta revisión que los embriones generados mediante TRA padecen una mayor incidencia de errores epigenéticos y trastornos de impronta que los pacientes concebidos de forma natural. La estimulación ovárica, así como la manipulación de los embriones (FIV, ICSI, congelación, DGP) pueden afectar a la reprogramación epigenética. De entre estos procesos, la COS puede ser determinante en estas alteraciones al coincidir con la maduración ovocitaria y el establecimiento de los patrones de impronta. Otra de las TRA que puede tener mayor impacto sobre el embrión es la ICSI. Sin embargo, aunque en modelos animales se haya estudiado, no se puede concluir con certeza que estas alteraciones se deban a las TRA o los factores intrínsecos de los progenitores, ya que en humanos es mucho más complicado estudiar los patrones de metilación de embriones y ovocitos. Lo que sí se ha visto es una asociación entre la infertilidad en hombres y alteraciones epigenéticas en el semen. Además, estos errores se ven agravados cuando el hombre está expuesto a ciertos factores como la obesidad, los alteradores endocrinos, el tabaco y el alcohol, siendo preocupante la edad paterna en estos fallos al haberse observado una relación entre la edad paterna avanzada y ciertas enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia y el autismo. De entre los trastornos de impronta estudiados en esta revisión, el que más se ha asociado positivamente a TRA ha sido BW, aunque se ha visto que AS, BW, PWS y SRS se dan con mayor incidencia en descendencia concebida mediante TRA.

Es primordial entender la importancia de los cambios epigenéticos en la fertilidad, así como intentar minimizar al máximo posible la manipulación embriones. Además, como directrices futuras sería conveniente aumentar el número de estudios epidemiológicos y de metilación global del genoma para evaluar las implicaciones de las TRA en la salud durante el parto y durante la vida adulta posterior.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Wallace SE, Bean LJ. Resources for Genetics Professionals — Epigenetic Signature Analysis [Internet]. GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle; 2019 [citado 20 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550348/>
2. Sánchez Freire P, Herrera Martínez M, Rodríguez Rivas M. ¿Sabes qué es la epigenética? *Medicentro Electrónica*. marzo de 2013;17(1):40-2.
3. Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertility and Sterility*. 1 de marzo de 2013;99(3):607-15.
4. Chen Z, Zhang Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. *Annu Rev Biochem*. 20 de junio de 2020;89:135-58.
5. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. septiembre de 2017;18(9):517-34.
6. Tollefsbol TO. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics [Internet]. San Diego, UNITED STATES: Elsevier Science & Technology; 2017 [citado 27 de abril de 2022]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/ueurmad/detail.action?docID=4910280>
7. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, et al. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1283:1-16.
8. Camprubí y Blanco. Epigenetic and Assisted Reproduction. An introductory guide. N°1. CRC Press; 2018. 202 p. (1).
9. Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine*. 1 de julio de 2013;34(4):826-40.
10. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3-55.
11. Kopca T, Tulay P. Association of Assisted Reproductive Technology Treatments with Imprinting Disorders. *Glob Med Genet*. marzo de 2021;8(1):1-6.
12. Osman E, Franasiak J, Scott R. Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. *Semin Reprod Med*. mayo de 2018;36(3-04):e1-9.
13. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction - ScienceDirect [Internet]. [citado 17 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521693417301153?via%3DiHub>

14. Sciorio R, El Hajj N. Epigenetic Risks of Medically Assisted Reproduction. *J Clin Med*. 12 de abril de 2022;11(8):2151.
15. Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, et al. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenetics*. 10 de agosto de 2020;12:121.
16. Cortessis VK, Azadian M, Buxbaum J, Sanogo F, Song AY, Sriprasert I, et al. Comprehensive meta-analysis reveals association between multiple imprinting disorders and conception by assisted reproductive technology. *J Assist Reprod Genet*. junio de 2018;35(6):943-52.
17. Blanco Rodríguez J, Camprubí Sánchez C. Epigenetic Transgenerational Inheritance. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1166:57-74.
18. Hassani HH, AL-Jumaily RMK, Lafta FM. Epigenetics in Male Infertility [Internet]. *Male Reproductive Anatomy*. IntechOpen; 2021 [citado 6 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id>
19. Donkin I, Barrès R. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Mol Metab*. 27 de febrero de 2018;14:1-11.
20. Cescon M, Chianese R, Tavares RS. Environmental Impact on Male (In)Fertility via Epigenetic Route. *J Clin Med*. 5 de agosto de 2020;9(8):2520.