



Revista Med

ISSN: 0121-5256

revista.med@umng.edu.co

Universidad Militar Nueva Granada

Colombia

Gómez, Luis Miguel; Páez, María Carolina; Anaya, Juan-Manuel
Epigenética y epigenómica de la artritis reumatoide
Revista Med, vol. 14, núm. 1, julio, 2006, pp. 48-60
Universidad Militar Nueva Granada
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91014108>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

EPIGENÉTICA Y EPIGENÓMICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

LUIS MIGUEL GÓMEZ¹, MARÍA CAROLINA PÁEZ¹ Y JUAN-MANUEL ANAYA^{1,2*}

Resumen

Los mecanismos epigenéticos, como son las modificaciones del DNA y las histonas, dan como resultado un silenciamiento heredable de los genes, sin cambios en la secuencia codificante. A pesar que el estudio de las enfermedades humanas se ha centrado principalmente en mecanismos genéticos, una alteración en la red de eventos epigenéticos puede causar varias patologías, entre las cuales se encuentran el cáncer, síndromes de inestabilidad cromosómica y enfermedades autoinmunes (EAI). Estudios recientes en epigenética, que incluyen la metilación del DNA y sus respectivas enzimas reguladoras, podrían contribuir a la comprensión de la fisiopatología de EAI como la artritis reumatoide (AR). En este artículo se revisa la importancia de la metilación del DNA en la AR, en especial la hipometilación. Existe un gran potencial en el desarrollo de "terapia epigenética" y varios inhibidores de las enzimas que controlan estos procesos, específicamente las DNA metiltransferasas y las deacetilasas de histonas, podrían ser una esperanza para el tratamiento de la AR.

Palabras clave: artritis reumatoide, epigenética, metilación.

EPIGENETICS AND EPIGENOMICS OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Abstract

Epigenetic mechanisms, which involve DNA and histone modifications, result in the heritable silencing of genes without a change in their coding sequence. The study of human disease has focused on genetic mechanisms, but disruption of the balance of epigenetic networks may lead to several major pathologies, including cancer, syndromes involving chromosomal instabilities, and autoimmune diseases. Recent studies on epigenetics, including DNA methylation and its regulatory enzymes, could contribute to the understanding of the rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. Herein, we review the DNA methylation and its importance in RA. Several studies have indicated the importance possible of DNA methylation, especially hypomethylation, in the etiology of RA. As a corollary, epigenetic therapy which includes several inhibitors of enzymes controlling epigenetic modifications, specifically DNA methyltransferases and histone deacetylases, could be a promising treatment of RA.

Key words: rheumatoid arthritis, epigenetic, methylation.

¹ Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín Colombia, ² Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

* Dirección electrónica para correspondencia: janaya@cib.org.co

Dirección postal: Corporación para Investigaciones Biológicas, Cra. 72A # 78B-141, Medellín, Colombia.

Recibido: Abril 6 de 2006. Aceptado: Mayo 17 de 2006.

Introducción

La epigenética involucra todos los mecanismos que dan lugar a una expresión genética diferencial en células especializadas, que no depende directamente de cambios en la secuencia de DNA¹. Dentro de los procesos más estudiados en este campo, se encuentran la metilación del DNA y la acetilación de las histonas², procesos que contribuyen a la regulación de las vías inmunológicas involucradas en la fisiopatología de la artritis reumatoide (AR). Estos avances han generado el espacio para el estudio de diversos medicamentos, que basados en terapia epigenética, buscan modular la respuesta inflamatoria en enfermedades autoinmunes como la AR. Este artículo revisa algunos conceptos básicos sobre epigenética y su impacto en la etiopatogenia de la AR, identificando finalmente algunas de las principales herramientas terapéuticas descritas en este campo. La metilación del DNA es el proceso epigenético mejor estudiado y entendido, aunque también se pueden incluir modificaciones etil, acetil, fosforil y otras alteraciones de las histonas. Una de las posibles explicaciones funcionales de los cambios epigenéticos del genoma, es que proveen mecanismos por los cuales un organismo puede responder al medio ambiente sin cambiar el DNA. Por lo tanto, algunos autores han comparado a la genética como el “hardware” y a la epigenética como el “software”³. Los cambios epigenéticos son

sensibles al ambiente, como se evidencia en el locus Agutí, que determina un tipo de color en ratones, los cuales, a pesar de ser idénticos genéticamente, pueden poseer cambios en la metilación del DNA⁴. Así mismo, el estudio de la epigenética explica, por lo menos en parte, la contribución que tiene el medio en las enfermedades complejas.

Metilación del DNA

La metilación del DNA es uno de los mecanismos de supresión de la expresión génica y el principal regulador de los genomas *in vivo*. En mamíferos, la metilación del DNA se refiere a la inserción de un grupo metilo (CH_3) en la base nitrogenada citosina. De una manera detallada, es el cambio de la base deoxycitosina (dC) en la posición 5' para formar deoxymetilcitosina (d^mC), en presencia de un sustrato que dona los grupos metilo y una enzima que se encarga de transferir dichos grupos (Figura 1). Las d^mC se encuentran en los dinucleótidos CG, secuencias que en 70-80% se hallan metiladas. Muchas secuencias CGs llamadas islas CpG (por encontrarse en grupos y unidas por grupos fosfato), no están metiladas en su mayoría. Las islas CpG contienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción y actúan como promotores; aproximadamente la mitad de los genes están asociados a islas CpG⁵.

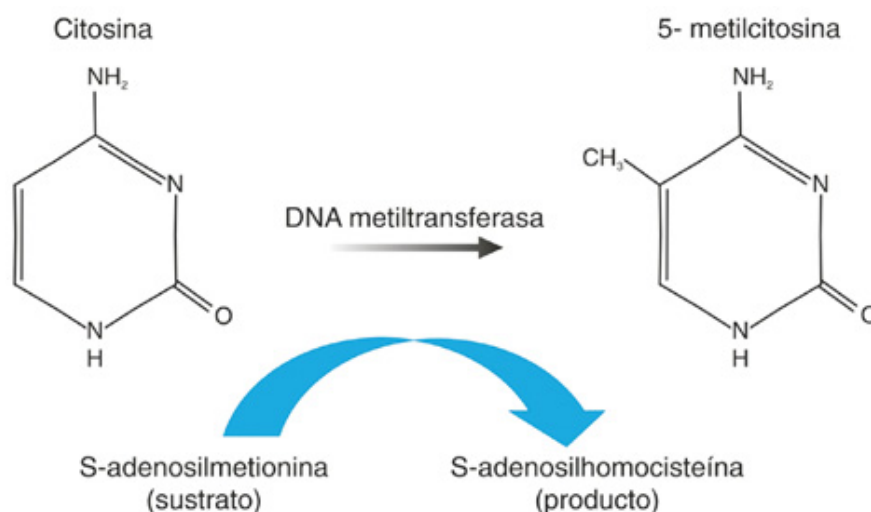


FIGURA 1. Metilación de la citosina. La DNA metiltransferasa cataliza la transferencia de grupos metilo del sustrato S-adenosilmetionina a la citosina, produciendo 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína.

La metilación del DNA es mediada por una familia de proteínas llamadas DNA metiltransferasas (Mtas) que incluyen Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. La Dnmt1 es una enzima de mantenimiento que sostiene la metilación a través de las divisiones celulares, es decir, metila a partir de cadenas de DNA hemimetiladas. La Dnmt3a y la Dnmt3b, son capaces de metilar DNAs que no estaban metilados, mecanismo que se conoce como metilación *de novo*⁶.

La importancia de la metilación en la homeostasis es evidenciada por las diferentes patologías que ocasiona cuando existe alguna falla en dicho proceso. Las funciones de la metilación del DNA y sus implicaciones en patología son resumidas en las tablas 1 y 2. En la Figura 2 se ilustran los mecanismos por los cuales la metilación inhibe la transcripción^{7,8}.

TABLA 1. Funciones de la metilación del DNA

Funciones metilación del DNA	Mecanismo de acción explicado por metilación
Diferenciación celular	Está implicado en la diferenciación Th1-Th2 de los linfocitos T
Impronta genética	Solo alguno de los dos alelos es expresado, sea del padre o de la madre
Inactivación del cromosoma X	En las mujeres una de las dos copias del cromosoma X está inactivado para garantizar una igual dosis génica entre hombres y mujeres
Supresión de DNA parásitos	Elementos de DNA móviles como retrotransposones son inactivados, la metilación también es un mecanismo de defensa
Supresión de la transcripción	Físicamente, los factores de transcripción no pueden unirse a los promotores

TABLA 2. Alteraciones en la metilación del DNA

Enfermedad	Mecanismo de acción
Síndrome de Rett	Deficiencia de MeCP-2
Síndrome ICF	Deficiencia de Dnmt3b
Síndrome de PW	Error en la impronta genética
Síndrome de Angelman	Error en la impronta genética
Síndrome de BW	Error en la impronta genética
Síndrome de fragilidad del X	Metilación anormal del cromosoma X, expansión de la metilación en la repetición CGG de la región 5'UTR del gen FMR1
α -Talasemia	Anemia, metilación de la isla CpG en la α -globina, deficiencia de HBA1 y HBQ1
Síndrome ATR-X	Mutaciones en el gen ATR-X, hipometilación de ciertas repeticiones y secuencias satélites del genoma
Cáncer	Hipometilación: aumento en la expresión de proto-oncogenes, translocaciones cromosómicas y mutaciones. Hipermetilación: inactivación de genes supresores de tumores
LES inducido por medicamentos	Hipometilación de genes de células T por medicamentos como procainamida e hidralazina
LES idiopático	Hipometilación de genes de células T

Abreviaciones: MeCP2: Proteínas de unión a citosinas metiladas; ICF: síndrome de Inmunodeficiencia-inestabilidad centromérica y anomalías faciales; Dnmt: DNA metiltransferasas; PW: síndrome de Prader Willi; BW: Síndrome de Beckwith-Wiedemann; FMR1: gen del retraso mental del X frágil 1; UTR: regiones no traducidas; HBA1: Hemoglobina Alfa 1; HBQ1: Hemoglobina Theta 1; ATR-X: Alfatalesmia/ Síndrome de retraso mental ligado a X, LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

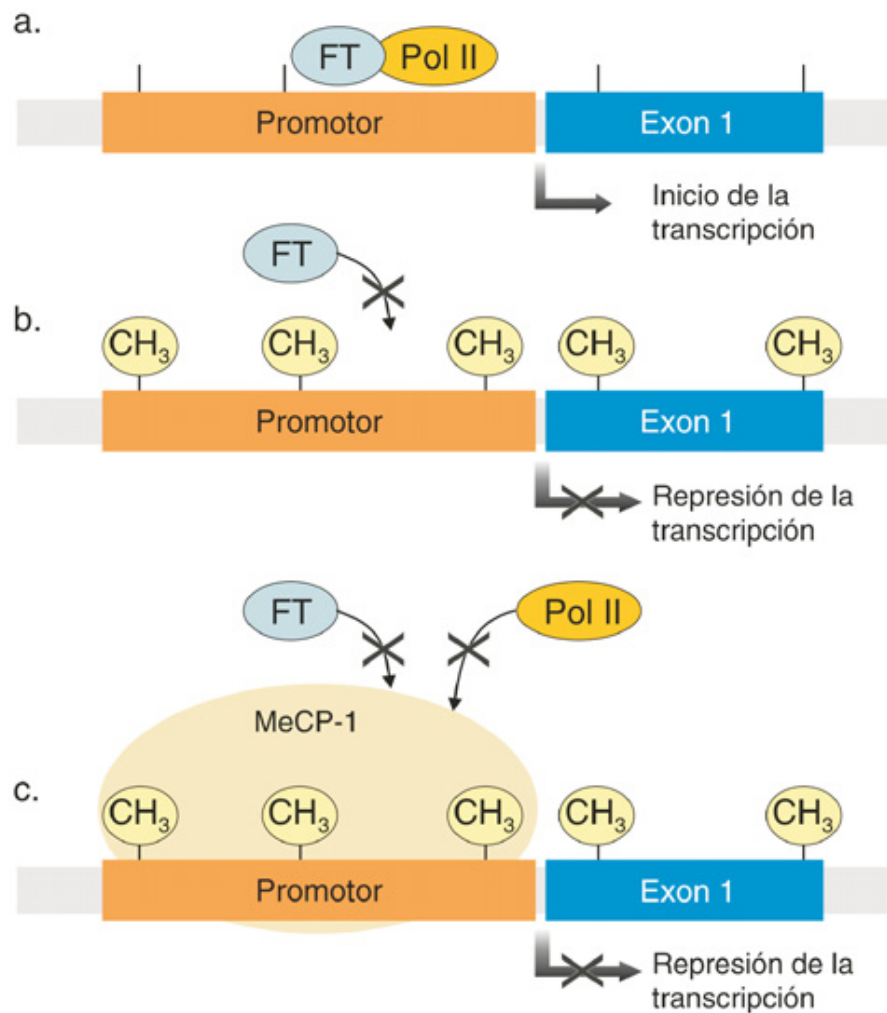


FIGURA 2. Mecanismos de represión transcripcional mediada por citosinas. **a.** En ausencia de metilación, la región promotora está permisible a la unión del factor de transcripción (FT) y de la RNA polimerasa II (Pol II) para iniciar el proceso de transcripción. **b.** La presencia de 5 metilcitosina en el promotor inhibe la unión de los factores de transcripción, como el Ap-2, el E2F y NFκB. **c.** El represor transcripcional específico MeCP-1 interactúa con la 5 metilcitosina e interfiere igualmente con la unión de los FT y la Pol II a la secuencia blanco

Demetilación

La demetilación del DNA comprende dos mecanismos, el pasivo y el activo. El mecanismo pasivo ocurre cuando la enzima Dmmt1 es incapaz de metilar el DNA recientemente sintetizado durante la replicación. Este es el mecanismo por el cual 5-azaC, un inhibidor reversible de las metilasas, produce hipometilación del DNA, y algunas proteínas de unión al DNA pueden bloquear la metilación

de las citosinas en la fase S (síntesis) del ciclo celular⁹. El mecanismo activo involucra las demetilasas, las cuales ayudan a remover grupos metilo de los residuos d^mC y actúan en expresión de genes que no están involucrados con la división celular; un ejemplo de esta clase de enzimas es la DNA glicosilasa 5-metilcitosina (5-MCDG), que es dependiente de RNA para realizar su función de remover grupos metil. Ambos, enzima y RNA, existen en forma de complejos largos que contienen RNA

helicasa y una enzima reparadora con actividad glicosilasa^{10,11}.

Estructura de la cromatina

La estructura de la cromatina en los nucleosomas es un importante regulador de la expresión génica y en unión con la metilación del DNA y la acetilación de las histonas, proporcionan el control de la misma. La cromatina abierta o eucromatina es señal de expresión génica y se explica en parte por la accesibilidad del aparato de transcripción (FT y Pol II) a las zonas promotoras de los genes. La cromatina cerrada o heterocromatina frecuentemente se asocia con la represión de la transcripción¹².

Acetilación de las histonas

La acetilación de las histonas es el mecanismo por el cual estas adquieren grupos acetilo en los aminoácidos de cadenas laterales que están en contacto con el DNA. La acetilación se da específicamente en el aminoácido "lisina" en la región N-terminal de las histonas H3 y H4 en las porciones centrales de los nucleosomas; esta reacción es catalizada por la enzima acetilasa de histonas y el efecto final de la reacción es limitar las interacciones entre H3 y los residuos ácidos de las histonas H2A y H2B, favoreciendo la apertura de la cromatina y por lo tanto, el aumento en la expresión génica. De otro lado, las desacetilasas de histonas (HDAC) desacetilan las lisinas, llevando a la condensación de la cromatina¹³. Los procesos de metilación y acetilación trabajan de manera sinérgica, ya que la proteína MeCP2 se une a CpGs metiladas y reúne a las desacetilasas de las histonas^{14,15}. Además, la Dnmt1 trabaja asociada a la desacetilasa de histonas¹⁶.

En modelos experimentales, al evaluar la memoria y flexibilidad en el patrón de expresión de genes de citoquinas como propiedades particulares de los linfocitos Th1 y Th2, Mecí y col. evidenciaron *in vitro*, que células T de memoria nativas (CD4⁺), poseen un patrón no selectivo de hiperacetilación de histonas en el promotor de los genes que codifican para IL-4 e IFN- γ , contrario a lo observado en células T de memoria efectoras, las cuales se pueden diferenciar por un patrón de acetilación

polarizante Th1 (hiperacetilación del promotor del gen IFN- γ) o Th2 (hiperacetilación del promotor del gen IL4). Aunque este hallazgo pudiese parecer excluyente, en condiciones favorables el perfil de acetilación puede ser modificado y por ende la expresión génica de estos marcadores, lo que evidencia que este efecto aunque determinante, no es irreversible y podría actuar como modulador de las respuestas inmunológicas presentadas en diferentes entidades inflamatorias y autoinmunes¹⁷.

Epigenética y medio ambiente

El níquel y el arsénico son potentes carcinogénicos, sin embargo, su asociación con AR no se ha investigado. El efecto epigenético del níquel (Ni) fue evidenciado en la heterocromatina; dentro del núcleo, el Ni se une selectivamente a la heterocromatina, ya que contiene más relación proteína/DNA y por lo tanto, más sitios potenciales de unión¹⁸. El Ni se une tanto a histonas como a otras proteínas y en especial a la histona H1¹⁹. Otros sitios de unión han sido demostrados en puntos específicos, como en las histonas H2A y H4. El efecto epigenético del arsénico necesita del mismo sustrato que usan las Dnmtasas, por lo tanto compite por el sustrato y los genes que deberían ser metilados, quedan hipometilados. Por lo general, dichos genes son reguladores de la proliferación celular²⁰.

Metilación en el sistema inmune

El descubrimiento de la metilación del DNA se realizó en timo de becerros en 1948²¹. Posteriormente, los estudios en metilación han beneficiado enormemente el entendimiento de la epigenética en el sistema inmune. La metilación controla varios procesos homeostáticos como la hematopoyesis, competencia inmune, autoinmunidad, repertorio de receptores de antígenos, reactividad antigénica, ciclos de vida virales, vigilancia de células tumorales y cambios en el sistema inmune relacionados con la edad. La accesibilidad de los genes para el receptor de célula T (TCR) y el receptor de célula B (BCR) influyen en el repertorio que presentan dichos receptores y dependen en gran parte, de la regulación epigenética, específicamente en la tasa de metilación/demetilación del DNA.

La metilación y demetilación dinámica del DNA, regulan el desarrollo de diferentes líneas de células T, activan, diferencian y vuelven a expresar moléculas co-receptoras de CD4+, CD8+, expresan citoquinas tipo interleuquina 2 (IL-2), IL-4, e IFN- γ y diferencian células T CD4+ vírgenes, ya sea a Th1 o Th2²².

En la regulación del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC Clase II), la metilación juega un papel importante a través del gen transactivador clase II (CIITA)²³, en respuestas antígeno-específicas, tumorales y de autoantígenos. Claramente la metilación controla aspectos claves del sistema inmune periférico, en el desarrollo de células específicas del contexto y de la actividad requerida del momento. En la parte inicial de este capítulo se comentaba que los cambios epigenéticos eran más rápidos que los cambios genéticos del DNA, de acuerdo con esto, el sistema inmune ha tomado esta herramienta para poder ponerse a tono con los desafíos del medio (Figura 3).

Proteínas de varios virus que son altamente inmunogénicas son mantenidas en un estado silente,

por mecanismos de latencia reversible de las regiones promotoras virales, facilitando que no sean reconocidos por células T citotóxicas²⁴⁻²⁶.

El sistema inmune reconoce como extraños dinucleótidos CG que no están metilados, los cuales pueden activar tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Nucleótidos sintéticos no metilados (ODNs) se han ensayado para modular actividades inmunológicas, y dos clases de ellos, el tipo K y el tipo D se han trabajado para estimular células de sangre periférica, con el objetivo de mirar su comportamiento y ser usados en adjuvantes para vacunas y como terapia potencial de cáncer, asma y alergia²⁷.

Niveles exagerados en metilación del DNA estimulan el desarrollo de células T autorreactivas y por lo tanto, de AR. Inhibidores exógenos de la metilación de células T, como procainamida (medicamento usado en arritmias cardíacas) e hidralazina (medicamento usado en crisis hipertensivas) provocan una enfermedad tipo lupus eritematoso sistémico (LES), o también coinciden con varias de las manifestaciones clínicas del LES idiopático. Estos tra-

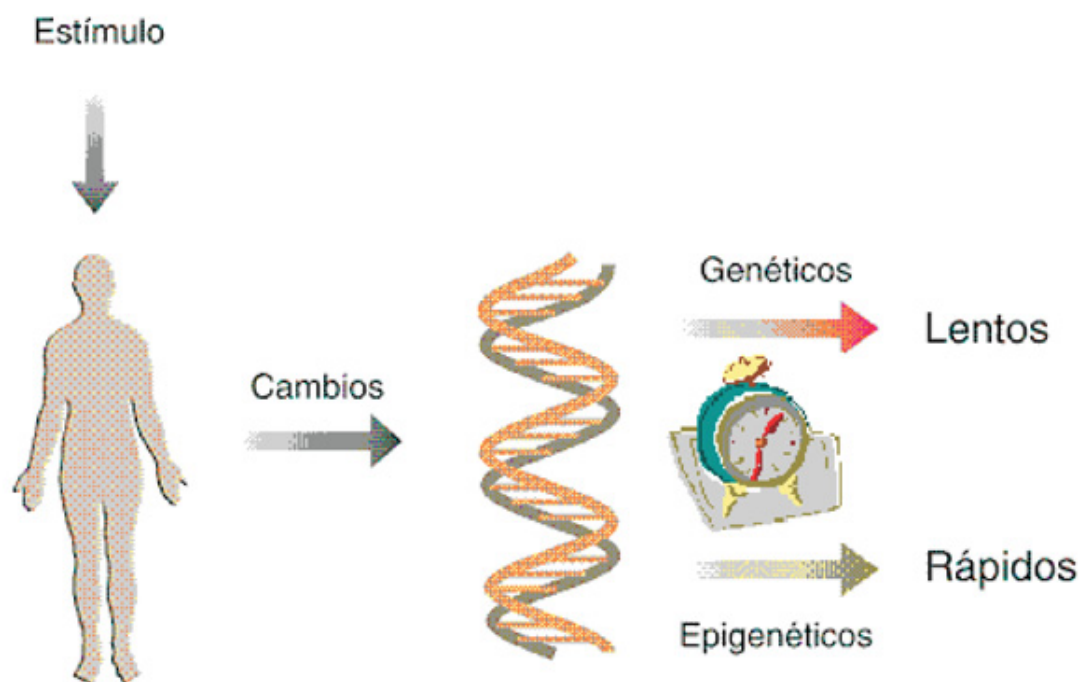


FIGURA 3. Los cambios genéticos del DNA son más lentos que los cambios epigenéticos

tamientos causan expresión anormal de genes claves en autoinmunidad y reducen la cantidad de células CD4+, posiblemente también disminuyan la producción de células T reguladoras²⁸.

La hipometilación de células T *in vivo* causa producción de anticuerpos anti-DNA a través de la estimulación de las células B, con implicaciones letales para macrófagos y en general para células presentadoras de antígenos (CPA). Estos efectos pleiotrópicos sobre la respuesta inmune son explicados, en parte, por niveles alterados en las moléculas de adhesión y por una disminución en la limpieza de cuerpos apoptóticos, debido al poco número de CPAs²⁹.

La hipometilación del DNA podría estar contenida en enfermedades autoinmunes como AR, escleroderma y síndrome de Sjögren. Al respecto, ensayos en modelos murinos para dichas patologías han mostrado una tasa de metilación menor en relación a la de ratones normales³⁰.

Metilación y AR

Un resumen de los estudios realizados en metilación y autoinmunidad en orden cronológico, es ilustrado en la Tabla 3.

En el LES se produce un aumento en la autorreactividad celular, debida en parte a moléculas de adhesión tipo LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos), involucrada en la activación celular T, la cual puede ser inducida en el laboratorio por el agente 5-azaC. El aumento en la expresión de LFA-1 parece ser suficiente para causar autorreactividad, como se observó en un estudio en pacientes con LES (45) y la transferencia de clones de células T tratadas con este agente puede causar en ratones varias manifestaciones, como anticuerpos anti-DNA, glomerulonefritis por inmunocomplejos, daños en el sistema nervioso central y alveolitis pulmonar^{37,38}. Parece ser que en el suero de los pacientes con LES se potencia la activación hacia metilación^{32,46}. En ratones la metilación de genes del timo y de nódulos linfáticos disminuye con la edad, contrario a lo que sucede en el bazo, en donde la metilación se incrementa, llevando a progresión de la enfermedad⁴⁷.

Hace más de un década \o “Click to search for citations by this author.” Richardson B y col., incursionaron el papel de la metilación en las enfermedades autoinmunes y su modulación farmacológica⁴⁸. En su trabajo evidenciaron como la procainamida y la hidralazina inhiben la metilación del DNA e inducen clones de CD4+ autorreactivos, hallazgo que apoya lo descrito en estos fármacos como inductores de síndromes autoinmunes; además evidenciaron una alterada metilación del DNA en pacientes con AR y LES⁴⁸.

En concordancia, Corvetta y col. apoyaron el papel de la hipometilación del DNA como componente importante en la fisiopatología de dichas entidades⁴⁹, determinando el porcentaje de 5-metilcitosina (m5Cyt) en sangre periférica, células mononucleares en líquido sinovial y tejido sinovial de pacientes afectados con AR y LES, comparados con controles. El porcentaje promedio de m5Cyt en individuos sanos fue significativamente más alto que en los casos; adicionalmente los pacientes con enfermedad activa presentaban más bajos niveles que los pacientes en remisión. Estos hallazgos están de acuerdo con la hipótesis que involucra la hipometilación del DNA como un factor importante en la patogénesis de la AR, determinando posiblemente una expresión alterada de genes, entre ellos oncogenes⁴⁹.

En la actualidad los trabajos en AR en este campo son muy escasos, sin embargo, cabe resaltar el papel del metotrexate (MTX), fármaco de elección para el manejo de esta entidad, en la inhibición de los procesos de transmetilación⁵⁰. En su forma natural, como poliglutamato, el MTX puede inhibir directamente la sintasa de metionina y el transporte de metionina, conduciendo a una disminución de S-adenosylmetionina, la cual reduce no solamente la metilación del RNA, DNA y fosfolípidos, sino que también restringe la síntesis de poliaminas, tales como la espermidina y espermina (Figura 4). En pacientes con AR, estos agentes tienden a acumularse en células mononucleares de sangre periférica, orina, líquido y tejido sinovial; su metabolismo por parte de los monocitos da lugar a la producción de agentes tóxicos como el peróxido de amoníaco y de hidrógeno, que pueden deteriorar la función del linfocito y por ende, influir en la fisiopatología de esta entidad⁵⁰.

TABLA 3. Metilación del DNA en autoinmunidad y AR

Autor	Resumen	Ref
Sano et al (1985)	La hipermetilación produce disminución en la expresión de moléculas HLA-DR en células B de pacientes con LES	31
Richardson et al (1986)	Clones de células T autorreactivas mediados por 5-azaC	32
Evans et al (1987)	El aumento en la expresión del proto-oncogen c-myc dependiente de hipometilación en células T MRL/lpr	33
Eleftheriades et al (1989)	La metilación no se correlaciona con el aumento en la expresión de c-myc	34
Yoshida et al (1990)	Efecto protector de 5-azaC en el desarrollo de autoinmunidad en ratones MRL/lpr	35
Shauenstein et al (1991)	Tiroiditis autoinmune en los pollos es inducida por 5-azaC	36
Quddus et al (1993)	Inducción de autoinmunidad en ratones por transferencia de células T tratadas con procainamida o 5azaC	37
Yung et al (1995)	Inducción de manifestaciones tipo lupus <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> por células de ratones que fueron tratadas con 5-azaC o procainamida	38
Mizugaki et al (1997)	Cambios en los niveles de metilación en diferentes órganos de ratones MRL/lpr con el envejecimiento	39
Deng et al (2001)	Hipometilación del DNA en células T de pacientes con LES es regulado por la vía de señalización ras-MAPK	40
Okada et al (2002)	Función importante de la hipometilación en la transcripción de HERV en LES	41
Motegi K et al (2005)	La administración <i>in vitro</i> de un agente demetilante (5-aza-2'-deoxicitidina, 5-Aza-CdR), aumenta la expresión funcional del gen que codifica para canales de agua en la membrana (aquaporin-5, AQP5) de las células ductales glandulares, generando un incremento en la secreción del fluido en glándulas de pacientes con pSS.	42
Shin HJ et al (2005)	En células T humanas la expresión o silenciamiento del gen que codifica para STAT4, esta mediado indirectamente por el grado de metilación de su promotor. Lo cual regularía la respuesta inmune, al modular la expresión de FT tejido específicos y citoquinas, como IFN-γ e IL-4 durante el desarrollo de poblaciones Th.	43
Marin J et al (2005)	En un modelo bovino, la metilación de regiones específicas del colágeno tipo II se asocia con autoinmunidad, al aumentar la especificidad de Linfocitos T-reactivos en la iniciación y desarrollo de la artritis inducida por colágeno.	44

Abreviaciones: MRL/lpr: modelo murino linfoproliferativo asociado a un defecto en la vía de Fas; LES: lupus eritematoso sistémico; 5-azaC: 5-Azacitidina; HERV: retrovirus endógenos; ras-MAPK: vía de las MAP kinasas activadas por la proteína mitogénica Ras

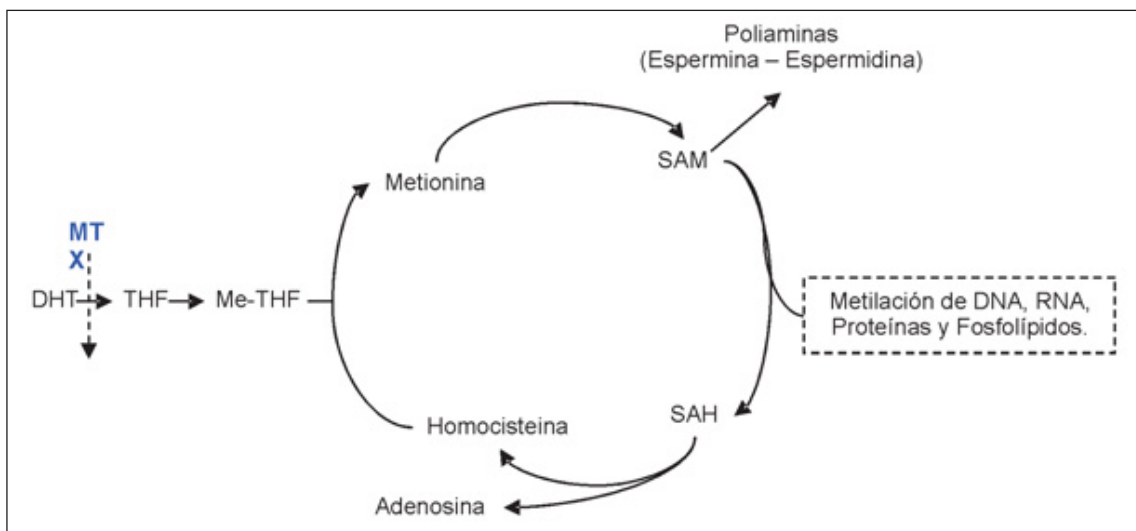


FIGURA 4. Inhibición de reacciones de transmetilación y formación de poliaminas por el metotrexate. Abreviaciones: SAM: S-Adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; Me-TH: N5-CH3-Tetrahidrofolato. TH: Tetrahidrofolato; MTX: Metotrexate; DHT: Dihidrofolato.

La revolución del bisulfito

La principal característica que ha posibilitado los estudios de metilación del DNA es su afinidad por el bisulfito de sodio. El bisulfito tiene la propiedad de unirse a la citosina (sin metilación) o a la 5-metil citosina por un proceso de deaminación y convertirlo en uracilo y timina, respectivamente⁵¹. Técnicas de biología molecular para analizar loci individuales como la PCR y clonación, no permiten detectar el grado de metilación de una secuencia dada, por lo tanto, se conoce la información genética pero la epigenética se pierde, porque queda en el genoma original, información que sí puede obtenerse por medio del bisulfito, cuyo fundamento se aprecia a continuación (Figura 5).

Terapia epigenética

El hecho de que varias enfermedades como AR, infecciosas y cáncer tengan una gran influencia epigenética, ha llevado a pensar en nuevas estrategias terapéuticas, dando lugar a una nueva rama de la medicina conocida como “terapia epigenética”. Aquellos agentes que alteran el estado de hipermetilación/hipometilación están siendo evaluados para tratamientos clínicos (Tabla 4).

Inhibidores de la metilación del DNA reactivan rápidamente la expresión de genes que han sufrido silenciamiento epigenético, especialmente en condición patológica. Los inhibidores de metilación más importantes hasta el momento son 5-aza-CR y 5-aza-CdR, que fueron desarrollados en un principio como agentes citotóxicos⁵², pero posteriormente se descubrió su acción sobre la activación génica en cultivos celulares^{53,54}. Ambos son análogos de nucleósidos que son convertidos a deoxinucleótidos de trifosfato y se incorporan en la nueva hebra que se está duplicando (Figura 6). Por lo tanto, estos agentes son sólo activos en la fase S del ciclo celular por un mecanismo de inhibición marcado en la metilación⁵⁴.

Las Dnmts detectan bases modificadas como azacitosisina, 5 fluorocitosina, pseudoisocitosina, resultando en la formación de nuevo DNA hipometilado⁵⁵.

El silenciamiento epigenético ha sido realizado con la deacetilación de las histonas, la cual es realizada por tres tipos de enzimas tipo HDAC. Los inhibidores de HDAC pueden inducir diferenciación, anquilosamiento en el crecimiento y apoptosis⁵⁶. La acumulación de proteínas acetiladas, particularmente histonas, resulta en la inducción de genes y en aumento de la función en otros genes que han

sido silenciados epigenéticamente. Varios inhibidores de HDAC están siendo evaluados en fase I y fase II, lo que en un futuro será de gran valor para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como AR.

Glosario

Epigenética: Conjunto de mecanismos que influyen en la expresión de los genes sin modificar la secuencia de DNA, por lo general secundarios a cambios químicos o estructurales de la molécula.

Herencia Epigenética: Transmisión del patrón epigenético ya sea por mitosis o meiosis y que no es mediada por DNA¹.

Epialelo: Genes con diferente grado de metilación en loci iguales de cromosomas homólogos.

Epigenoma: Patrones de metilación y modificaciones de histonas.

Terapia Epigenética: Estudio de la farmacogenética y farmacodinamia de los medicamentos dirigidos a modificar los marcadores epigenéticos².

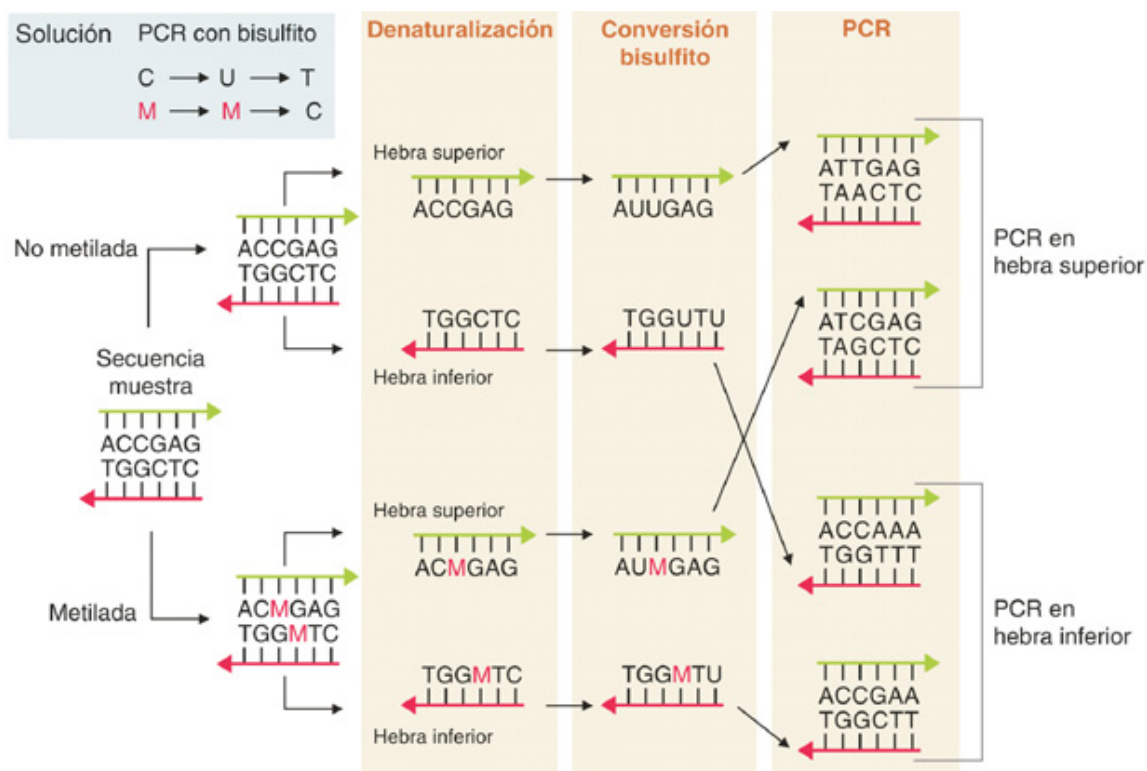


FIGURA 5. La exposición del DNA al bisulfito de sodio, produce la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos. Como consecuencia, el DNA transformado necesita diferentes cebadores.

TABLA 4. Medicamentos epigenéticos

Blanco	Medicamento	Fase clínica
Metilación del DNA	5-azacitidina	Fase I/II/III
	5-Aza-2'-deoxicitidina	Fase I/II/III
	FCDR	
	Zebularina	
	Procainamida	
	EGCG	Fase I
	Psammaplin A	
Deacetilasas de Histonas	Oligómeros anti-sentido	Fase I
	Ácido fenilbutírico	Fase I/II
	SAHA	Fase I/II
	Depsipéptido	Fase I/II
	Ácido valproico	Fase I/II

Abreviaciones: EGCG: epigallocatequina-3 galato; FCDR: 5-fluoro-2' deoxicitidina; SAHA: ácido suberoilánilide hidroxámico.

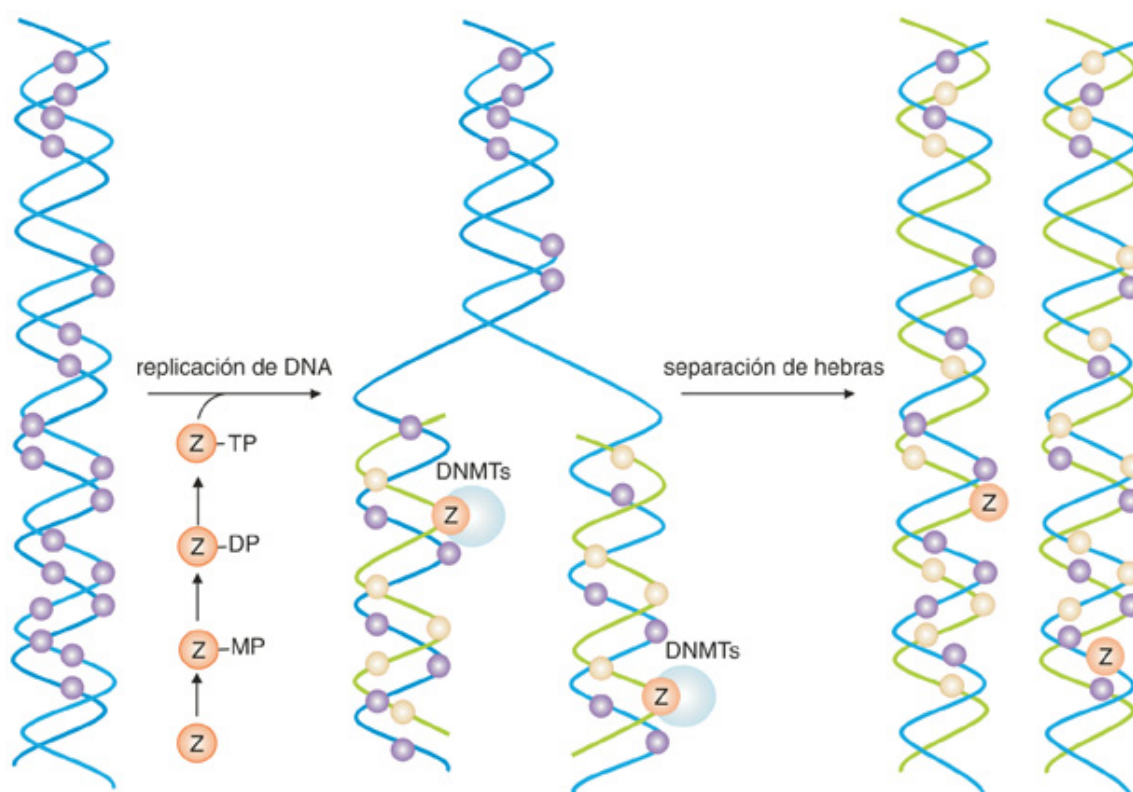


FIGURA 6. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos con propiedades para inhibir la metilación. El análogo de nucleósidos 5-azaC (representado por la Z) es convertido en trifosfato en la fase S del ciclo celular y es incorporado en el sitio de la citosina en la hebra nueva. Una vez están en el DNA, estas bases "fraudulentas" forman enlaces covalentes con las metiltransferasas de DNA (Dnmts) resultando en la demetilación del DNA. Círculos rosados: CpG metiladas, círculos claros: CpG no metiladas.

Referencias

1. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999; 286: 481-86.
2. Lederberg J. The meaning of epigenetics. *The scientist*. 2001; 15: 6.
3. Pray LA. Epigenetics: Genome, Meet your Environment. *The scientist*. 2004; 18: 14.
4. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 5293-5300.
5. Richardson B, Yung R. Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J Clin Med*. 1999; 134: 333-40.
6. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. 2001; 278: 25-31.
7. Rountree MR, Selker EU. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev*. 1997; 11: 2383-95.
8. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993; 3: 226-31.
9. Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5894-6.
10. Jost JP, Schwarz S, Hess D, Anglikar H, Fuller-Pace FV, Stahl H, et al. A chicken embryo protein related to the mammalian DEAD box protein p68 is tightly associated with the highly purified protein-RNA complex of 5-MeC-DNA glycosylase. *Nucleic Acid Res*. 1999; 27: 3245-52.
11. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. 1999; 401: 301-4.
12. Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol*. 1999; 5: 339-47.
13. Wolffe AP. Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *J Exp Zool*. 1998; 282: 239-44.
14. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998; 6683: 611-2.
15. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 1998; 19: 187-91.
16. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000; 24: 88-91.
17. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol*. 2003; 4: 78-86.
18. Sen P, Costa M. Pathway of nickel uptake influences its interaction with heterochromatic DNA. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986; 84: 278-85.
19. Patierno SR, Costa M. Effects of nickel(II) on nuclear protein binding to DNA in intact mammalian cells. *Cancer Biocem Biophys*. 1987; 9: 113-26.
20. Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 10907-12.
21. Hochkiss. The quantitative separation of purine, pyrimidines and nucleoside by paper chromatography. *J Biol Chem*. 1948; 168: 315-32.
22. Teitell M, Richardson B. DNA methylation in the immune system. *Clin Immunol*. 2003; 109: 2-5.
23. Van den Elsen PJ, Holling TM, van der Stoep N, Boss JM. DNA methylation and expression of major histocompatibility complex class I and class II transactivator genes in human developmental tumor cells and in T cell malignancies. *Clin Immunol*. 2003; 109: 46-52.
24. Ambinder RF, Robertson KD, Tao Q. DNA methylation and the Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol*. 1999; 9: 369-75.
25. Paulson EJ, Speck SH. Differential methylation of Epstein-Barr virus latency promoters facilitates viral persistence in healthy seropositive individuals. *J Virol*. 1999; 73: 9959-68.
26. Tierney RJ, Kirby HE, Nagra JK, Desmond J, Bell AI, Rickinson AB. Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. *J Virol*. 2000; 74: 10468-79.
27. Klinman DM, Takeshita F, Gursel I, Leifer C, Ishii KJ, Verthelyi D, et al. CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. *Microbes Infect*. 2002; 9: 897-901.
28. Yung R, Chang S, Hemati N, Johnson K, Richardson B. Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum*. 1997; 40: 1436-43.
29. Richardson B, Ray D, Yung R. Murine models of lupus induced by hypomethylated T cells. *Methods Mol Med*. 2004; 102: 285-94.
30. Richardson B. DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol*. 2003; 109: 72-9.
31. Sano H, Compton LJ, Shiomi N, Steinberg AD, Jackson RA, Sasaki T. Low expression of human histocompatibility leukocyte antigen-DR is associated with hypermethylation of human histocompatibility leukocyte antigen-DR alpha gene regions in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1985; 76: 1314-22.
32. Richardson B. Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. II. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. *Hum Immunol*. 1986; 17: 456-70.
33. Evans JL, Boyle WJ, Ting JP. Molecular basis of elevated c-myc expression in the abnormal L3T4-, Lyt-2- T lymphocytes of autoimmune mice. *J Immunol*. 1987; 139: 3497-505.
34. Eleftheriades EG, Boumpas DT, Balow JE, Tsokos GC. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms are responsible for the increased expression of c-myc proto-oncogene in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989; 52: 507-15.
35. Yoshida H, Yoshida M, Merino R, Shibata T, Izui S. 5-Azacytidine inhibits the lpr gene-induced lymphadenopathy and acceleration of lupus-like syndrome in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *Eur J Immunol*. 1990; 20: 1989-93.
36. Schauenstein K, Csordas A, Kromer G, Dietrich H, Wick G. In-vivo treatment with 5-azacytidine causes degeneration of central lymphatic organs and induces autoimmune disease in the chicken. *Int J Exp Pathol*. 1991; 72: 311-8.

37. Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, Amento EP, Chrisp CE, Yung RL, et al. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest.* 1993; 92: 38-53.
38. Yung RL, Quddus J, Chrisp CE, Johnson KJ, Richardson BC. Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. *J Immunol.* 1995; 154: 3025-35.
39. Mizugaki M, Yamaguchi T, Ishiwata S, Shindo H, Hishinuma T, Nozaki S, et al. Alteration of DNA methylation levels in MRL lupus mice. *Clin Exp Immunol.* 1997; 110: 265-9.
40. Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, et al. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 397-407.
41. Okada M, Ogasawara H, Kaneko H, Hishikawa T, Sekigawa I, Hashimoto H, et al. Role of DNA methylation in transcription of human endogenous retrovirus in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002; 29: 1678-82.
42. Motegi K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, Sato M. Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab Invest.* 2005; 85: 342-53.
43. Shin HJ, Park HY, Jeong SJ, Park HW, Kim YK, Cho SH et al. STAT4 Expression in Human T Cells Is Regulated by DNA Methylation but Not by Promoter Polymorphism. *J Immunol.* 2005; 175: 7143-50.
44. Marin J, Blaton MA, Briand JP, Chiochia G, Fournier C, Guichard G. et al. Synthesis of Glycopeptides from Type II Collagen-Incorporating Galactosylated Hydroxylysine Mimetics and Their Use in Studying the Fine Specificity of Arthritogenic T Cells. *Chembiochem.* 2005; 6: 1796-804.
45. Richardson BC, Strahler JR, Pivrotto TS, Quddus J, Bayliss GE, Gross LA, et al. Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 647-62.
46. Niwa Y, Miyachi Y, Sakane T, Kanoh T, Taniguchi S. Methyltransferase and phospholipase A2 activity in the cell membrane of neutrophils and lymphocytes from patients with Behcet's disease, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 1988; 174: 1-14.
47. Mizugaki M, Yamaguchi T, Ishiwata S, Shindo H, Hishinuma T, Nozaki S, et al. Alteration of DNA methylation levels in MRL lupus mice. *Clin Exp Immunol.* 1997; 110: 265-9.
48. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 1665-73.
49. Corvetta A, Della Bitta R, Luchetti MM, Pomponio G. 5-Methylcytosine content of DNA in blood, synovial mononuclear cells and synovial tissue from patients affected by autoimmune rheumatic diseases. *J Chromatogr.* 1991; 566: 481-91.
50. Seitz M. Molecular and cellular effects of methotrexate. *Curr Opin Rheumatol.* 1999; 11(3):226-32.
51. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 1827-31.
52. Sorm E, Piskala A, Chihak A, Vesely J. 5-azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia.* 1964; 20: 202-3.
53. Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature.* 1977; 267: 364-6.
54. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980; 20: 85-93.
55. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Biol Chem.* 2002; 277: 591-9.
56. Xiao H, Hasegawa T, Isobe K. Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *J Cell Biochem.* 1999; 73: 291-302.