

TRABAJO DE FIN DE MASTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

Existencia y mecanismos de formación de la herencia epigenética transgeneracional en relación con los tratamientos de reproducción humana asistida

Autora: Nerea Revenga Mateos

Tutora: María Cruz Palomino

Villaviciosa de Odón, Octubre 2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Epigenética.....	3
1.1.1 Definición de la epigenética.....	3
1.1.2 Mecanismos epigenéticos.....	3
1.1.2.1 Metilación del ADN.....	3
1.1.2.2 Modificación de histonas.....	4
1.1.2.3 ARNs no codificantes.....	4
1.1.3 Reprogramación epigenética.....	5
1.1.4 Influencia de los factores externos.....	6
1.1.5 Herencia epigenética transgeneracional.....	7
1.2 Tratamientos de reproducción asistida y epigenética.....	9
1.2.1 Tratamientos de reproducción asistida y herencia epigenética transgeneracional.....	10
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1 Existencia de la herencia epigenética transgeneracional.....	13
3.2 Existencia de la herencia epigenética transgeneracional generada por tratamientos de reproducción asistida.....	17
4. CONCLUSIONES	17
5. AGRADECIMIENTOS	18
6. BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

Las marcas epigenéticas son esenciales para el buen desarrollo del organismo, pero estas también pueden ser generadas por factores externos y dar como resultado fenotipos enfermos. Para que dichas marcas puedan ser transmitidas de padres a hijos, estas tienen que ocurrir en los gametos y esquivar las dos olas de reprogramación epigenética, formando una herencia epigenética transgeneracional (HET). En mamíferos, la HET cada vez parece más evidente por la documentada herencia de fenotipos no explicada por la genética mendeliana. Es por eso que el objetivo principal de este trabajo es estudiar la existencia de la HET y analizar cuáles son sus posibles mecanismos de formación. Los tratamientos de reproducción asistida (TRA), al ser factores externos, son capaces de generar modificaciones epigenéticas y si estas se mantienen a través de las generaciones, es factible pensar que los TRA generan HET. Por eso, el objetivo secundario de este trabajo es estudiar la existencia de la HET como consecuencia de los TRA, junto con sus posibles mecanismos de formación. En cuanto a los resultados obtenidos, se ha observado que la HET existe y que el mantenimiento de la metilación del ADN es uno de sus mecanismos de formación, el cual principalmente se encuentra en retrotransposones como partículas intracisternales A (IAPs) y promotores de genes. Aparte de eso, las condiciones subóptimas de cultivo *in vitro* (CIV) pueden ser posibles candidatas para la formación de la HET, debido a que alteran la primera ola de reprogramación, facilitando que la dimetilación de H3K4 y acetilación de H3K9 no sean borradas en el desarrollo embrionario. Pero, se necesitan estudios sobre si las condiciones subóptimas de CIV alteran la segunda ola de reprogramación, para así poder determinar con exactitud si generan HET.

Palabras clave: herencia epigenética transgeneracional, reprogramación epigenética, mantenimiento de la metilación del ADN, partículas intracisternales A, promotores de genes, condiciones subóptimas de cultivo *in vitro*, dimetilación de H3K4, acetilación de H3K9.

ABSTRACT

Epigenetic marks are essential for the optimal development, but these marks can also be generated by external factors and give as result disease phenotypes. For the transmission of epigenetic marks from parents to the offspring, it is not only necessary their presence in the gametes, but also their ability to avoid the two events of epigenetic reprogramming, creating a transgenerational epigenetic inheritance (TEH). In mammals, TEH seem to be increasingly more evident for the documented inheritance of phenotypes that Mendelian genetics cannot explain. That is why the main aim of this review is to study the existence of TEH and to analyse its possible mechanisms to be produced. Assisted reproduction treatments (ART) can induce epigenetic modifications as the external factors that they are, and if these modifications remain through next generations, it is possible to think that ART generate TEH. Therefore, the secondary aim of this review is to study the existence of TEH as a consequence of ART, along with its possible mechanisms to be produced. The results indicate that TEH exist and that DNA methylation maintenance is one of its mechanisms to be generated, which is specially located in Intracisternal A particle (IAP) retrotransposons and gene promoters. Moreover, the suboptimal *in vitro* culture (IVC) conditions can be possible candidates for the production of TEH considering that they alter the first event of epigenetic reprogramming, making it easy for the H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation not to be erased at embryo development. However, to determine accurately if suboptimal IVC conditions generates TEH, studies about these conditions and their alteration of the second event of epigenetic reprogramming are still needed.

Key words: transgenerational epigenetic inheritance, epigenetic reprogramming, DNA methylation maintenance, Intracisternal A particle, gene promoters, suboptimal *in vitro* culture conditions, H3K4 dimethylation, H3K9 acetylation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epigenética

1.1.1 Definición de la epigenética

La genética clásica mendeliana ha sido por mucho tiempo la base del conocimiento de la herencia, la reproducción y la evolución. Esta teoría se basa en mutaciones en la secuencia del ADN de un solo gen o de pequeños clústers de genes que generan fenotipos biológicos particulares, frecuentemente asociados a enfermedades, y que son transmitidos a las siguientes generaciones. Pero, este modelo de herencia por sí solo no alcanza a explicar las modificaciones fenotípicas que pueden causar los factores externos sin producir alteraciones en la secuencia del ADN. Es por eso que Conrad Waddington acuñó por primera vez el término “epigenética” para describir el proceso mediante el cual un organismo interactúa con el entorno para producir rasgos fenotípicos observables. Desde entonces, la definición de epigenética ha sido modificada y hoy en día se conoce como todos los cambios que ocurren en el genoma sin estar asociados a la secuencia del DNA¹.

1.1.2 Mecanismos epigenéticos

La epigenética altera la expresión génica sin alterar la secuencia del DNA mediante los siguientes principales mecanismos: la metilación del ADN, la modificación de histonas y las moléculas de ARN no codificantes².

1.1.2.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético más estudiado a día de hoy. En las células eucariotas, la metilación del ADN ocurre cuando una enzima ADN metiltransferasa añade un grupo metilo al quinto carbono de las citosinas, especialmente en los dinucleótidos CpG, conocidos como islas CpG². Las ADN metiltransferasas (DNMT) reconocen las zonas hemimetiladas (metilación de mantenimiento) o secuencias específicas no metiladas (metilación *de novo*) del ADN. Por un lado, la metilación de mantenimiento ocurre predominantemente durante la replicación del ADN en células madre embrionarias y células

somáticas mediante la DNMT1. Por otro lado, la metilación *de novo* ocurre principalmente en células madre embrionarias ya que esta metilación es la encargada del proceso de diferenciación celular, y se lleva a cabo mediante las enzimas DNMT3A, DNMT3B. Aunque, a día de hoy existen estudios que sugieren que la DNMT1 también exhibe acción de metilación *de novo* en ADN no metilado tanto *in vivo* como *in vitro*²⁻³.

La metilación del ADN se relaciona con la inhibición de la actividad transcripcional, y por tanto, con el silenciamiento génico a largo plazo por influir en los patrones de modificación de histonas y por la interferencia que causa la protuberancia del grupo metilo con los factores de transcripción vinculantes¹⁻².

1.1.2.2 Modificación de histonas

Son cuatro las histonas que forman los nucleosomas (H2A, H2B, H3 y H4). Estas histonas soportan modificaciones post-transcripcionales en los residuos de su extremo N-terminal. Entre las modificaciones post-transcripcionales más frecuentes se encuentran la acetilación, ubiquitinación y mono-, di- y trimetilación de lisinas (Lys; K), la mono- y dimetilación de argininas (Arg; R) y la fosforilación de serinas (Ser; S), entre otros aminoácidos. Las modificaciones que ocurren en las histonas ejercen una por una o en grupo, formando un código de histonas, el cual es capaz de establecer cambios en la estructura y organización de la cromatina para obtener eucromatina o heterocromatina. De ese modo, las modificaciones cambian la unión entre las propias histonas y el ADN, interviniendo en la transcripción génica. Los principales responsables del cambio de conformación de la cromatina son la metilación y la acetilación. En concreto, la di- y trimetilación de H3K4 y la acetilación de K en H3 y H4 se asocian a la expresión activa de genes, mientras que la trimetilación de H3K9, H3K27 y H4K20 y la hipometilación de H3 y H4 se encuentran asociadas al silenciamiento de la transcripción²⁻⁴.

1.1.2.3 ARNs no codificantes

A pesar de ser moléculas de ARN funcionales, los ARNs no codificantes (ncRNAs) no se traducen a proteínas específicas. De hecho, solo el 2 % del genoma de los mamíferos se traduce a proteínas. Por lo que si bien la mayoría del ADN se transcribe a ARN (75 %), una gran parte de este no codifica ninguna proteína, manteniéndose en ncRNA. Dentro del ncRNA, existe una

diferenciación entre las moléculas de ncRNA largas (lncRNAs) y las pequeñas (sncRNAs), entre las cuales se encuentran los microRNAs (miRNAs), los ARN pequeños de interferencia (siRNAs) y los ARN que se unen a las moléculas PIWI (piRNAs)². En general, la función de los ncRNAs es la regulación transcripcional y postranscripcional de la expresión génica, especialmente asociada al silenciamiento de genes²⁻⁵.

1.1.3 Reprogramación epigenética

Para que las explicadas marcas epigenéticas sean transmitidas a las futuras generaciones, estas han de ocurrir en los gametos. De hecho, solamente las modificaciones epigenéticas que ocurren en los gametos son capaces de alterar el fenotipo de las próximas generaciones. Por lo que, sabiendo eso, se puede llegar a pensar que si las mismas modificaciones epigenéticas que se pueden heredar a través de la mitosis en las células somáticas ocurren en las células germinales, esas modificaciones se podrían heredar a través de la meiosis a las siguientes generaciones. Sin embargo, al contrario que en las células somáticas, en las células germinales primordiales (del inglés *primordial germ cells* o PGCs) y en el cigoto que se forma de la unión de los gametos ocurre un borrado de todas las marcas epigenéticas en general. De esa forma, se eliminan las marcas epigenéticas de los progenitores acumuladas en el material genético, para que así el cigoto recién formado recupere su carácter pluripotente y se desarrolle de manera adecuada. El proceso de borrado de las marcas epigenéticas se conoce como “reprogramación” (del inglés *reprogramming*)².

En mamíferos la reprogramación ocurre en dos instantes diferentes a lo largo del desarrollo embrionario (Imagen 1): 1) en el cigoto, la cual empieza tras la fecundación y finaliza con el desarrollo embrionario temprano; 2) en las PGCs. La primera reprogramación se da en el cigoto, donde el perfil epigenético de los gametos de los progenitores se reemplaza por la información epigenética embrionaria, para así volver al estado de pluripotencia celular. Por ejemplo, en ratones esta primera reprogramación supone el borrado de toda la información epigenética, mediante modificaciones en las histonas y eliminando toda la metilación del ADN tanto en el genoma materno como paterno, excepto en los genes improntados. Este proceso es totalmente necesario para que se dé un correcto desarrollo embrionario, y a medida que la diferenciación celular avanza, el perfil epigenético del estado de pluripotencialidad se adapta al de cada célula especializada. La segunda reprogramación ocurre en las PGCs, antes de la migración de estas, y en este proceso se borra la impronta parental, aparte del resto de marcas epigenéticas. Una

vez que todas las marcas epigenéticas han sido borradas, se establece el perfil epigenético de los genes improntados en las células germinales según el sexo, aparte de las marcas epigenéticas necesarias para que estas se diferencien en ovocitos o espermatozoides².

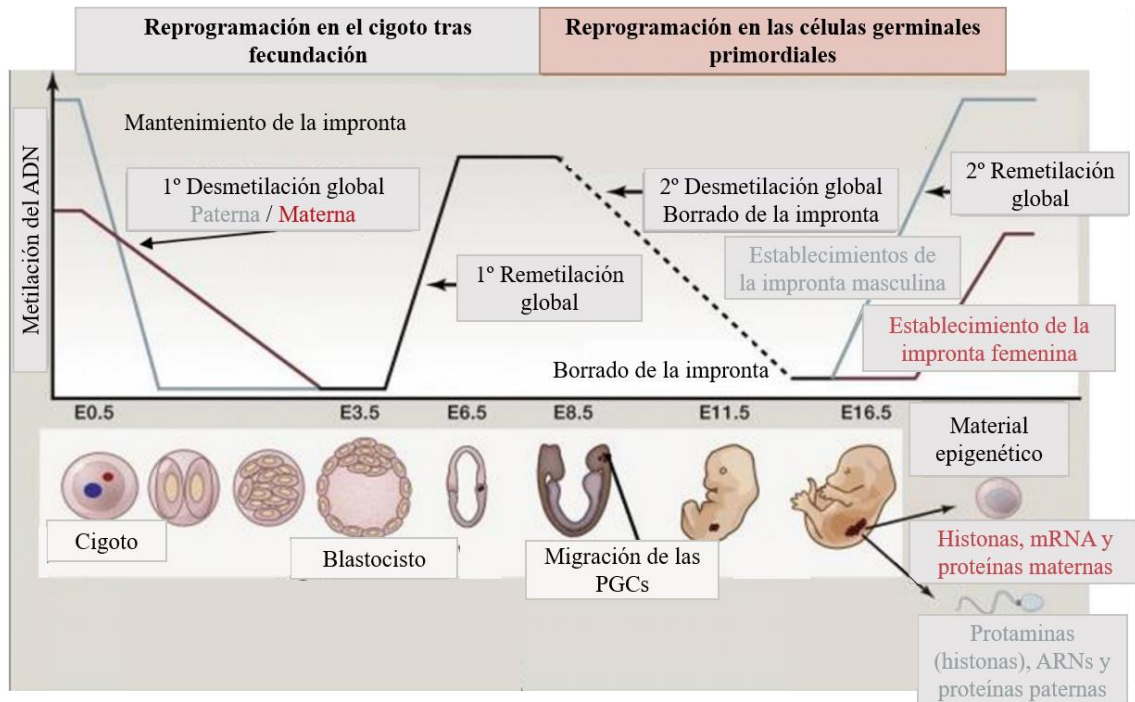


Imagen 1. Reprogramación epigenética (Imagen adaptada²).

Dicho esto, las modificaciones epigenéticas que sean capaces de esquivar la reprogramación son las que van a ser transmitidas a las siguientes generaciones².

1.1.4 Influencia de los factores externos

Las modificaciones epigenéticas son necesarias para el correcto desarrollo del organismo, las cuales en este caso ocurren de forma común y espontánea. Pero, los factores externos o el ambiente, incluyendo el estilo de vida, también pueden generar modificaciones epigenéticas, alterando la expresión de genes y en múltiples ocasiones dando lugar a fenotipos enfermos. Por ejemplo, la dieta, el estrés, la actividad física, los cambios climáticos, el consumo de diferentes tóxicos o el tabaco pueden considerarse factores externos porque modifican la estructura de la cromatina mediante mecanismos epigenéticos, alterando así la expresión génica².

Para que las modificaciones epigenéticas causadas por diferentes factores externos se transmitan de célula a célula, estas simplemente tienen que mantenerse a lo largo de la mitosis. En cambio, para que se transmitan de una generación a la siguiente, dichas modificaciones, como ya se ha explicado previamente, han de ocurrir en los gametos y esquivar los dos instantes de reprogramación epigenética, formando así la herencia epigenética transgeneracional (HET)².

1.1.5 Herencia epigenética transgeneracional

En mamíferos, se ha documentado la herencia de fenotipos no explicada por la genética mendeliana, sugiriendo que las marcas epigenéticas tienen el potencial de ser transmitidas de padres a hijos mediante los gametos, pudiendo llegar a establecer de esa forma la existencia de la HET. De hecho, cada vez existen más evidencias de que la secuencia de ADN por sí sola no es suficiente para la transmisión de toda la información hereditaria¹.

Pero, antes de hablar del posible papel de las modificaciones epigenéticas en la herencia de la información no relacionada con la secuencia del ADN, es necesario establecer la diferencia entre los conceptos de herencia intergeneracional y transgeneracional. El término “herencia epigenética intergeneracional” hace referencia a las modificaciones epigenéticas que surgen por contacto directo al factor externo en el adulto progenitor (F0) y en la primera generación de este (F1), incluyendo también su segunda generación (F2) si dicho progenitor se trata de una hembra embarazada. Sin embargo, el término “herencia epigenética transgeneracional” se usa para describir las modificaciones epigenéticas que son capaces de persistir en las futuras generaciones del progenitor sin estar en contacto directo con el factor externo que las genera (Imagen 2)¹⁻².

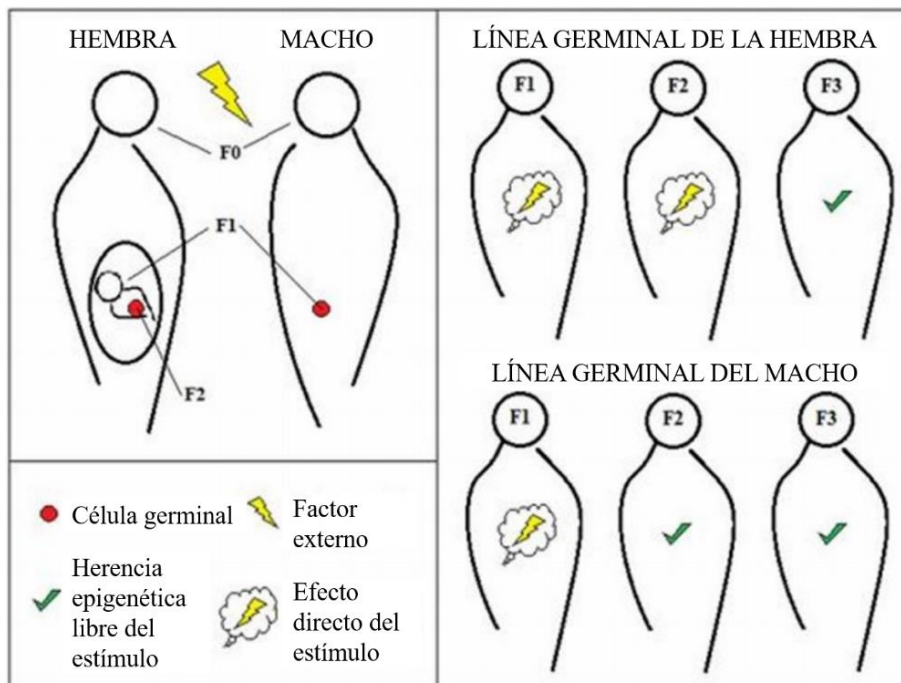


Imagen 2. Herencia epigenética a través de las generaciones (Imagen adaptada²).

A día de hoy existen investigaciones epidemiológicas que muestran cómo la exposición parental a determinados factores externos puede generar alteraciones que se transmiten de generación en generación, considerando como posible mecanismo para ello las modificaciones epigenéticas. Por ejemplo, el estudio de la hambruna que tuvo lugar en Holanda tras la segunda guerra mundial mostró que la descendencia de las mujeres que gestaron en esa época sufrió obesidad, intolerancia a la glucosa y enfermedades cardíacas, entre otras, habiendo crecido en condiciones normales. Dicho de otra forma, la descendencia de esas mujeres padeció muchos trastornos metabólicos en la vida adulta, los cuales a día de hoy se correlacionan con una alteración en patrones epigenéticos en genes de la regulación de la insulina. Por eso, se ha establecido la idea de que esas madres pudieron haber transmitido a la descendencia patrones de expresión génica debidos a la hambruna que sufrieron, generando así una posible HET. Otro ejemplo es el del estudio que habla sobre la posible herencia de los traumas o el sufrimiento grabado en el epigenoma de los padres, como el de los supervivientes del Holocausto. Pero, respecto a este caso todavía existen muchas dudas¹⁻².

1.2 Tratamientos de reproducción asistida y epigenética

Otro factor externo causante de modificaciones epigenéticas a considerar son los tratamientos de reproducción asistida (TRA). De hecho, un gran número de experimentos en ratón y en varios animales modelo, junto con estudios epidemiológicos en humanos, sugieren que la aplicación de la tecnología de la reproducción asistida puede perturbar la regulación epigenética de los genes, dando lugar a fenotipos alterados. La superovulación de ovocitos con gonadotropinas, la fecundación *in vitro* (FIV), la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) y los cultivos *in vitro* (CIV) de embriones (principalmente hasta el estadio de blastocisto) son técnicas ampliamente utilizadas por diferentes países desarrollados para los tratamientos de infertilidad humana⁶.

Parece que los niños nacidos mediante TRA sufren ligeramente un incremento de defectos de nacimiento y bajo peso al nacer. A parte de eso, estos niños tienen un riesgo incrementado de parto prematuro y complicaciones perinatales, y suelen requerir más frecuentemente cuidados intensivos neonatales. A pesar de ello, la gran mayoría de niños nacidos mediante TRA parecen estar sanos, pero quizá esto se deba a que la falta actual de estudios longitudinales sobre la salud de los adolescentes o adultos no permite analizar los sutiles efectos epigenéticos de los TRA en varias enfermedades complejas⁶. Lo que sí que parece más evidente es que ni la comentada restricción del crecimiento intrauterino ni la prematuridad tienen relación con anomalías en la impronta, tanto en gestaciones TRA como en gestaciones espontáneas⁷.

Pero, sin duda el hallazgo más interesante encontrado en los niños concebidos por TRA es la prevalencia incrementada de defectos en la impronta que causan los síndromes Beckwith-Wiedemann (SBW) y Angelman (SA)⁶. En cuanto al SBW, algunos autores describen riesgos incrementados, teniendo en cuenta la frecuencia relativa del síndrome en la población concebida por TRA y comparándola con su incidencia en la población en general. Este hallazgo también se ve reforzado por el hecho de que estos síndromes sean de muy baja incidencia en la población y en que la causa en todos los casos descritos concebidos por TRA coincida en ser anomalías en la impronta, aun siendo la etiología o causa menos frecuente del síndrome. Debido a que el patrón de metilación alelo específico en los *loci* regulados por impronta genómica es conocido, mediante el estudio de este se ha podido indicar que el CIV de embriones, la maduración *in vitro* de ovocitos o los procesos de estimulación ovárica pueden interferir en la

impronta genómica. Aunque un estudio en placentas de la metilación del DNA de todas las regiones del genoma reguladas por impronta genómica conocidas hasta la actualidad, sugiere que las TRA *per se* no parecen ser suficientes para explicar los incrementos en el riesgo de anomalías en la impronta en la descendencia dado que los niveles de metilación fueron los esperados y se pudo confirmar la correcta expresión monoalélica⁷.

1.2.1 Tratamientos de reproducción asistida y herencia epigenética transgeneracional

Tomando los TRA como modificadores del perfil epigenético y si se considera la existencia de la HET, se puede llegar a pensar que si las modificaciones epigenéticas causadas por los TRA ocurren en los gametos y esquivan los dos instantes de reprogramación epigenética, estas serán transmitidas a las siguientes generaciones. Pero, en este caso también influye la especial vulnerabilidad de los dos instantes de reprogramación debido a que tanto los patrones de remetilación específicos para cada sexo en las células germinales (Imagen 1), como la remetilación durante el desarrollo embrionario temprano ocurren en condiciones *in vitro*⁶.

Por un lado, la asincronía existente en la adquisición de la impronta entre los gametos masculinos y femeninos tiene grandes implicaciones en los TRA. De hecho, en la línea germinal femenina la mayoría de la metilación de los alelos para la impronta específica de este sexo ocurre en la segunda metafase meiótica. Aunque la metilación de varios alelos puede que no se complete hasta después de la fecundación, poco antes de la fusión pronuclear. En cuanto a la línea germinal masculina, en general, el aislamiento y la manipulación de los espermatozoides para FIV/ICSI ocurre después de la metilación alélica específica de la impronta para este sexo. Por lo tanto, en el caso de los varones, es factible asumir que los patrones de metilación aberrantes observados del esperma en FIV/ICSI sean consecuencia de la infertilidad de estos hombres y no de las técnicas empleadas en los TRA. En cambio, en el caso de las mujeres, el CIV de ovocitos, la superovulación y la FIV/ICSI pueden intervenir en la adecuada adquisición de los patrones de la impronta materna durante la ovogénesis⁶.

Por otro lado, se sabe que cuando la fecundación y el desarrollo embrionario temprano ocurren *in vitro*, aumenta el riesgo de que se produzcan defectos en la remetilación asociados con el desarrollo somático anormal⁶.

Existen artículos que apoyan experimentalmente la comentada idea de la posible existencia de HET debido a los TRA. Para ello, por ejemplo García-Domínguez *et al.* (2020) realizaron un experimento en el que incluyeron una generación sin exposición directa a los TRA y se centraron en los potenciales efectos transgeneracionales de la exposición embrionaria al procedimiento de criopreservación-transferencia, utilizando el conejo como animal modelo (Imagen 3). Sus principales resultados mostraron que, en comparación con los conejos concebidos naturalmente, la progenie generada tras la exposición embrionaria a la criopreservación y posterior transferencia exhibió una fisiología hepática alterada, además de un crecimiento corporal disminuido y un tamaño de órganos menor, lo que provocó una disminución del peso corporal en la edad adulta. Pero, dichos resultados no solo se observaron en las generaciones que estuvieron en contacto con el mencionado factor externo, sino también en la que no tuvo contacto directo con este⁸. Otro experimento cuyo factor externo fue el medio de CIV subóptimo muestra resultados similares apoyando, por tanto, la HET generada por los TRA, pero solo en ratones macho⁹.

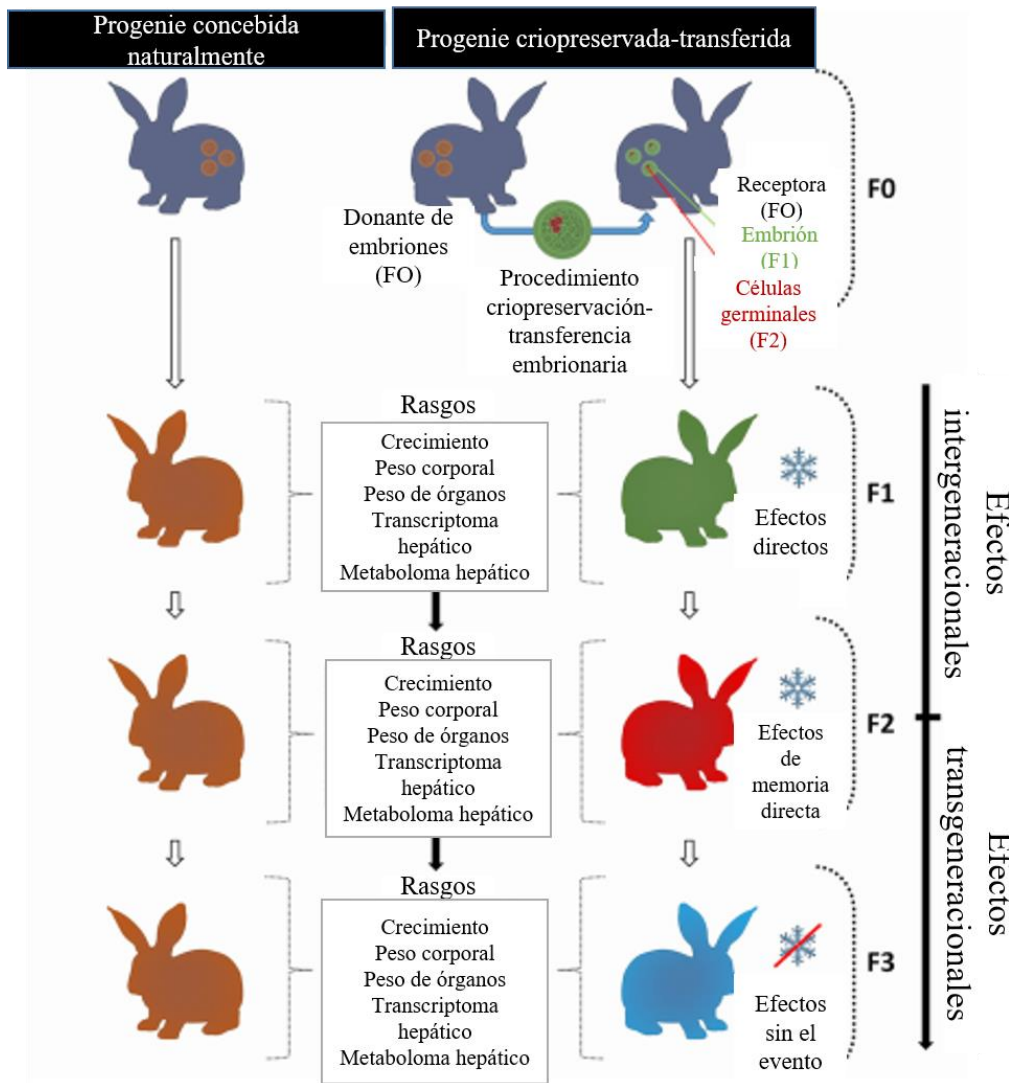


Imagen 3. Diseño experimental de García-Domínguez *et al.* (2020) (Imagen adaptada⁸).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Cada vez más estudios están de acuerdo en que la secuencia de ADN por sí sola no es suficiente para la herencia de fenotipos no explicada por la genética mendeliana y para ello sugieren la transmisión de las marcas epigenéticas a través de las generaciones, proponiendo así la existencia de la HET¹. Por eso el objetivo principal de este trabajo es analizar la existencia de la HET y sus posibles mecanismos de formación.

Para ello, la hipótesis que se plantea es la siguiente:

- Existen marcas epigenéticas que son capaces de esquivar la reprogramación epigenética.

En este contexto, varias investigaciones sugieren que los TRA pueden alterar la regulación epigenética de los genes, generando fenotipos alterados⁶, y si esa regulación génica perturbada se mantiene a través de las generaciones, es factible pensar que los TRA generan HET. Debido a eso, el objetivo secundario de este trabajo es estudiar la existencia de la HET como consecuencia de los TRA, junto con sus posibles mecanismos de formación.

Para ello, la hipótesis que se plantea es la siguiente:

- Las modificaciones epigenéticas que generan los TRA escapan de la reprogramación epigenética.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Existencia de la herencia epigenética transgeneracional

Los primeros pasos hacia el estudio sobre la posible existencia de la HET fueron mediante un análisis del borrado de la metilación del ADN en las PGCs de ratón. Ese análisis primeramente se centró en las regiones diferencialmente metiladas (DMRs) de genes improntados bien caracterizados, metilados por la impronta materna o paterna. De esa forma, se pudo observar como la desmetilación de DMR2 del gen *Snrpn* ocurría más gradualmente de lo esperado durante los 12.5-13.5 días post coito (dpc). Al examinar la secuencia de dicho DMR más detalladamente, los investigadores encontraron que a diferencia de otros DMRs, este presentaba elementos repetitivos Line1, es decir, un tipo de retrotransposones. Esa información dio pie a que los autores quisieran analizar minuciosamente el proceso de desmetilación de otros elementos repetitivos del genoma. De esa manera, se dieron cuenta de que entre 11.5 y 13.5 dpc mientras que todos los Line1 se iban desmetilando, una proporción considerable de CpGs en otros retrotransposones como partículas intracisternales A (IAPs) se mantuvo metilada incluso a día 13 después del coito. Por lo que, pudieron observar resistencia a la reprogramación epigenética en las PGCs por parte de los IAPs. Los mismos investigadores añadieron que esa metilación prolongada de los IAPs puede ser esencial para la estabilidad cromosómica y para la prevención de la activación de los retrotransposones a fin de reducir el riesgo de mutaciones en la línea germinal¹⁰. De hecho, en relación a ello, se reportó un alto nivel de la activación transcripcional de los IAPs en el gen *Dnmt1* en embriones de ratones mutantes, en los cuales los IAPs estaban desmetilados¹¹.

A pesar de que dicho descubrimiento contrasta con un estudio previo al mismo que sugiere que los IAPs están casi completamente desmetilados a día 13 después del coito¹², seguramente por la utilización de técnicas de bisulfito poco sensibles para el análisis de la metilación del ADN¹⁰, un año después Lane *et al.* (2003) llegaron a la misma conclusión que Hajkova *et al.* (2002). Aun así, estos investigadores sugirieron la existencia de una posible resistencia parcial a la reprogramación epigenética de los IAPs. Es decir, plantearon la posibilidad de que existan ciertos IAPs que no se desmetilen, mientras que haya otros que sí. Esto explicaría los efectos observables en varios genes cuya expresión está influenciada por inserciones de IAPs cercanos, como ocurre con el gen *agouti* en ratones. En este caso, cuando un IAP se desmetila, este se inserta dentro del gen *agouti* y eso conlleva a la expresión del alelo *agouti* amarillo (A^{vy}), conocido como alelo mutante. En cambio, cuando el IAP permanece metilado, no ocurre ninguna inserción y, por tanto, no se genera el fenotipo mutante¹³.

Aparte de los IAPs, también se reportaron otras posibles regiones repetitivas del genoma que igualmente podían formar parte de la HET. Estas regiones fueron los transposones tempranos (Etn)¹⁴ y un subconjunto de retrotransposones de la familia LTR-ERV1¹⁵.

Estudios más recientes llegan a la misma conclusión respecto al mantenimiento de la metilación de los IAPs tras la reprogramación epigenética¹⁵⁻¹⁶. Aunque, a día de hoy ha sido posible especificar más y por tanto saber que en humanos los principales retrotransposones que se mantienen metilados son los SINE-VNTR-*alu* (SVA)¹⁷, no los IAPs como en ratones¹⁰⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶.

Por último en cuanto a los elementos repetitivos del genoma con posible influencia en la HET, estos también pueden encontrarse en las regiones subteloméricas¹⁵ y en los satélites pericentroméricos¹⁷, pero no, en cambio, en los satélites centroméricos, donde ocurre la desmetilación tras la fecundación¹⁴. La retención de la metilación en las regiones subteloméricas y en los satélites pericentroméricos puede mantener la estabilidad cromosómica, aparte de asegurar una correcta alineación y segregación durante la mitosis³.

Actualmente, sumadas a las mencionadas regiones repetitivas del genoma, se conocen regiones de secuencia única correspondientes a regiones promotoras de genes, regiones intragénicas y regiones activadoras o *enhancers* que escapan de la reprogramación epigenética³. En cuanto a las regiones promotoras de genes, Seisenberger *et al.* (2012) identificaron que estas

permanecieron metiladas en las PGCs femeninas y masculinas a día 13.5 después del coito. Además, descubrieron que su resistencia a la desmetilación ocurre en función de su distancia respecto a los IAPs¹⁶. Esto concuerda con lo que estudios anteriores reportaron al respecto¹⁵ y sugiere que el contexto genómico o el entorno de la cromatina de los IAPs puede conferir resistencia a la desmetilación en elementos vecinos. Alternativamente, como se ha comentado previamente, la prevención de la desmetilación de los IAPs, incluyendo sus secuencias circundantes, puede ser un mecanismo protector del genoma para evitar la activación de estos elementos potencialmente mutagénicos en la línea germinal¹⁶. Haciendo un análisis molecular, esa prevención de la desmetilación de los IAPs se cree que en PGCs humanas ocurre mediante el reclutamiento de la enzima DNMT1 por el complejo correpresor proteico KRAB-ZFP. Del mismo modo, se ha propuesto la vía de los piRNAs como mecanismo paralelo para ello. Estos dos mecanismos moleculares también servirían para la prevención de la desmetilación de las regiones de secuencia única del genoma³.

Un estudio en el que se utilizó un factor externo como causante de modificaciones epigenéticas reforzó la comentada existencia de promotores de genes que escapan de la reprogramación epigenética. En dicho estudio se analizaron las alteraciones en la metilación de promotores a lo largo de todo el genoma en el esperma de ratas de generación F3, cuya generación F0 hembra fue expuesta a vinclozolin, un disruptor endocrino androgénico, mientras gestaba la generación F1 y se estaba determinando el sexo gonadal de esta última. Esa investigación demostró que el vinclozolin causó una metilación diferencial en los promotores de varios genes, la cual se mantuvo en la generación F3 sin que esta generación estuviera en contacto con el vinclozolin¹⁸. Poco después, otro trabajo volvió a reforzar la misma idea habiendo seguido el mismo procedimiento experimental, pero con disruptores endocrinos derivados de plásticos¹⁹. Debido a eso, ambos estudios también pudieron confirmar que un agente ambiental tiene la habilidad de inducir cambios epigenéticos transgeneracionales en el genoma del esperma y alterar, de esa forma, el fenotipo¹⁸⁻¹⁹. Dicho fenotipo generado en las ratas de los dos experimentos fue enfermo y, curiosamente, tanto la fertilidad como la reproducción de los murinos se vieron perjudicadas¹⁹.

Normalmente, los factores externos suelen generar fenotipos perjudiciales para los individuos que están en contacto con ellos. Esto se debe a que algunas de las regiones que escapan de la reprogramación epigenética se asocian a genes que se expresan en el cerebro y que participan en la diferenciación neuronal, mientras que otras regiones se relacionan con genes expresados

en todo el organismo, como en el caso del gen regulador circadiano caseína quinasa 1 delta (*CSNK1D*)³.

A pesar de que todas las regiones comentadas se relacionan con la metilación del ADN (Tabla 1), actualmente se cree que dicho mecanismo epigenético es menos probable que sea el principal para formar la herencia epigenética inducida por factores ambientales³.

Tabla 1. Regiones del genoma metiladas que escapan de la reprogramación epigenética.

Referencia	Tipo de estudio	Región metilada
Hajkova <i>et al.</i> (2002)	Serie de casos	IAPs
Lane <i>et al.</i> (2003)	Serie de casos	
Kim <i>et al.</i> (2004)	Serie de casos	
Guilbert <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	
Seisenberger <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	
Kim <i>et al.</i> (2004)	Serie de casos	Elementos Etn
Guilbert <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	Retrotransposones de la familia LTR-ERV1
Tang <i>et al.</i> (2015)	Serie de casos	Elementos SVA
Guilbert <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	Regiones subteloméricas
Tang <i>et al.</i> (2015)	Serie de casos	Satélites pericentroméricos
Guerrero-Bosagna <i>et al.</i> (2010)	Ensayo clínico	Promotores de genes
Guilbert <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	
Seisenberger <i>et al.</i> (2012)	Serie de casos	
Manikkam <i>et al.</i> (2013)	Ensayo clínico	
Tang <i>et al.</i> (2016)	Revisión sistemática	
Tang <i>et al.</i> (2016)	Revisión sistemática	Regiones intragénicas
Tang <i>et al.</i> (2016)	Revisión sistemática	Regiones activadoras o <i>enhancers</i>

Regiones repetitivas

Regiones de secuencia única

De manera interesante, Guerrero-Bosagna *et al.* (2010) también sugirieron la posibilidad de que las modificaciones epigenéticas involucren alteraciones genéticas secundarias, las cuales igualmente contribuirían en el fenotipo alterado por un factor externo¹⁸. Estudios posteriores han reportado conclusiones similares al respecto¹⁻²⁰.

3.2 Existencia de la herencia epigenética transgeneracional generada por tratamientos de reproducción asistida

Al igual que el explicado alelo agouti amarillo o A^{vy} , el $Axin1^{Fu}$ es un alelo epigenéticamente heredado formado por la inserción de un IAP en el gen $Axin1$ de ratones. Un estudio determinó que en blastocistos la expresión de $Axin1^{Fu}$ depende de la dimetilación de H3K4 y de la acetilación de H3K9 de dicho alelo. Ese mismo estudio también reportó que las condiciones subóptimas de CIV en cigotos son capaces de alterar la reprogramación epigenética que ocurre tras la fecundación, favoreciendo de esa forma la expresión fenotípica de $Axin1^{Fu}$. Por lo que ante condiciones subóptimas de CIV, tanto la dimetilación de H3K4 como la acetilación de H3K9 en el alelo pueden escapar de la primera ola de reprogramación epigenética²¹.

Otro trabajo posterior refuerza el comentado descubrimiento sobre que las condiciones subóptimas de CIV alteran el primer instante de reprogramación epigenética. Eso se debe a que encontraron que ese factor externo alteró la expresión de genes modificadores de la reprogramación epigenética, concretamente de $Kap1$, $Sox2$, $Hdac1$, $Dnmt1$ y $Dnmt3a$. Por lo tanto, se puede pensar que las condiciones subóptimas de CIV facilitan la formación de HET ya que ante ellas la primera ola de reprogramación epigenética se altera⁹.

La relevancia clínica de estos hallazgos reside en la importancia de mantener unas condiciones óptimas de CIV desde el estado de cigoto al de blastocisto para evitar la posible aparición de fenotipos enfermos en embriones.

4. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que la HET existe y que el mantenimiento de la metilación del ADN es uno de sus mecanismos de formación. Concretamente, ese mantenimiento de la metilación se observa tanto en regiones repetitivas como en regiones de secuencia única del genoma, siendo los IAPs y las secuencias promotoras de genes los más comunes para su encuentro, respectivamente. Aparte de eso, las condiciones subóptimas de CIV, las cuales forman parte de los TRA, pueden ser posibles candidatas para generar HET. Eso se debe a que alteran la primera ola de reprogramación epigenética y, de esa forma, principalmente ciertas modificaciones de histonas, como la dimetilación de H3K4 y la acetilación de H3K9, no se borran en el desarrollo

embrionario. Pero, para determinar con exactitud si las condiciones subóptimas de CIV generan HET, se necesitan estudios sobre si estas alteran también el segundo instante de reprogramación epigenética y, de esa forma, las mencionadas modificaciones de histonas permanecen en las PGCs para ser transferidas a las futuras generaciones.

5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera darle las gracias en especial a mi tutora María Cruz Palomino por toda la ayuda y el apoyo que me ha brindado desde el primer momento, junto con su atención, comprensión y simpatía. También me gustaría darle las gracias a la Universidad Europea de Madrid y a IVIRMA por darme la oportunidad de realizar este estudio y, de esa forma, poder especializarme un poco más sobre la epigenética, en este caso en unión a la reproducción humana asistida.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Xavier MJ, Roman SD, Aitken RJ, Nixon B. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. *Hum Reprod Update*. 2019; 25(5):518–40.
2. Muñoa I. Study of the epigenetic cellular memory induced by morphine: a Next Generation Sequencing approach / Morfinak eragindako zelulen arteko memoria epigenetikoaren azterketa, Bigarren Belaunaldiko Sekuentziazioaren bitartez. [Leioa]: Universidad del País Vasco; 2019.
3. Tang WWC, Kobayashi T, Irie N, Dietmann S, Surani MA. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat Rev Genet*. 2016; 17(10):585–600.
4. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; 21(3):381-95.
5. Das L, Parbin S, Pradhan N, Kausar C, Patra SK. Epigenetics of reproductive infertility. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017; 9(4):509–35.

6. El Hajj N, Haaf T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2013; 99(3):632–41.
7. Camprubí C. Epigenética y Reproducción Asistida. *Rev Asoc Est Biol Rep*. 2015; 20(2):43
8. García-Domínguez X, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Diletto G, García-Carpintero V, Cañizares J, et al. Long-term and transgenerational phenotypic, transcriptional and metabolic effects in rabbit males born following vitrified embryo transfer. *Sci Rep*. 2020; 10(1):11313.
9. Calle A, Miranda A, Fernández-González R, Pericuesta E, Laguna R, Gutiérrez-Adan A. Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring. *Biol Reprod*. 2012; 87(2):34
10. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*. 2002; 117:15–23.
11. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 1998; 20:116–7.
12. Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev*. 1999; 13(1):26–34.
13. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, et al. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. 2003; 35(2):88–93.
14. Kim S-H, Kang Y-K, Koo D-B, Kang M-J, Moon S-J, Lee K-K, et al. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324(1):58–63.
15. Guibert S, Forné T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*. 2012; 22(4):633–41.

16. Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*. 2012; 48(6):849–62.
17. Tang WWC, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, et al. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell*. 2015; 161(6):1453–67.
18. Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One*. 2010; 5(9).
19. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013; 8(1).
20. Skinner MK, Guerrero-Bosagna C, Haque MM. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm epimutations promote genetic mutations. *Epigenetics*. 2015; 10(8):762–71.
21. Fernández-González R, Ramirez MA, Pericuesta E, Calle A, Gutiérrez-Adan A. Histone modifications at the blastocyst *Axin1*(*Fu*) locus mark the heritability of in vitro culture-induced epigenetic alterations in mice. *Biol Reprod*. 2010; 83(5):720–7.