



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Estudio de la epigenética en niños nacidos mediante técnicas de reproducción asistida, TRA

Autor: Silvia Badás Salán

Tutor: Juan José Tellería

“Si la genética es el abecedario, la epigenética es la ortografía”.

MANEL ESTELLER.

Director del programa de Epigenética y Biología del Cáncer del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) y profesor en ICREA en la Universidad de Barcelona.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS.....	10
1. OBJETIVOS	12
2. DESARROLLO.....	13
2.1. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1.1. Definición de epigenética.	13
2.1.2. Factores de las variaciones epigenéticas.....	14
2.1.3. Niveles de organización.	16
2.1.4. Mecanismos epigenéticos.	20
2.1.4.1. Metilación del ADN.	20
2.1.4.2. Modificación de las histonas.	23
2.1.5. Desarrollo epigenético.....	27
2.1.5.1. Cuándo se produce el desarrollo epigenético.	27
2.1.5.2. Dónde se produce desarrollo epigenético.	28
2.2. TECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	30
2.2.1. Epigenética y TRA.	30
2.2.2. Fertilidad y TRA.....	33
2.2.3. Enfermedades relacionadas con la epigenética de los niños TRA.	34
- Síndrome de Prader- Willi.	36
- Síndrome de Angelman.....	37
- Síndrome de Beckwith-Wiedemann.	38
- Síndrome de Russel-Silver.....	39
- Retinoblastoma.....	40
- Síndrome de DiGeorge.....	40
2.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS/ DIAGNÓSTICO GENÉTICO.	42
2.3.1. CGH array “Array Comparative Genomic Hybridization”:	43
2.3.2. Tratamiento con bisulfito sódico:.....	45
2.3.3. MSP “Methylation Sensitive PCR”:	47
2.4. META-ANÁLISIS.	50
2.4.1. Material y métodos.	50
2.4.1.1. Selección de bases:.....	50
2.4.1.2. Ecuación de búsqueda:.....	50
2.4.1.3. Registro en la base de datos:.....	51
2.4.1.4. Almacenamiento en la base de datos:.....	51
2.4.1.5. Análisis de datos:.....	52
2.4.2. Resultados y discusión.....	54

2.4.3.	Limitaciones.....	59
2.4.4.	Conclusiones.....	59
3.	CONCLUSIONES.....	61
4.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
	ANEXO L. BASE DE DATOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LOS FACTORES EXTERNOS SOLO AFECTAN DIRECTAMENTE A F0, LOS POSIBLES EFECTOS SON HEREDABLES VARIAS GENERACIONES, F1 Y F2.	15
FIGURA 2. GENOMA COMPLETO HUMANO. MONTAJE GRCh38.p13 (GENOME REFERENCE CONSORTIUM HUMAN BUILD 38), ASAMBLEA DE INSDC GCA_000001405.28, DICIEMBRE DE 2013. BASE DE DATOS ENSEMBL GENOME BROWSER.....	16
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN NUCLEOSOMA DEL OCTÁMERO DE HISTONAS UNIDO A LA HEBRA DE ADN.	17
FIGURA 4. FIBRA DE CROMATINA. A) ADN UNIDO A LAS HISTONAS FORMANDO LA ESTRUCTURA COLLAR DE PERLAS, FORMADA POR LA REPETICIÓN DE NUCLEOSOMAS. B) ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR FORMADA POR SOLENOIDES (AGRUPACIONES DE NUCLEOSOMAS). C) AUMENTA EL EMPAQUETAMIENTO, FORMANDO LA FIBRA DE CROMATINA EN BUCLES. D) LLEGANDO AL MAYOR GRADO DE COMPACTACIÓN FORMANDO UN DENSO PAQUETE DE CROMATINA, EL CROMOSOMA. E) CROMÁTIDAS HERMANAS CONDENSADAS EN LA PROFASE DE LA MITOSIS EN EL CICLO CELULAR.	18
FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL ADN. A) MODELO ORIGINAL PROPUESTO POR WATSON Y CRICK, MODELO DE LA DOBLE HÉLICE. B) NUCLEÓTIPO FORMADO POR UN GRUPO FOSFATO, AZÚCAR Y UNA BASE NITROGENADA. C) CADENAS ANTIPARALELAS COMPLEMENTARIAS DEL ADN, UNIÓN ENTRE LAS BASES MEDIANTE PUENTES DE HIDROGENO.	19
FIGURA 6. A. GUANINA Y B. CITOSINA	21
FIGURA 7. S-ADENOSIL-L-METIONINA (SAM).....	21
FIGURA 8. LOS AMINOÁCIDOS LISINA (K) Y ARGININA (R)	23
FIGURA 9. ESQUEMA HISTONAS. A) ESTRUCTURA DE LAS CUATRO HISTONAS, CADA UNA DE LAS HISTONAS CONTIENE UNA COLA N-TERMINAL, QUE ESTÁ SUJETO A VARIAS FORMAS DE MODIFICACIÓN COVALENTE, Y UN DOMINIO DE PLEGAMIENTO ("HISTONE FOLD"). B) MODIFICACIONES EN LAS COLAS DE LAS HISTONAS. (15).....	24
FIGURA 10. ESQUEMA DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS Y LA COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA. ...	26
FIGURA 11. DESARROLLO EMBRIONARIO	28
FIGURA 12. DIFERENTES TIPOS CELULARES GRACIAS A LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.	28
FIGURA 13. ISLA CPG.	29
FIGURA 14. LOS GENES NO IMPRESOS SE EXPRESAN A PARTIR DE AMBOS ALELOS (GEN A) O DE NINGUNO DE ELLOS (GEN B). LOS GENES IMPRESOS TIENEN UNA EXPRESIÓN MONO ALÉLICA, POR LO QUE SOLO PERMITEN LA EXPRESIÓN DE UN ALELO, EL PATERNO EN EL CASO DEL GEN C Y EL MATERNO EN EL CASO DEL GEN D.....	35
FIGURA 15. HIBRIDACIÓN COMPETITIVA EN LA TÉCNICA DE CGH ARRAY.....	43
FIGURA 16. DIFERENCIA DE LA INTENSIDAD DE LA SEÑAL. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS.....	44
FIGURA 17. EJEMPLO LOCUS: 7Q11.23 PERTENECIENTE A LA REGIÓN DE LA DELECIÓN QUE PROVOCA SÍNDROME DE WILLIAMS	45
FIGURA 18. TRATAMIENTO CON BISULFITO DE SODIO. MÉTODO DE ESTUDIO DEL ADN	46
FIGURA 19. COMPARACIÓN DE SECUENCIA NO METILADA Y SECUENCIA METILADA DE REACCIÓN EN PCR.....	47
FIGURA 20. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	48
FIGURA 21. RELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y EL BAJO PESO AL NACER DE LOS NIÑOS NACIDOS MEDIANTE TRA, A SU VEZ, RELACIONADO CON EL PARTO PREMATURO Y ABORTOS ESPONTÁNEOS. (N=NÚMERO DE TRABAJOS).....	55
FIGURA 22. RELACIÓN ENTRE LAS TRA Y LOS TRASTORNOS EN LA EDAD ADULTA.	56
FIGURA 23. RELACIÓN ENTRE LAS TRA, LAS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS, LOS TRASTORNOS, LA IMPRONTA Y LAS MALFORMACIONES.....	56
FIGURA 24. RELACIÓN ENTRE LAS TRA, LAS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS, LOS TRASTORNOS Y TRATAMIENTOS DE INFERTILIDAD.	57
FIGURA 25. RELACIÓN ENTRE LAS TRA Y LA METILACIÓN DEL ADN, MECANISMO EPIGENÉTICO.	57
FIGURA 26. RELACIÓN ENTRE LOS TRASTORNOS EPIGENÉTICOS Y QUE TIPO DE ENFERMEDADES PRESENTAN EN LA EDAD ADULTA.	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE LAS BASES DE DATOS.....	52
GRÁFICA 2. GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE NÚMERO DE TRABAJOS (N) Y EL AÑO DE PUBLICACIÓN. EN AZUL LA LÍNEA DE TENDENCIA.....	53
GRÁFICA 3. GRÁFICA DE COLUMNAS AGRUPADAS PARA COMPARAR EL NÚMERO TOTAL DE TRABAJOS ENCONTRADOS DE LAS VARIABLES A TENER EN CUENTA.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARATIVA DE LOS SÍNDROMES PRODUCIDOS POR VARIACIONES EN LA IMPRONTA.....	41
TABLA 2. MECANISMOS EPIGENÉTICOS IMPLICADOS EN CIERTAS FUNCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO HUMANO (68).....	42
TABLA 3. COMPARATIVA DE LA RESOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS.....	48
TABLA 4. TABLA RESUMEN DE LAS BASES DE DATOS, CON LOS RESULTADOS A PRIORI.....	51
TABLA 5. ANÁLISIS DE DATOS PARA META-ANÁLISIS.....	52
TABLA 6. ANÁLISIS DE DATOS. VARIABLES Y EL NÚMERO DE TRABAJOS CORRESPONDIENTES EN TOTAL, SIN RELACIÓN ENTRE ELLOS. (N= NÚMERO DE TRABAJOS).....	53

PRESENTACIÓN

En esta memoria se presenta el trabajo teórico-práctico realizado durante el curso 2020/2021 en el Instituto de Biología y Genética Molecular, IBGM, correspondiente al Trabajo de Fin de Grado, del Grado en Química de la Facultad de Ciencias de Valladolid.

Agradecimientos a mi tutor del trabajo JUAN JOSÉ TELLERÍA, y a la tutora del centro LUCÍA CITORES.

Memoria realizada apoyándose en estudios indicados en la bibliografía.

RESUMEN

Actualmente, en países desarrollados, entre el 1 y el 4% de los niños nacen mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), las cuales, se caracterizan por una manipulación controlada de los gametos y embriones. Durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario temprano, se producen modificaciones epigenéticas, cambios que regulan la expresión génica sin cambiar la secuencia de nucleótidos del ADN. Hay indicios de que las personas nacidas mediante TRA, son más propensas a sufrir ciertas enfermedades, cardiovasculares, neurológicas, diabetes, obesidad, entre otras, que aquellas que han nacido por reproducción natural.

En este trabajo, se realiza una revisión bibliográfica y un meta-análisis en busca de evidencias que relacionen el desarrollo de estas enfermedades con los niños nacidos mediante TRA, cómo estas técnicas influyen en el epigenoma, y cómo estas modificaciones epigenéticas (microdeleciones de un gen, errores de impronta, etc.) aumentan la probabilidad de sufrir diferentes enfermedades o trastornos.

ABSTRACT

Currently, in developed countries, between 1 and 4% of children are born using Assisted Reproduction Techniques (ART), which are characterized by a controlled manipulation of gametes and embryos. During gametogenesis and early embryonic development, epigenetic modifications occur, changes that regulate gene expression without changing the nucleotide sequence of DNA. There are indications that people born through ART are more likely to suffer from certain diseases, cardiovascular, neurological, diabetes, obesity, among others, than those born through spontaneous reproduction.

In this work, a bibliographic review and a meta-analysis are carried out in search of evidence that relates the development of these diseases with children born through ART, how these techniques influence the epigenome, and how these epigenetic modifications (microdeletions of a gene, imprinting errors, ...) increase the probability of suffering from different diseases or disorders.

ABREVIATURAS

Ac:	Grupo acetilo (-C ₂ H ₃ O)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AS:	Síndrome de Angelman.
BWS:	Síndrome de Beckwith-Wiedemann.
CGH array:	“Array Comparative Genomic Hybridization”:
DMR:	Regiones con metilación diferencial “differentially metylated región”
DNMT:	ADN metiltransferasa, “DNA Methyl Transferases”.
DPG:	Diagnóstico genético preimplantacional.
ESHE:	European Society of Human Reproduction and Embryology
F:	Fenotipo.
FET:	Transferencia de embriones criopreservados, “Frozen Embryo Transfer”
FISH:	Hibridación fluorescente in situ.
FIV:	Fecundación in vitro.
H:	Histona.
HAT:	Histona acetiltransferasa, “Histone Acetyl Transferases”
HDAC:	Histona deacetilasa, “Histone DeACetylases”
HDM:	Histona demetilasa, “Histone DeMethylases”
HMT:	Histona metiltransferasas, “Histone Methyl Transferases”
ICRs:	Regiones de control de impronta, "Imprinting Control Regions".
ICSI:	Técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
K:	Lisina.
MSP:	“Methylation Sensitive PCR”
Pb:	Pares de bases
PCR:	“Polymerase Chain Reaction”
PTMs:	Modificaciones post-traduccionales.
PW:	Síndrome de Prader-Willi.
R:	Arginina.
SAM:	S-adenosil-L-metionina

SEF: Sociedad Española de Fertilidad.
SRS: Síndrome de Silver-Russell.
TRA: Técnicas de reproducción asistida.
5-mc: 5- metilcitosina.

1. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es el estudio mediante revisión bibliográfica del riesgo de alteraciones epigenéticas en los niños nacidos mediante técnicas de reproducción asistida (TRA) comparado con los niños que nacen por reproducción natural.

Evaluar mediante la realización de un meta-análisis, si las TRA aumentan el riesgo de desarrollar determinadas patologías y si tienen algún impacto tanto en la infancia como en la edad adulta.

2. DESARROLLO

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Definición de epigenética.

El término epigenética (“epi”-encima, sobre; “genética”-referido a los genes) significa por encima de la genética y es el estudio de las modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a una alteración en la secuencia del ADN, y que, además, estas modificaciones son heredables y reversibles.

El término epigenética apareció en 1940, utilizado por Conrad Hal Waddington y definido como “la epigenética son las interacciones causales entre los genes y sus productos, de los cuales resulta su fenotipo” (1). En 1975 Robin Holliday demostró el primer mecanismo epigenético. Demostró que la metilación del ADN en mamíferos inhibía o regulaba la expresión de los genes. Él, también es el autor de la primera definición de epigenética que seguimos utilizando hoy en día; “epigenética es el estudio de los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y/o meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del ADN y que pueden ser reversibles”(2). Esto no quiere decir que sean reversibles, pero sí que pueden serlo.

Los mecanismos epigenéticos, son los mecanismos por los cuales los factores relacionados con el modo de vida y los factores ambientales modifican la expresividad de los genes, sin cambiar su estructura y su secuencia. Los procesos epigenéticos suelen añadir o quitar pequeñas moléculas químicas en zonas muy concretas del ADN, que son capaces de activar o desactivar genes. Debido a estas marcas químicas cambia la forma en la que se expresa el ADN, pero sin modificar la secuencia genética.

Uno de los grandes dogmas de la biología ha sido la inalterabilidad de los genes a lo largo de la vida de un individuo, es decir, el ADN de todas las células del organismo es el mismo. Pero también sabemos que, a lo largo de la vida de un individuo el genoma puede sufrir alteraciones. Hay muchos mecanismos que alteran los genes, por ejemplo, alteraciones cromosómicas, mutaciones somáticas e inestabilidad de variaciones tándem. Los genes a lo largo de la vida no son inalterables, se producen variaciones que pueden producir fenómenos como el cáncer.

El ADN de todas las células del organismo es exactamente el mismo a excepción de las células germinales. Sin embargo, las células no son iguales fenotípicamente y realizan funciones diferentes y actúan de manera diferente en el tiempo, las células se activan y se inactivan. Por lo tanto, el diferente comportamiento de los tipos de células de un organismo no se debe al genoma que poseen porque todas tienen los mismos genes, sino que se debe a qué genes utilizan cada una, qué parte del genoma está activo. El epigenoma de cada célula es quien la define fenotípicamente. No es suficiente con tener los genes que codifican proteínas y que estos sean correctos, hace falta, además que, la

expresividad de esos genes sea controlada de una manera precisa para que todo el sistema funcione.

La epigenética, por lo tanto, regula la expresividad de los genes de cada célula, es heredable, y depende de ciertas condiciones bioquímicas como es la modificación de las histonas, metilación de las citosinas...

2.1.2. Factores de las variaciones epigenéticas.

Las fuentes de variabilidad que condicionan el fenotipo físico y biológico de un individuo son los factores ambientales, factores genéticos y hábitos de la vida. Los mecanismos epigenéticos, son los mecanismos por los cuales los factores relacionados con el modo de vida y los factores ambientales modifican la expresividad de los genes, sin cambiar su estructura y su secuencia.

Esta idea ya fue propuesta por Lamarck, a principios del siglo XIX. Lamarck afirmaba que la evolución se producía por pequeños cambios a lo largo de la vida de un individuo y esos cambios se transmitían a sus descendientes. La teoría que prevaleció fue la teoría de Darwin, que postuló que los individuos que mejor se adaptaban eran los que sobrevivían, y que esas características se transmitían a la descendencia. Hoy en día, podemos considerar la teoría de Lamarck al menos parcialmente cierta, hablando de epigenética, demostrando que las modificaciones a lo largo de la vida debido a factores externos sí que son heredables haciendo necesaria una nueva teoría unificada de la evolución.

El objeto de la epigenética es el estudio de todas aquellas modificaciones en el genoma y en su expresividad que van más allá de la secuencia genética, es decir, que no afectan a la secuencia genética.

Se ha demostrado que los factores externos a los que se expone un individuo a lo largo de la vida, no solo afectan a ese individuo, sino que también pueden afectar a su descendencia y a la descendencia de su descendencia (**Figura 1**). Como se ha enunciado en la definición de epigenética en el apartado anterior, las modificaciones epigenéticas son heredables y no solo tendrían consecuencias en el individuo expuesto a ciertos factores, (F0) primera generación filial, se transmitiría a su descendencia que no se ha expuesto directamente a los factores, segunda generación (F1), sino que estas consecuencias podrían llegar a la tercera generación (F2) por las células germinales que se están desarrollando dentro del feto. En estudios en animales se ha observado que se producen efectos transgeneracionales, es decir, que se extienden hasta la generación F3. (3)

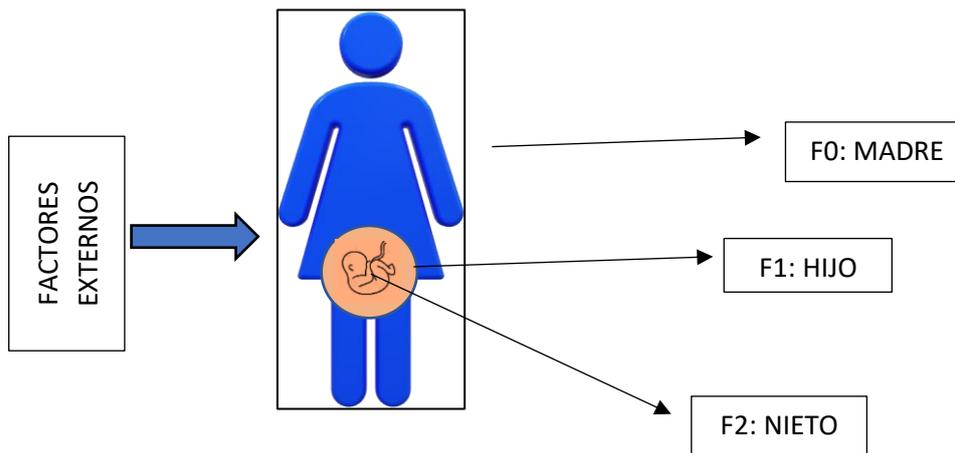


Figura 1. Los factores externos solo afectan directamente a F0, los posibles efectos son heredables varias generaciones, F1 Y F2.

En el estudio de los efectos producidos por la hambruna holandesa del año 1944, quedan bien reflejadas las consecuencias epigenéticas. Las generaciones actuales, ya sean hijos o nietos de las personas que sufrieron la hambruna, tienen mayor probabilidad de sufrir diabetes, tienen una esperanza de vida media menor, y padecen más frecuentemente obesidad, y otras enfermedades. Es un estudio esclarecedor sobre cómo las condiciones que padecieron las madres que sufrieron la hambruna puede afectar a su descendencia varias generaciones después. (4)

Otro ejemplo, de cómo afecta los factores externos no solo a los individuos expuestos sino, también a su descendencia es el caso de envenenamiento por consumo de pescado contaminado con metilmercurio, en las décadas de 1950 y 1960 entre los residentes de Minamata, Japón, por la contaminación de la fábrica química de Chisso Corporation. El mercurio era vertido por la fábrica química al agua de la zona, de este modo se contaminaba a los peces que eran consumidos por la población. El mercurio se acumulaba en los organismos. Se ha demostrado que la exposición al mercurio es la causa de numerosos problemas de salud, incluso tras una exposición pequeña. También se ha demostrado que la exposición al mercurio afecta al desarrollo intrauterino y especialmente durante las primeras etapas de la vida, incrementando entre los afectados el riesgo de presentar problemas neuropsicológicos. (5)

Un estudio reciente, relaciona el tabaco con modificaciones epigenéticas en la descendencia (6). Experimentos en ratones, a los que se expuso al humo del tabaco, indican un aumento del riesgo de cáncer en la madre y en su descendencia. Es decir, que cuando se fuma, no solo aumenta el riesgo de cáncer en nuestra persona, sino que las modificaciones epigenéticas producidas por el tabaco, producen un aumento del riesgo de cáncer en los hijos y también en los nietos.

2.1.3. Niveles de organización.

Los genomas más complejos de las células eucariotas requieren niveles superiores de organización, cuyos detalles estructurales son observables en los cromosomas.

Los genes son segmentos de un cromosoma que contienen la información para un polipéptido funcional o una molécula de ARN. Además de los genes, los cromosomas contienen diversas secuencias reguladoras implicadas en la replicación, la transcripción y otros procesos. Los genes son las unidades básicas que contienen la información genética.

El material genético de las células eucariotas está repartido entre varios cromosomas cuyo número diploide ($2n$) depende de la especie. Las células humanas somáticas tienen 46 cromosomas. Cada uno de los cromosomas contiene una única molécula de ADN muy larga. Las moléculas de ADN de los 24 tipos diferentes de cromosomas humanos (22 parejas análogas más los cromosomas sexuales X y Y (**Figura 2**)) tienen diferentes longitudes. Cada tipo de cromosoma contiene un conjunto característico de genes. El ADN humano contiene aproximadamente $3 \cdot 10^9$ pb, aproximadamente 20000 genes y 46 cromosomas. (7)

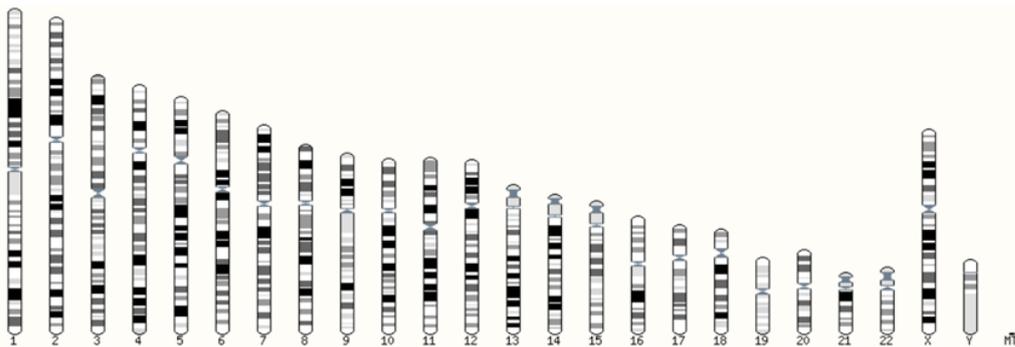


Figura 2. Genoma completo humano. Montaje GRCh38.p13 (Genome Reference Consortium Human Build 38), Asamblea de INSDC GCA_000001405.28, diciembre de 2013. Base de datos Ensembl Genome Browser.

Muchos genes de las células eucarióticas están interrumpidos por secuencias no codificantes denominadas intrones. Los segmentos codificantes separados por los intrones se denominan exones.

Sólo alrededor del 1,5% del ADN genómico humano codifica proteínas. Incluso cuando se incluyen los intrones, los genes representan menos de un tercio del ADN genómico humano. Gran parte del ADN restante consiste en secuencias repetidas de diversos tipos. Los ácidos nucleicos parásitos, conocidos como transposones, representan la mitad del genoma humano.

Los cromosomas eucarióticos poseen dos importantes secuencias de ADN repetitivo con funciones especiales, los centrómeros, que son los sitios de unión del uso mitótico y los telómeros, localizados en los extremos de los cromosomas.

Durante el ciclo celular eucariótico se producen grandes cambios en la estructura de los cromosomas. El material cromosómico, denominado cromatina, es amorfo y aparenta encontrarse al azar por el núcleo celular. Durante la profase del ciclo celular, los cromosomas se condensan y adquieren la forma definida de los pares de cromátidas hermanas (**Figura 4.E**). Esta compactación es el resultado de la superposición de varios niveles de plegamiento altamente organizado. El ADN se encuentra íntimamente unido a complejos proteicos, histonas, que a menudo se hallan espaciados regularmente (**Figura 4.A**). Esta formación en "rosario" son complejos de histonas y ADN, formando el nucleosoma, la unidad fundamental de organización de la cromatina, a partir de la cual se organiza el empaquetamiento de orden superior (**Figura 4.C**). Cada nucleosoma contiene ocho moléculas de histona, dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (**Figura 3**). El espaciado de los nucleosomas a lo largo del ADN define una unidad repetitiva de unos 200 pb, de los que 146 pb están fuertemente unidos alrededor del núcleo de histonas y el resto sirve de ADN de unión entre los nucleosomas. Las colas de las histonas se extienden hacia el exterior de los nucleosomas y están intrínsecamente desordenadas (**Figura 3**). La mayoría de las modificaciones de las histonas ocurren en las colas.

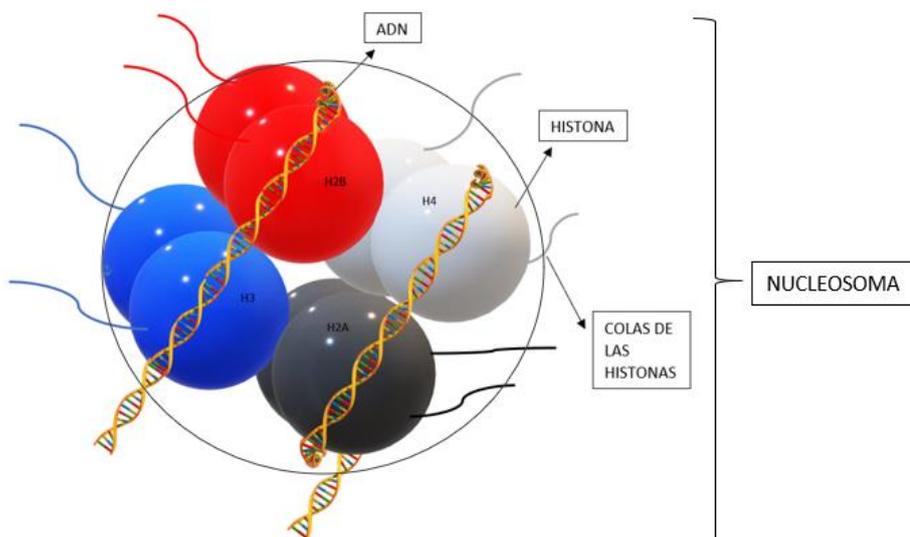


Figura 3. Representación gráfica de un nucleosoma del octámero de histonas unido a la hebra de ADN.

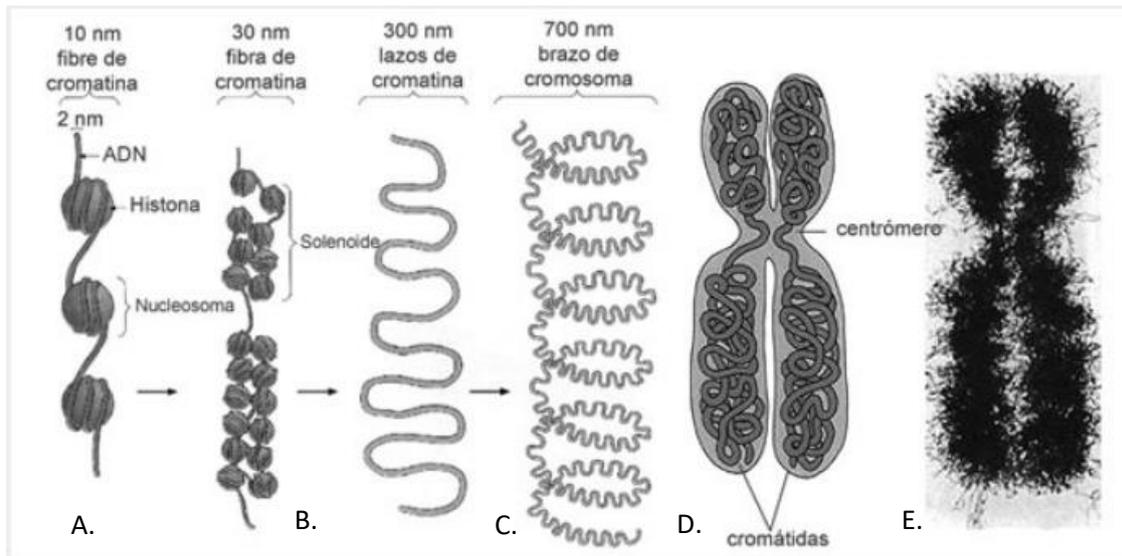


Figura 4. Fibra de cromatina. A) ADN unido a las histonas formando la estructura collar de perlas, formada por la repetición de nucleosomas. B) estructura de orden superior formada por solenoides (agrupaciones de nucleosomas). C) aumenta el empaquetamiento, formando la fibra de cromatina en bucles. D) llegando al mayor grado de compactación formando un denso paquete de cromatina, el cromosoma. E) cromátidas hermanas condensadas en la profase de la mitosis en el ciclo celular.

Otro factor que afecta la unión del ADN a las histonas en los nucleosomas es la secuencia del ADN. Los núcleos de histonas no se unen al azar al ADN, sino que tienden a situarse en ciertas posiciones. No se conoce con seguridad la causa del posicionamiento, pero en algunos casos parece depender de la abundancia local de pares de bases A=T en los lugares de contacto de la hélice del ADN con las histonas. (8)

La composición química y la estructura del ADN es el punto que queda de explicar para entender la organización cromosómica. El ADN está compuesto por dos cadenas, cada una formada por nucleótidos unidos por enlace fosfodiéster. Cada nucleótido, a su vez, está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G), y siempre una A se enfrenta a una T y una C se enfrenta a una G en la doble cadena. Las bases enfrentadas se dice que son complementarias. El ADN adopta una forma de doble hélice, como una escalera caracol donde los lados son cadenas de azúcares y fosfatos conectadas por las bases nitrogenadas complementarias unidas mediante puentes de hidrogeno. (Figura 5)

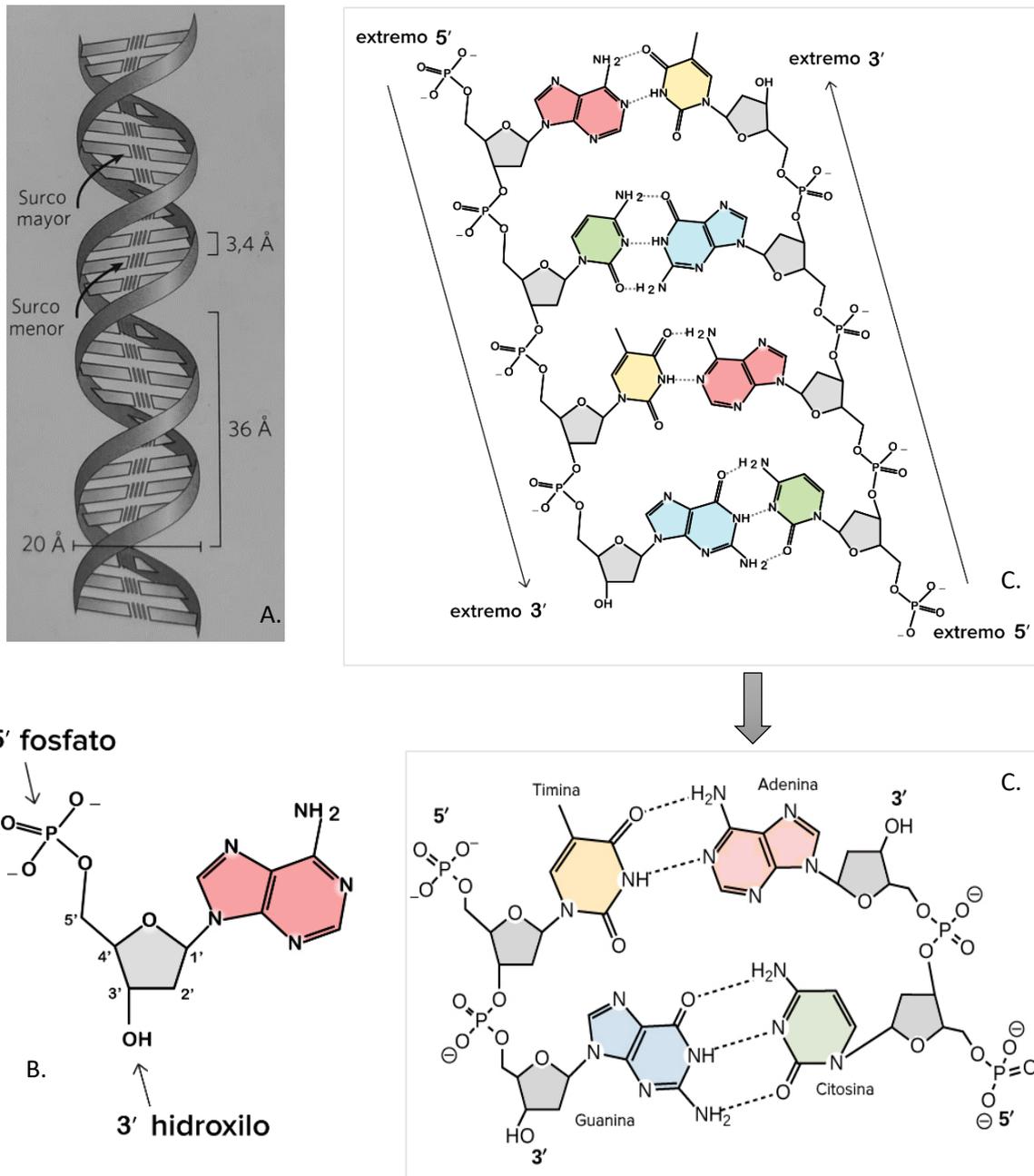


Figura 5. Estructura del ADN. A) modelo original propuesto por Watson y Crick, modelo de la doble hélice. B) nucleótido formado por un grupo fosfato, azúcar y una base nitrogenada. C) cadenas antiparalelas complementarias del ADN, unión entre las bases mediante puentes de hidrogeno.

Mediante diversas técnicas se ha podido demostrar que en el interior del núcleo celular cada cromosoma ocupa un lugar específico (7). La posición que ocupa un cromosoma en el interior del núcleo es importante ya que influye en la activación y desactivación de los genes que contiene. Sabemos que el máximo empaquetamiento y condensación del ADN del cromosoma, solo es observable antes de la división celular (mitosis). En regiones más condensadas o más distendidas forman respectivamente la heterocromatina o la eucromatina.

La heterocromatina permite la separación de las cromátidas durante la mitosis y, además, protege los extremos de los cromosomas. La heterocromatina es rica en secuencias silenciadoras transcripcionales. Este silenciamiento génico está relacionado con un alto grado de metilación y bajo grado de acetilación de determinados residuos localizados en histonas como son: histona H3 en las lisinas 9 o 27 (H₃K₉, H₃K₂₇) o histona H4 en la lisina 20 (H₄K₂₀), tal como se explica en el apartado siguiente. El alto grado de condensación de la heterocromatina hace que sus genes sean inaccesibles a los factores transcripcionales manteniéndose silenciados. Los genes contenidos en la eucromatina, sin embargo, pueden ser activados o seguir inactivos. Asimismo, la eucromatina puede ser desempaquetada con el fin de llevar a cabo procesos de replicación o de reparación. Estas modificaciones van a alterar el grado de organización de la cromatina. (9)

2.1.4. Mecanismos epigenéticos.

Las modificaciones epigenéticas se producen por una serie de variaciones bioquímicas sobre el ADN, sin alterar su secuencia, pero sí que se produce una modificación en la forma de empaquetamiento, y estos cambios son heredables mitóticamente y meióticamente.

Estas modificaciones químicas se definen como patrones de expresión, lo que significa que las regiones más empaquetadas no se expresarán, y las menos empaquetadas sí que se podrán expresar, ya que las regiones menos empaquetadas podrán ser accesibles a las distintas proteínas que producirán la transcripción de los genes que se encuentran en la región. El mecanismo de modificación epigenética más estudiado es la metilación de las citosinas de regiones ricas en estos nucleótidos.

Tras analizar la metilación del genoma de más de 23000 personas, los investigadores han detectado 4452 epivariaciones (variaciones epigenéticas) en los cromosomas no sexuales. Muchas de estas epivariaciones provocan un cambio de expresión fuera de lo habitual, aunque no todas son negativas para el organismo. (10)

Además de la metilación del ADN, se han descrito otros mecanismos por los que se modifica la expresión de un gen, como la modificación postraduccional de histonas, o la expresión de microARNs no codificantes...

Nos centramos en los dos mecanismos epigenéticos más estudiados:

2.1.4.1. Metilación del ADN.

La metilación del ADN, también llamada metilación de las citosinas (base nitrogenada de los nucleótidos que componen la cadena de ADN), consiste en la unión de un grupo metilo a las citosinas del ADN. El grupo metilo unido a la citosina impedirá la unión de las proteínas necesarias para la expresión de un gen en concreto, ya que cuando las citosinas de una región del genoma están metiladas, el ADN está más empaquetado, es

decir, menos accesible a los factores de transcripción. Es un proceso reversible, pudiendo ocurrir tanto la metilación como la desmetilación de las citosinas.

La metilación del ADN afecta a las regiones ricas en citosinas. Las más importantes y conocidas son las islas CpG que son regiones que presentan unas proporciones de citosinas y guaninas (**Figura 6**) por encima del 55% y que suponen el 1% del genoma. La metilación de las citosinas está catalizada por las ADN-metiltransferasas (11). El nombre de las islas CpG, proviene de “C” de citosina y la “G” de guanina y la “p” de los enlaces fosfato entre los nucleótidos del ADN. Las islas CpG no son las únicas regiones ricas en citosinas.

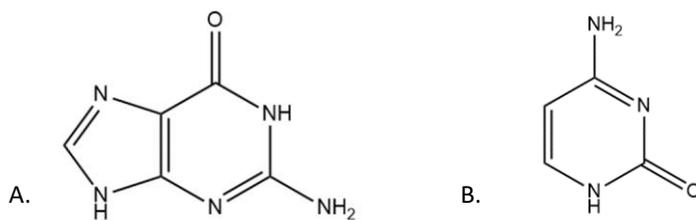


Figura 6. A. Guanina y B. Citosina

Las islas CpG se encuentran en las regiones reguladoras y no en los segmentos codificantes del ADN, por lo que las islas CpG están implicadas en el empaquetamiento del ADN formando una estructura más compacta que la hace inaccesible para los factores de transcripción. Frecuentemente regulan más de un gen. Las islas CpG se encuentran en las regiones promotoras de los genes llamados “housekeeping”, que son los genes no específicos del tejido, es decir genes que se expresan en muchos de los tipos celulares. Sin embargo, los genes específicos de los tejidos como por ejemplo los que codifican alfa y beta globina de la hemoglobina de los eritrocitos, no están regulados por regiones CpG, sino por regiones específicas que se ligan a reguladores específicos.

La metilación de las citosinas suele ser inhibitoria.

La reacción de metilación del ADN, es una reacción enzimática catalizada por la enzima ADN-metiltransferasa (DNMT) (12). La reacción consiste en la unión de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de la citosina, formando 5-metilcitosina (5-mc). El grupo metilo proviene de un sustrato, S-adenosil-L-metionina (SAM) (**Figura 7**). (**Reacción 1**).

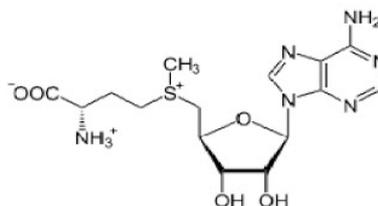
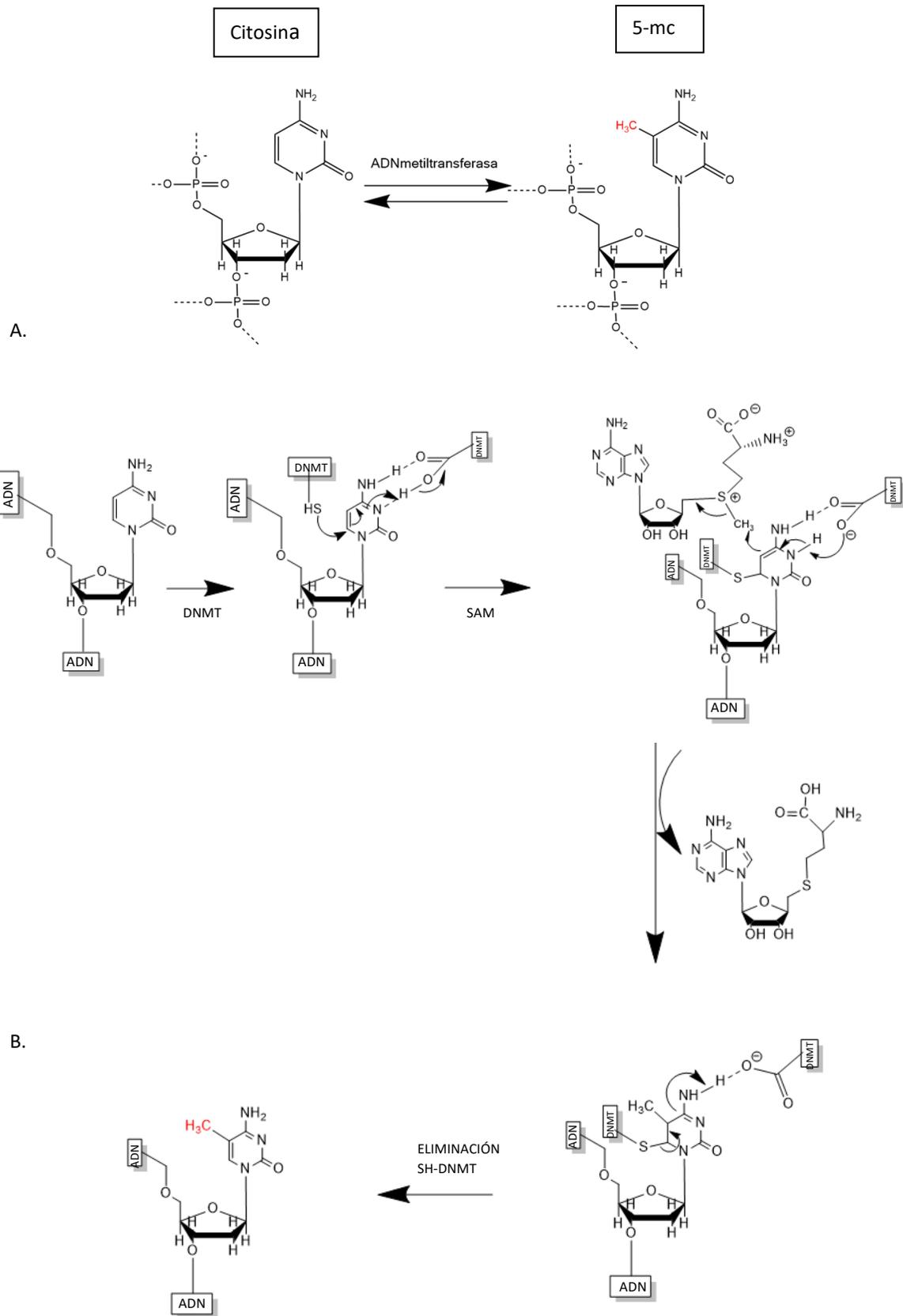


Figura 7. S-adenosil-L-metionina (SAM)

Como veremos en los siguientes apartados, la metilación del ADN está involucrada en diversos procesos fisiológicos como la impronta genómica, regulación de los fenómenos de transcripción, organización de la estructura de la cromatina, entre otros. En

definitiva, regula la expresividad de los genes (13). Una inadecuada metilación del ADN puede provocar diferentes enfermedades.



2.1.4.2. Modificación de las histonas.

Dentro de cada una de las células de un ser humano se encuentran 2 metros de hebra de ADN. La hebra de ADN no se encuentra en su estructura primaria, doble hélice estirada, se encuentra ultra empaquetada, muy bien estructurada y diseñada, gracias al octámero de histonas, sobre el que se enrolla el ADN para empaquetarse formando el nucleosoma (**Figura 3 y 4**). Las histonas del nucleosoma H3, H4, H2A y H2B, son proteínas pequeñas y básicas muy conservadas en la evolución. Presentan una región muy conservada en el dominio central denominado “dominio de plegamiento” mientras que las colas terminales son más variables. Estas colas son ricas en los aminoácidos básicos lisina (K) y arginina (R). (**Figura 8 y 9**). (14)

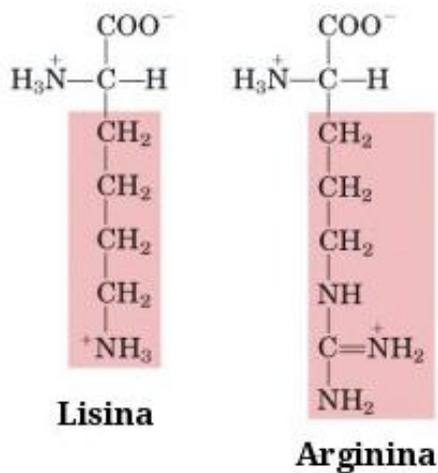


Figura 8. Los aminoácidos Lisina (K) y Arginina (R)

Las modificaciones químicas llevadas a cabo por diferentes enzimas en las histonas ocurren mayoritariamente en los extremos N-terminal o C-terminal de las colas de las histonas (**Figura 9**). Estas modificaciones post-traduccionales (PTMs) son principalmente la acetilación y metilación de determinados residuos aminoacídicos, aunque existen muchas otras, como la fosforilación, la ribosilación o la ubiquitinación. (**Figura 9**)

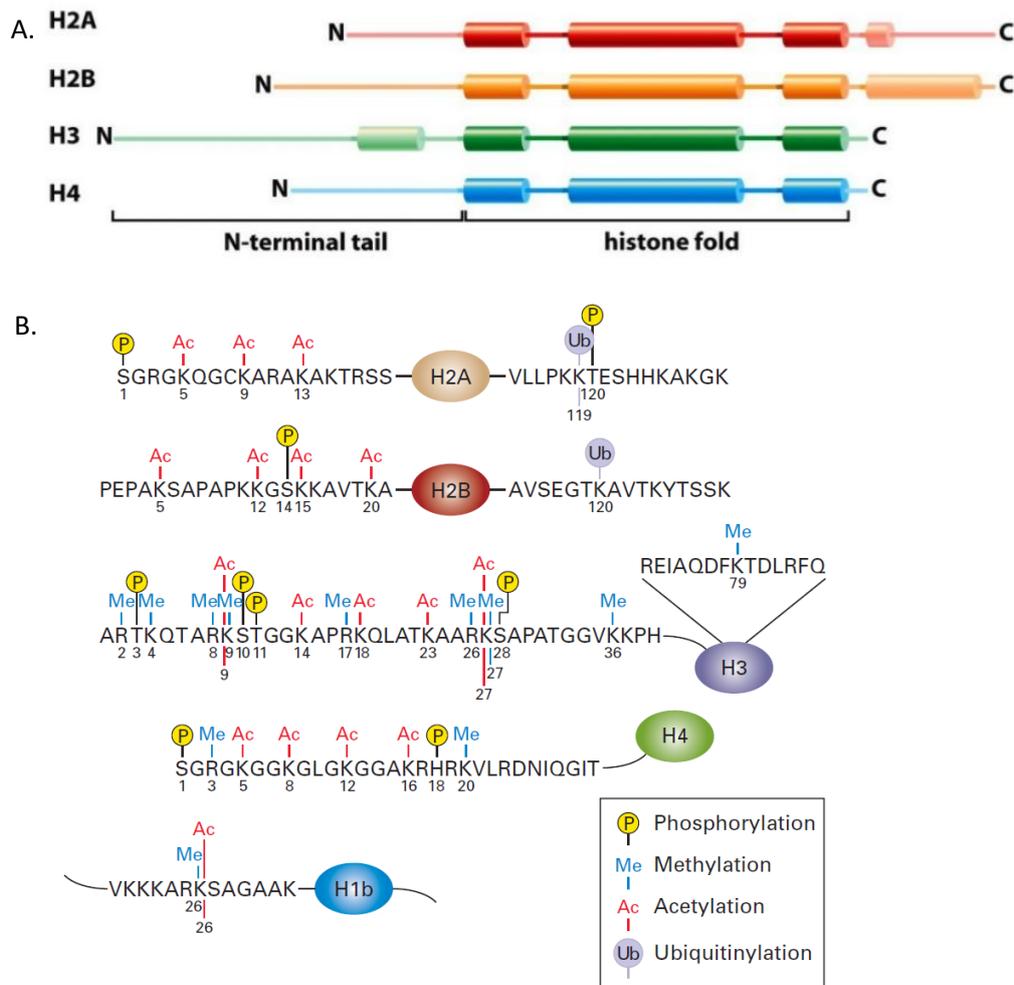


Figura 9. Esquema histonas. A) Estructura de las cuatro histonas, cada una de las histonas contiene una cola N-terminal, que está sujeto a varias formas de modificación covalente, y un dominio de plegamiento ("histone fold"). B) Modificaciones en las colas de las histonas. (15)

El grado de empaquetamiento de la cromatina está determinado por las histonas (**Figura 10**). Habrá zonas donde el ADN se encuentre muy empaquetado, por lo que los genes que se encuentren en estas zonas no se expresarán, ya que las proteínas de la maquinaria de transcripción no tendrán acceso a estos genes en las zonas muy empaquetadas. Por el contrario, cuando las histonas desenrollan el ADN, ciertas zonas pasan a estar accesibles, en esas zonas sí que se expresarán los genes contenidos. Este mecanismo de empaquetamiento del ADN dentro de las células está controlado por moléculas químicas. (**Figura 9**)

Hay dos tipos de modificaciones de las histonas, las activadoras y las inhibidoras de la expresión de los genes. Algunas de las más conocidas son: activadoras como acetilación de lisinas de las histonas, metilación de argininas, metilación de algunas lisinas en H3 y H4 (H_3K_{36} , H_3K_{79} , H_3K_4) (**Figura 9**); modificaciones inhibidoras como metilación de algunas lisinas en H3 y H4 (H_3K_9 , H_3K_{27} , H_4K_{20}) (**Figura 9**). Las colas de las histonas sobresalen del nucleosoma, dichas colas sufren modificaciones tras la traducción, en particular en las histonas H3 y H4. La modificación de las histonas es la forma de cambiar la expresividad de los genes, es decir, otro mecanismo epigenético.

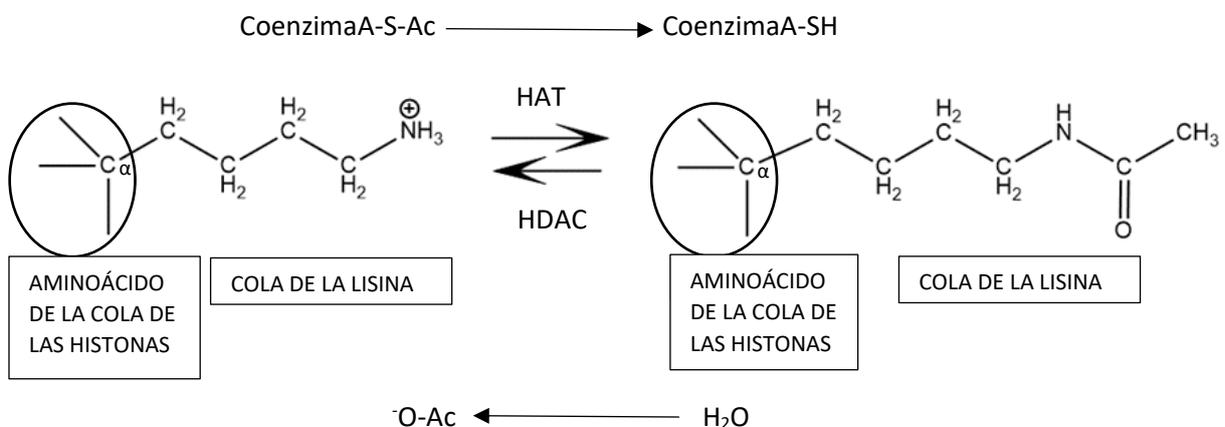
La acetilación y metilación son modificaciones químicas postraduccionales (PTMs) de las histonas y otras proteínas. Esta unión del grupo acetilo o metilo, produce un cambio en el empaquetamiento de la histona (**Figura 10**). Al añadir el grupo Ac o Me, se produce una relajación en la estructura de la histona, provocando que ciertas zonas de ADN estén más accesibles a los factores de transcripción. Los genes que se encuentren en esas zonas del ADN se podrán expresar ya que están accesibles. Asimismo, la reacción inversa de desacetilación o desmetilación, donde se elimina el grupo Ac o Me, provoca un mayor empaquetamiento, haciendo más inaccesible el ADN a los factores de transcripción, por lo que los genes que se encuentren en estas zonas del ADN no se expresarán.

Este mecanismo explica la variabilidad en la expresividad de los genes en cada célula. De este modo, hay células especializadas, con funciones concretas donde solo están activos o expresados ciertos genes. La existencia de distintos tipos celulares es posible gracias a los mecanismos epigenéticos. (**Figura 12**)

Una variación en las reacciones químicas de acetilación y desacetilación, o metilación y desmetilación de las histonas podrían provocar enfermedades, como veremos en los siguientes apartados.

1.4.2.1. ACETILACIÓN Y DESACETILACIÓN DE HISTONAS

La reacción de acetilación de las histonas es una reacción enzimática y reversible. Se produce en las colas de las histonas, más comúnmente en las lisinas (K) en las colas de H3 y H4. La reacción de acetilación consiste en añadir un grupo acetilo (Ac) al compuesto orgánico, reacción catalizada por las enzimas acetiltransferasas (HAT) en presencia de la coenzima A acetilada, que proporciona los grupos Ac. La reacción inversa, desacetilación de la histona, también una reacción enzimática, consiste en la eliminación del grupo Ac de la cola de las histonas en presencia de agua, reacción catalizada por las enzimas desacetiltransferasas (HDAC). (**Reacción 2**).



Reacción 2. Reacción de acetilación y desacetilación de histonas. Reacción que se produce en la cola de la lisina.

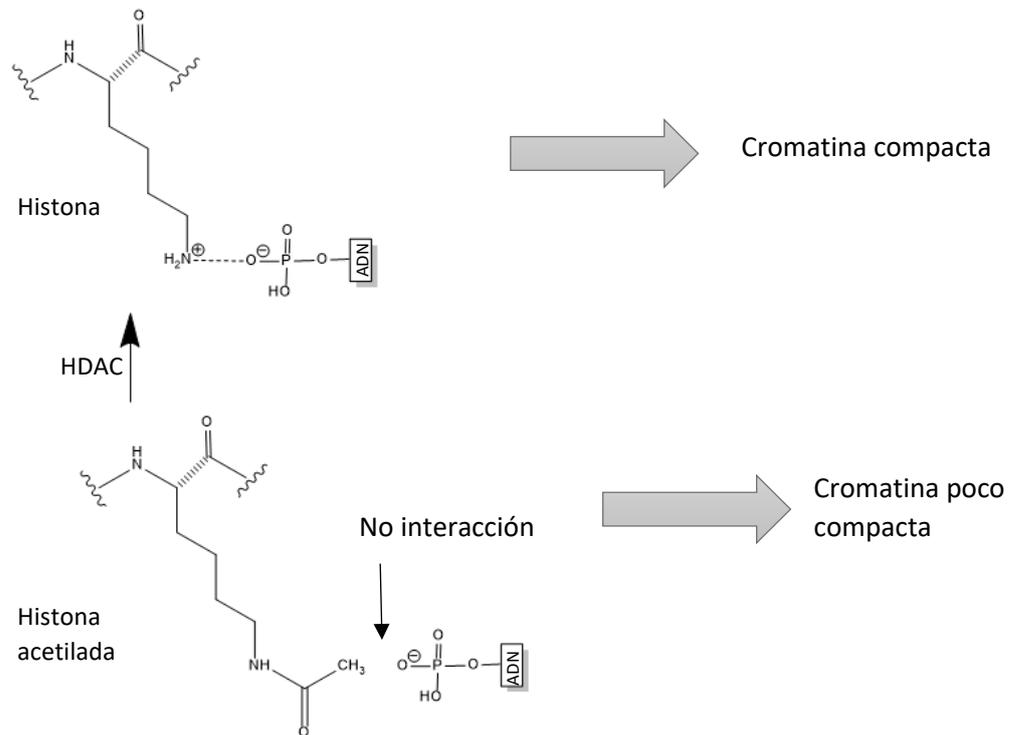
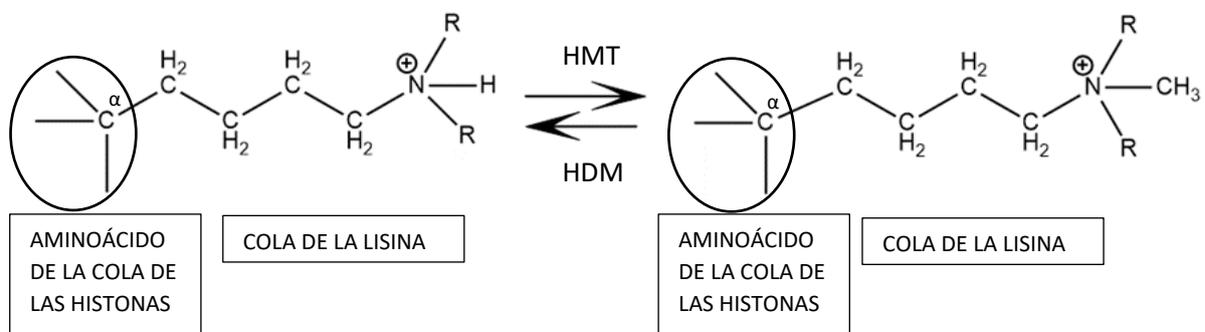


Figura 10. Esquema de la relación entre la acetilación de las histonas y la compactación de la cromatina.

1.4.2.2. METILACIÓN Y DESMETILACIÓN DE HISTONAS

La reacción de metilación de las histonas es una reacción enzimática y reversible. Se produce en las colas de las histonas, más comúnmente en las lisinas (K) en las colas de H3 y H4. La reacción de metilación, consiste en sustituir un hidrógeno por un grupo metilo (CH_3), que se encuentra unido al N-terminal de la cadena lateral de la lisina, reacción catalizada por las enzimas metiltransferasas (HMT) en presencia de la S-adenosil-L-metionina, que es de donde proviene el grupo metilo. La reacción, de desmetilación de la histona, también una reacción enzimática, consiste en la eliminación del grupo metilo de la cadena lateral de la lisina, reacción catalizada por la enzima desmetiltransferasas (HDM). **(Reacción 3)**.



Reacción 3. Reacción de metilación de histonas. [$\text{R}=\text{H}$]. Reacción que se produce en la cola de la lisina.

2.1.5. Desarrollo epigenético.

Una vez vistos los mecanismos epigenéticos, es importante saber cuándo y dónde se producen las epivariaciones.

2.1.5.1. Cuándo se produce el desarrollo epigenético.

Los cambios de expresividad del genoma se pueden producir a lo largo de toda la vida del individuo.

Las primeras fases del desarrollo embrionario son muy importantes. El genoma pasa por varias fases de programación epigenética (16). En primer lugar, tras la fecundación, en el cigoto, antes de que se fusionen los pronúcleos materno y paterno, se produce una desmetilación del paterno, permaneciendo metilado el pronúcleo materno. Se producen algunas divisiones mitóticas, y el ADN materno se va a ir desmetilando progresivamente. Tras las primeras divisiones mitóticas se forma la mórula y cuando el blastocisto se cavita se produce la remetilación del genoma con el nuevo patrón que va a permitir el inicio de la diferenciación de los nuevos tejidos. La primera fase de epigenética, la reprogramación tiene lugar durante la gametogénesis (**Figura 11**). En el desarrollo, la diferenciación de los tejidos se va a ir produciendo ya que se van a ir modificando los patrones de metilación, esto va a ir dando lugar a los diferentes tipos celulares (**Figura 12**). Luego, durante toda la vida, las diferentes células siguen sufriendo modificaciones epigenéticas que les permite adaptarse a los estímulos que reciben. Mientras que la desmetilación-metilación ocurre en todo el genoma del embrión temprano, las regiones genéticas improntadas están protegidas de los procesos de desmetilación y mantienen su metilación específica durante la gametogénesis, dependiendo del sexo del progenitor del que procede. La remetilación se completa con la implantación. Las aberraciones en la reprogramación epigenética, como hipermetilación o hipometilación de ADN dentro de una región genética específica, puede resultar en alteraciones de la actividad genética y alteraciones de la impronta. Las epimutaciones que causan enfermedades se mantienen mediante división celular y se pueden heredar (17).

Las células madre pluripotentes, van a ir sufriendo modificaciones epigenéticas durante toda la vida del individuo para transformarse en cualquier célula. Por ejemplo, los linfocitos B, al recibir un estímulo antigénico inician mediante cambios en su patrón epigenético, el proceso para convertirse en célula plasmática. Es decir, todo lo que va del genoma inicial al fenotipo en cada uno de los momentos de la vida del individuo esta causado por cambios en el patrón de la expresión de genoma que son gobernados por mecanismos epigenéticos.

- 1º. Desmetilación del núcleo paterno, antes de la primera división celular.
- 2º. Desmetilación del ADN materno, junto con la división celular.
- 3º. Metilación de novo del ADN, en la masa interna celular (MIC).
- 4º. División celular, formación de embrión. Cuando se realiza la mitosis por las células diferenciadas, los patrones de metilación se conservan.

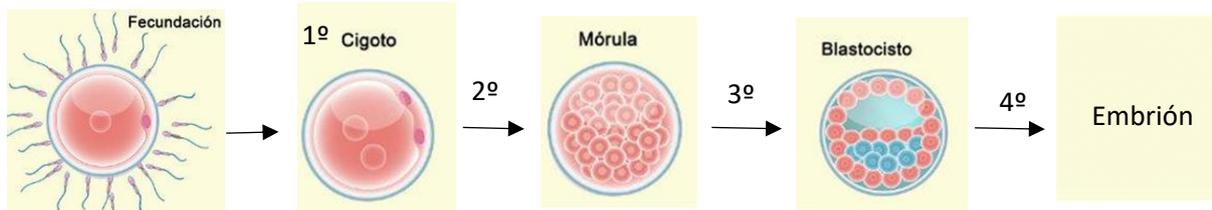


Figura 11. Desarrollo embrionario

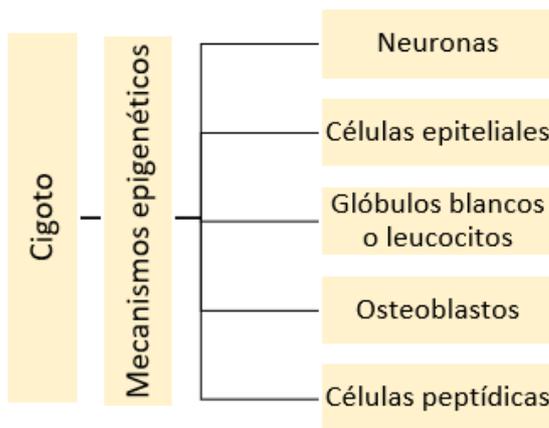


Figura 12. Diferentes tipos celulares gracias a los mecanismos epigenéticos.

2.1.5.2. Dónde se produce desarrollo epigenético.

Las epivariaciones se van a dar en regiones reguladoras de la expresión de los genes. Estas regiones son las regiones del promotor, que pueden contener baja, media o alta concentración de islas CpG (**Figura 13**); y también en regiones reguladoras distales, que provocan una remodelación de la cromatina y hacen accesibles o inaccesibles regiones reguladoras.

Siempre será sobre regiones reguladoras del genoma.

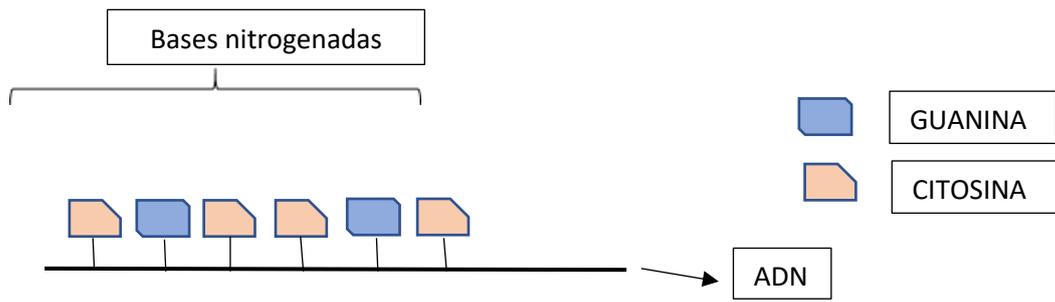


Figura 13. Isla CpG.

2.2. TECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Más de 8 millones de bebés han nacido mediante técnicas de reproducción asistida en el mundo, desde que nació la primera niña mediante fecundación *in vitro* (FIV), Louise Brown, en 1978, en el Oldham General Hospital (Reino Unido), según un estudio presentado en el congreso de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), en Barcelona. Anualmente, se llevan a cabo más de 2 millones de tratamientos de reproducción asistida. El miembro fundador de la ESHRE, fue el biólogo reproductivo Robert Edwards, padre científico de la FIV, al que le fue concedido el premio Nobel de Medicina en 2010.(18)

La tecnología de reproducción asistida ha experimentado muchos avances basándose en un mejor diagnóstico de las parejas que padecen disfunción reproductiva, en el proceso de simplificación del procedimiento de obtención de ovocitos, en un mejor control del cultivo y selección de embriones y aumento significativo de las tasas de embarazo. En resumen, una gran mejora de las técnicas, del diagnóstico y del seguimiento del proceso.

Al estudiar los cambios epigenéticos en el periodo neonatal, algunos trabajos sugieren que las técnicas de reproducción asistida aumentan el riesgo de patologías de origen epigenético en los embriones. Aunque el riesgo no es alto, parece mayor que en niños obtenidos mediante reproducción natural. Las patologías clínicas epigenéticas de niños obtenidos por estas técnicas, es de 3 a 6 veces más frecuente que en el resto de la población obtenida por gestación natural. La posible razón es que en los primeros días de gestación se producen modificaciones epigenéticas muy importantes. Los gametos ya tienen un mapa genético, en el momento en el que se unen los gametos se produce una desprogramación y una reprogramación del embrión (**Figura 11**). En las técnicas de reproducción asistida, esa fase se produce en un entorno artificial, por lo tanto, el entorno *in vitro*, aunque es lo más parecido posible, no es idéntico al del seno materno. Por lo tanto, es posible que las modificaciones epigenéticas que se realizan en ese momento no se hagan siempre correctamente.

2.2.1. Epigenética y TRA.

Los nuevos avances en las técnicas de reproducción asistida, como técnicas de inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), las técnicas FIV, la vitrificación de ovocitos y de embriones y un largo etcétera; han dado la oportunidad de tener descendencia a las parejas que presentaban alteraciones de la fertilidad.

Podemos evitar ciertas enfermedades genéticas mediante el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) que permite seleccionar antes de su implantación, a los embriones en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Todo este desarrollo ha traído problemas importantes, no solo médicos sino también éticos. A medida que aumenta exponencialmente el número de embarazos y recién nacidos por TRA se podría estar aumentando el riesgo de complicaciones en la descendencia obtenida mediante estas técnicas.

No se puede pasar por alto el aparente mayor riesgo de trastornos de la impronta genómica relacionados con la TRA. Sin embargo, el vínculo entre defectos de impronta y TRA es débil. Los procesos llevados a cabo en las TRA están probablemente implicados en estos riesgos y tienen que ser estudiados enfocándose procesos específicos de TRA, y dado que el proceso de gametogénesis es sincrónico con los eventos de impronta relevantes, debe estudiarse qué procesos pueden causar más fácilmente errores en la impronta con consecuencias en el desarrollo embrionario temprano. Aunque no se puede descartar la contribución de la manipulación *in vitro* de gametos y embriones, parece que las condiciones de superovulación y / o infertilidad en sí mismas pueden ser las principales razones del riesgo de trastornos de la impronta genómica observados al nacimiento de niños concebidos mediante TRA. (19)

En estos estudios se analizan las evaluaciones perinatales y los datos recogidos durante el embarazo de los niños nacidos mediante TRA. Los estudios suelen estar centrados en la recopilación de parámetros como el peso del recién nacido, edad gestacional en el momento del parto, presencia de deformidades, tasa de mortalidad, la incidencia de diabetes gestacional, la amenaza de aborto, y parto prematuro. Las consecuencias descritas asociadas a TRA son muy variadas e incluyen las siguientes:

- **Bajo peso al nacer:** según estudios llevados a cabo en Estados Unidos, el uso de TRA ha llevado a un número desproporcionado de bebés con bajo peso y muy bajo peso al nacer, en parte debido al aumento absoluto de embarazos múltiples, pero también se ha observado tasas más elevadas neonatos con bajo peso concebidos mediante TRA, sin proceder de embarazos múltiples (20).
Un estudio señala que el medio de cultivo utilizado en la fecundación *in vitro* (FIV) afecta al tamaño del feto a término (21).
- **Malformaciones:** En comparación con la concepción natural, los niños nacidos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) tienen un mayor riesgo de sufrir malformaciones congénitas importantes. Este riesgo se atribuye principalmente a los factores de riesgo del padre y la madre, y es más común en parejas que utilizan ICSI para la reproducción. Es probable que los hallazgos observados estén relacionados con la causa de la infertilidad. Sin embargo, no se pueden descartar los riesgos asociados a esta tecnología (22). Los bebés concebidos mediante ICSI o FIV tienen el doble de riesgo de sufrir enfermedades congénitas importantes que los que nacen de forma natural (23). Puede producirse un desarrollo anormal de algunos órganos, ya que las TRA pasan por alto muchos filtros biológicos, poniendo a los gametos y embriones bajo la presión ambiental (24).

- **Alteración en la impronta** de los genes: Los genes improntados juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y el desarrollo, y en algunos casos pueden afectar al comportamiento (25). Hay muchos genes improntados y otros muchos todavía no se han identificado. Las líneas de investigación de estos genes se centran en la identificación de patrones de herencia de enfermedades humanas (26).

Estudios han demostrado que las TRA pueden modificar la impronta de los genes, alterando el ciclo epigenético de los genes improntados, dando lugar a enfermedad de impronta, (27) tales como el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS)(28) (29) (30), el síndrome de Prader-Willi (PWS), el síndrome de Angelman (31), el síndrome de Russel-Silver (32), el retinoblastoma, diabetes neonatal, etc. Todas estas enfermedad de impronta presentan una incidencia inesperadamente alta en niños concebidos mediante TRA (33). Se han identificado nueve síndromes de impronta humana pero no todos ellos están asociados con las técnicas TRA, solo hay evidencia de vínculo entre las TRA y tres de los síndromes de impronta (34).

Las enfermedades relacionadas con las modificaciones epigenéticas de los niños nacidos por TRA se expone, en el apartado siguiente del trabajo.

- **Desarrollo de enfermedades postnatales:** la mayoría de los estudios que investigan los efectos de la TRA se han centrado en los resultados perinatales, los estudios más recientes demuestran que los niños concebidos con TRA pueden tener un mayor riesgo de trastornos postnatales.

Algunas enfermedades cardiovasculares pueden ser producidas a largo plazo por las TRA en niños (35). Otro estudio, sugiere que los niños con TRA pueden tener un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiometabólicas posteriores (36).

La evidencia epidemiológica actual sugiere que los niños concebidos mediante TRA presentan diferencias detectables en la presión arterial, la composición corporal y mayor riesgo de desarrollar diabetes (37).

Para el desarrollo de las TRA, los embriones tienen que permanecer en cultivos, las condiciones ambientales de los medios de cultivo afectan al desarrollo embrionario y en la misma dirección que los anteriores, otros estudio ha demostrado que los medios de cultivo afectan a la regulación epigenética del genoma embrionario, evidenciando que el cultivo de embriones produce un riesgo mayor de desarrollar enfermedades cardiovasculares (38), desarrollar una hipertensión arterial (39) y de padecer diabetes (40). Todas estas consecuencias por otro lado, interactúan entre ellas (41)(42).

- **Parto prematuro:** las TRA se asocian a una mayor tasa de partos prematuros (43).
- Amenaza de **aborto:** los trabajos indican que las pérdidas de embarazos tempranos fueron más altas en los niños concebidos mediante TRA, también la incidencia de aborto espontáneo es más alta (43).
- Los niños concebidos mediante TRA tienen un mayor riesgo de padecer **trastornos neurológicos**. El estudio evidenció que los ratones derivados de embriones cultivados mostraron alteraciones conductuales específicas en

ansiedad y deficiencias en recuerdos implícitos. Estos embriones en la etapa de blastocisto mostraron una menor expresión de ARNm de H19.

Por otro lado, diferentes autores han reportado un aumento del riesgo de parálisis cerebral (PC) en niños concebidos con TRA, que en parte se debe a los embarazos múltiples (44).

El posible riesgo de discapacidad intelectual (DI) en los niños concebidos por TRA representa otro problema abordado por varios estudios. Se han identificado más de 500 genes implicados en su etiología (45).

Un gen involucrado en la regulación de la homeostasis cerebral es el gen BDNF, que juega un papel fundamental en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad del sistema nervioso central. Varios estudios reportaron una desregulación de la expresión de BDNF por alteraciones de la metilación del ADN, también mediada por modificaciones de histonas y alteraciones en la metilación del ARN no codificante en diferentes enfermedades neurológicas, como en la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (46).

2.2.2. Fertilidad y TRA.

El impacto de las TRA en la salud de los niños sigue sin estar claro. La infertilidad de la población que utiliza estas técnicas, es por sí misma un factor de riesgo (47).

Algunos estudios han observado alteraciones significativas de metilación en el esperma de hombres con diferentes grados de infertilidad y en ovocitos de mujeres sometidas a estimulación ovárica.(48) La metilación de SNRPN en la descendencia (polipéptido N de ribonucleoproteína nuclear pequeña), gen que se sabe que está asociado a los síndromes de Prader-Willi y de Angelman, se relacionó con el tratamiento de fertilidad en los padres. Este efecto fue específico para los niños concebidos mediante ICSI, por lo que el tratamiento de fertilidad de los padres también afecta a la epigenética de la descendencia, teniendo consecuencias a largo y corto plazo (49). Los niños con síndrome de Prader-Willi o síndrome de Angelman tienen más probabilidades de nacer de padres con problemas de fertilidad, aunque no se encontraron asociaciones significativas entre las incidencias de los síndromes de Angelman y Prader-Willi y los tratamientos de FIV o ICSI.(50) Hubo un aumento en los trastornos de la impronta en niños concebidos mediante FIV e ICSI, pero evidencia insuficiente para una asociación entre ART y metilación en otros genes impresos. Se necesitan estudios con un control mayor en los métodos de medición y las regiones estudiadas para asociar el efecto de las TRA sobre la metilación del ADN y la impronta de los genes (44) (48).

Las nuevas técnicas de reproducción asistida han mejorado durante los últimos años, incluida la vitrificación, sistemas de cultivo dinámicos, maduración in vitro de ovocitos, eclosión asistida por láser e inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Dado que los procedimientos de TRA realizan múltiples manipulaciones del gameto y del embrión durante las ventanas críticas de la reprogramación epigenética, se ha puesto de manifiesto una asociación entre TRA y modificaciones epigenéticas aberrantes, que se evidencian principalmente en modelos animales. Los factores de riesgo atribuidos a las técnicas de reproducción asistida son:

- Edad avanzada: El análisis de embriones en etapa de blastocisto reveló que el mantenimiento de la metilación impresa no se vio afectado por el aumento de la edad materna (51).
- Riesgo de la estimulación ovárica: la incidencia en trastornos de impronta aumenta cuando se utilizan técnicas como la estimulación ovárica (52)(53).
- Embarazos múltiples: en un estudio de la ESHRE sobre las TRA se observó que la distribución de partos únicos, gemelares y trillizos para FIV e ICSI combinados fue 76,7, 22,0 y 1,1%, respectivamente (54). Lo que supone un aumento de los embarazos múltiples en comparación con los embarazos espontáneos, produciendo resultados perinatales adversos asociados con los embarazos múltiples (53).
- Cultivo de ovocitos: la incidencia en trastornos de impronta aumenta cuando se utilizan técnicas como los cultivos in vitro (52). Se ha demostrado que el cultivo in vitro de embriones preimplantacionales es un factor de riesgo de fetos a término anormales, incluidos los pesos altos y bajos al nacer (55).
Dado que hay medios de cultivo con propiedades muy diferentes, otra rama de estudio es comprobar cuál es el medio de cultivo idóneo para el desarrollo embrionario y la regulación epigenética (56). Hay que tener en cuenta factores como la temperatura, la osmolaridad, el pH y la densidad durante el cultivo que pueden incrementar el estrés del embrión y tener importantes consecuencias epigenéticas.
- Transferencia de embriones criopreservados (FET, "Frozen Embryo Transfer"): técnica que, según estudios, puede estar relacionada con modificaciones epigenéticas de la descendencia obtenida (57). Las manipulaciones embrionarias realizadas durante la congelación y descongelación pueden causar cambios en el desarrollo del feto a través de las modificaciones epigenéticas (58).

2.2.3. Enfermedades relacionadas con la epigenética de los niños TRA.

El ser humano es un organismo diploide, en los organismos diploides la mayoría de los genes presentan dos alelos funcionales. Pero en algunos genes (1% de los genes) se halla silenciado uno de los dos alelos, bien el de origen materno o paterno, este es el fenómeno de la impronta. En mamíferos placentarios se han encontrado hasta 83 genes de impronta, se cree que hay muchos más. Los genes improntados en el genoma de los mamíferos son aquellos genes para los cuales uno de los alelos parentales está reprimido (silenciado), mientras que el otro se transcribe (activo). El silenciamiento ocurre mediante fenómenos epigenéticos antes citados en el apartado anterior. La

modificación epigenética más importante implicada en la impronta es la metilación en dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferencial (DMR, “differentially methylated región”), las cuales son específicas para cada alelo parental. El otro mecanismo importante de regulación de la expresión genética de impronta es la modificación de histonas. El estudio de las funciones de la metilación del ADN permite conocer la existencia de patrones heredables del estado de metilación en el genoma de los mamíferos. Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables por mitosis, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación de novo particularmente activa en estos estadios. Los elementos de control de impronta se regulan por metilación durante la gametogénesis. Después de la fecundación, los genomas maternos y paternos sufren una desmetilación, y posteriormente se vuelven a metilar, en la fase de blastocisto durante la implantación (**Figura 11**). Sin embargo, hay algunos alelos que no sufren esta desmetilación y posterior remetilación, permaneciendo metilados, es decir improntados y por lo tanto, no se van a expresar (59). Posteriormente en el feto se producirá una reprogramación epigenética que va a provocar un “reset” de las células germinales. Algunas enfermedades, llamadas de impronta, están causadas por la pérdida de este patrón de metilación. La inhibición de los genes improntados ocurre porque la metilación del ADN origina un mayor compactado, formando heterocromatina, impidiendo el acceso de la maquinaria de transcripción.

Se debe hablar del término impronta, un mecanismo epigenético que está relacionado con algunas enfermedades. Las regiones improntadas son funcionalmente haploides, es decir que solo un alelo es funcional (**Figura 14**). Deleciones, duplicaciones, mutaciones o alteraciones de impronta del único alelo activo lleva a un desequilibrio de la dosis del producto génico y puede llevar a alteraciones en el fenotipo. Pese a esto, todos los mamíferos placentarios estudiados presentan fenómenos de impronta.

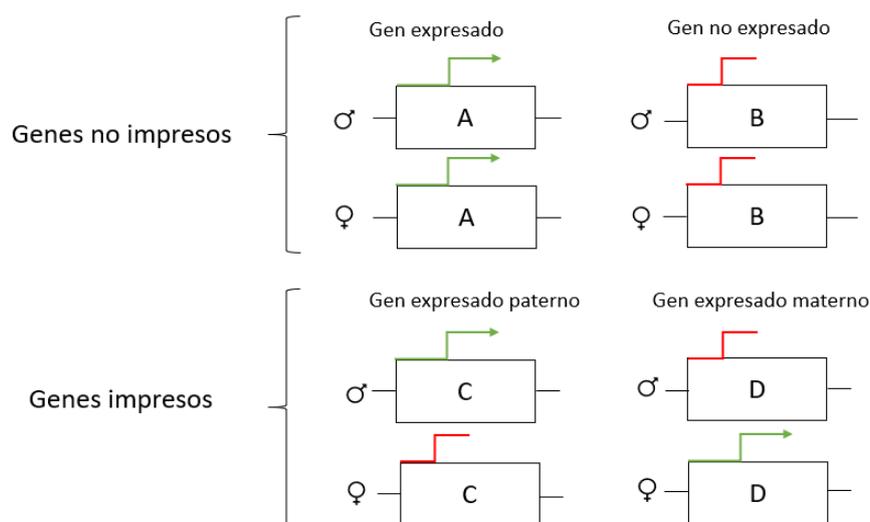


Figura 14. Los genes no improntados se expresan a partir de ambos alelos (gen A) o de ninguno de ellos (gen B). los genes improntados tienen una expresión mono alélica, por lo que solo permiten la expresión de un alelo, el paterno en el caso del gen C y el materno en el caso del gen D.

Un cambio epigenético, altera el fenotipo sin cambiar el genotipo. Los genes de impronta actúan como nodos de susceptibilidad para algunas enfermedades como el asma, cáncer, diabetes, obesidad, trastornos del comportamiento neuropsicológico complejo y del desarrollo pre y postnatal, y muchas más. La lista de enfermedades asociadas a la impronta es demasiado larga teniendo en cuenta el número limitado de genes de impronta identificados hasta la fecha. Existen varios síndromes relacionados con la impronta genómica en humanos, solo en 3 de ellos se han podido demostrar evidencias de la relación con las TRA. Estos son: Síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman y síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (27)(60)(61).

La incidencia absoluta de defectos de impronta es muy pequeña (<1/12.000 nacimientos), por lo que no se recomienda realizar un cribado rutinario de defectos de impronta en niños nacidos con tecnología de reproducción asistida. Se necesitan estudios de cohortes a gran escala de estos niños para determinar la asociación entre el TRA y este tipo de patología (62).

Algunas de las bases de datos que se pueden utilizar para clasificar las variaciones encontradas son:

- UCSC Genome Browser
- Ensembl Genome Browser
- Database of Genomic Variants
- Decipher
- NCBI
- ISCA
- Genoglyphix

La base de datos que vamos a utilizar en este trabajo para realizar un mapeo del genoma clínico, es DECIPHER (63).

- *Síndrome de Prader-Willi.*

Localización: Región PWS del cromosoma 15q11-q13. Generalmente resulta de una deleción de aproximadamente 4 Mpb del cromosoma humano 15q11-q13, con puntos de corte agrupados (BP) en cualquiera de los dos sitios proximales (BP1 para el tipo 1 y BP2 para el tipo 2) y un sitio distal (BP3).

Cariotipo:

Cromosoma 15

Variantes de número de



Leyenda

Variantes de número de ■ Loss

Síndrome de Prader-Willi (tipo 1) ✕

Largo	5515776 pb
Localización	15: 22677345-28193120
Genotipo	Heterocigoto
Clase	Supresión

Origen: la delección surge en el homólogo paterno, ya que la región se encuentra improntada en el cromosoma materno. De tal modo que si en el cromosoma 15 materno esta región está improntada y en el cromosoma 15 paterno se ha perdido la región PWS del cromosoma 15 pues no hay opción de que esta región sea funcional. Debido a la impronta, los genes heredados de la madre en la región crítica del PWS de 15q11.2 suelen estar inactivos y el desarrollo normal depende de los genes activos heredados por el padre. En el síndrome del PWS el gen crítico es SNURF-SNPRPN aunque no está claro si es un solo gen.

Fenotipo:

- Leve discapacidad intelectual
- Hipogonadismo
- Hipotonía muscular
- Obesidad
- Hiperfagia
- Dificultadas alimentarias en la infancia

Clínica de pacientes: La forma genética reconocida más común de obesidad infantil severa y que afecta a 1 / 10000 - 15000 individuos (16).

- *Síndrome de Angelman.*

Localización: Región AS del cromosoma 15q11-q13. El síndrome de Angelman generalmente resulta de una delección de aproximadamente 4 Mpb del cromosoma humano 15q11-q13, interrupción de la función del dominio impreso derivado de la madre en 15q11.13 (más específicamente UBE3A), con puntos de corte agrupados (BP) en cualquiera de los dos sitios proximales (BP1 para el tipo 1 y BP2 para el tipo 2) y un sitio distal (BP3) (63) (64) (65).

Cariotipo:

Cromosoma 15

Variantes de número de



Leyenda

Variantes de número de ■ Loss

Síndrome de Angelman (tipo 1) ✕

Largo	5515776 pb
Localización	15: 22677345-28193120
Genotipo	Heterocigoto
Clase	Supresión

Origen: las delecciones surgen en el homólogo materno ya que el cromosoma paterno se encuentra improntado, produciéndose pérdida de la expresión materna del gen UBE3A localizado en el cromosoma 15q11-13. (Las delecciones de la región crítica de PWS / AS que surgen en el homólogo paterno causan el síndrome de Prader-Willi.) La gran mayoría de las delecciones de la región crítica de PWS / AS surgen de novo.

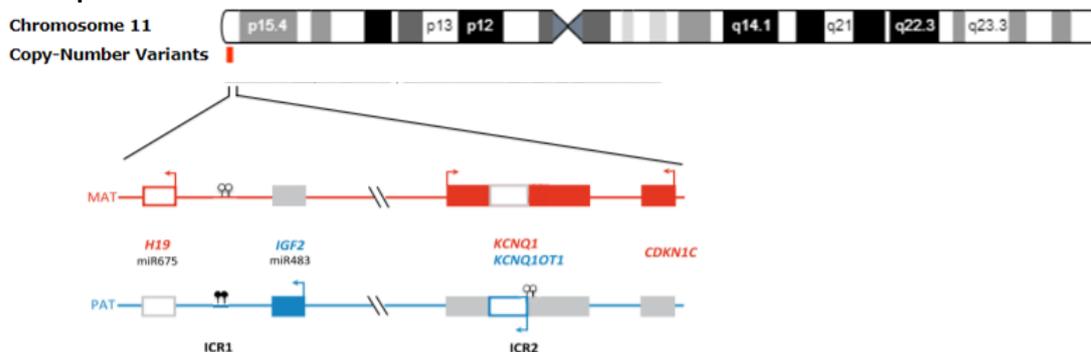
Fenotipo:

- Severa discapacidad intelectual
- Ataxia del tronco
- Convulsiones/ Epilepsia
- Microcefalia
- Hiperactividad

Clínica de pacientes: síndrome neurogenético poco común con una prevalencia estimada entre niños y adultos jóvenes de entre 1 en 10000 y 1 en 20000 (65).

- *Síndrome de Beckwith-Wiedemann.*

Localización: BWS es un trastorno multigénico resultante de alteraciones genéticas o epigenéticas dentro de dos dominios impresos de genes reguladores del crecimiento en el cromosoma 11p15.5. El dominio 1 incluye el centro de impronta DMR1, que regula dos genes del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2) y H19. Normalmente, hay expresión materna de H19 y expresión paterna de IGF2. El dominio 2 contiene el centro de impronta KvDMR1 (también llamado KvDMR o DMR2) y ciertos genes relevantes para la etiología de BWS, incluido KCNQ1OT1 (también conocido como LIT1), KCNQ1 y CDKN1C. La metilación materna de KvDMR1 normalmente silencia KCNQ1OT1 en el alelo materno para que el gen solo se exprese a partir del alelo paterno (29) (65).

Cariotipo:

En esta región del cromosoma 11p15 existen una serie de genes metilados diferencialmente.

Origen: El síndrome BWS se produce cuando se altera estos patrones de impronta en los cromosomas paterno y materno.

Por una parte, CDKN1C es un inhibidor del crecimiento, LIT1 es un inhibidor de CDKN1C. Si LIT1 se desmetila se produce el silenciamiento de CDKN1C y por lo tanto se pierde el control sobre el crecimiento. El 50% de los casos del síndrome de BWS son por pérdida de metilación de LIT1 materno.

Por otro lado, en el cromosoma materno, el gen IGF2 que es un importante inhibidor de crecimiento, está metilado, improntado. Si se pierde esta impronta, se produce una doble dosis de este factor de crecimiento, y por lo tanto se produce el síndrome. La

causa de este síndrome es la pérdida de metilación de LIT1 y la pérdida de la impronta materna de IGF2. Ocurre en el 20% de los casos en los que se da el síndrome (29)(65).

Fenotipo:

- Macroglosia (lengua más grande de lo normal)
- Macrosomía (tamaño excesivo del cuerpo)
- Hipoglucemia neonatal
- Defectos en la pared abdominal
- Hiperactividad
- Pliegues en lóbulos de las orejas

Clínica de pacientes: estimada incidencia de 1 en 13700 nacidos vivos (16).

- *Síndrome de Russel-Silver.*

Localización: duplicaciones, deleciones o translocaciones que involucran los centros de impronta en 11p15.5 o del cromosoma 7 (66).

Cariotipo:



Origen: La hipometilación de la región de control impresa 1 (ICR1) en 11p15.5 causa SRS en el 35% -50% de los individuos, y la disomía uniparental materna (mUPD7) causa SRS en el 7% -10% de los individuos.

Fenotipo:

- Retraso del crecimiento intrauterino
- Retraso del crecimiento postnatal
- Facies triangular característica
- Clinodactilia
- Malformaciones

Clínica de pacientes: es un trastorno poco común con una incidencia estimada de 1 de cada 100.000 nacidos vivos.

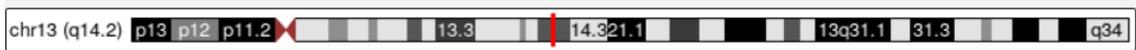
El modo de herencia es variable y también se describen casos esporádicos. La mayoría de los casos de SRS y fenotipo similar a SRS son esporádicos, pero se han reportado algunas familias con herencia autosómica dominante aparente, así como con herencia autosómica recesiva y ligada al cromosoma X. La disomía uniparental materna (mUPD) del cromosoma 7 representa el 10% de los casos de SRS y se han investigado muchos genes candidatos impresos en el 7. El cromosoma 11 ha pasado a primer plano como el cromosoma clave en la etiología, con informes de defectos de metilación en el dominio impreso H19 asociado con el fenotipo en el 35-65% de los pacientes con SRS. anomalías de metilación del cromosoma 11p15. Los estudios moleculares revelaron una hipometilación del H19 / IGF2 paterno que es la región de control de impresión.

Los errores genéticos producidos por: UPD materna (cromosoma 7; 5-10%), UPD paterna (cromosoma 11; <1%), defecto de metilación (cromosoma 11; 30–50%), duplicación (cromosoma 7 u 11; raro / desconocido) (16).

- *Retinoblastoma.*

Localización: en el gen RB1 en ambos alelos en el cromosoma 13; 13q14.2

Cariotipo:



Origen: la inactivación del gen supresor de tumores RB1 en ambos alelos en el cromosoma 13 generalmente por mutación o deleción. Las causas epigenéticas del retinoblastoma han demostrado que la hipermetilación del gen RB1 puede desempeñar un papel en el desarrollo de tumores reduciendo la actividad de RB1 especialmente en casos esporádicos

Fenotipo:

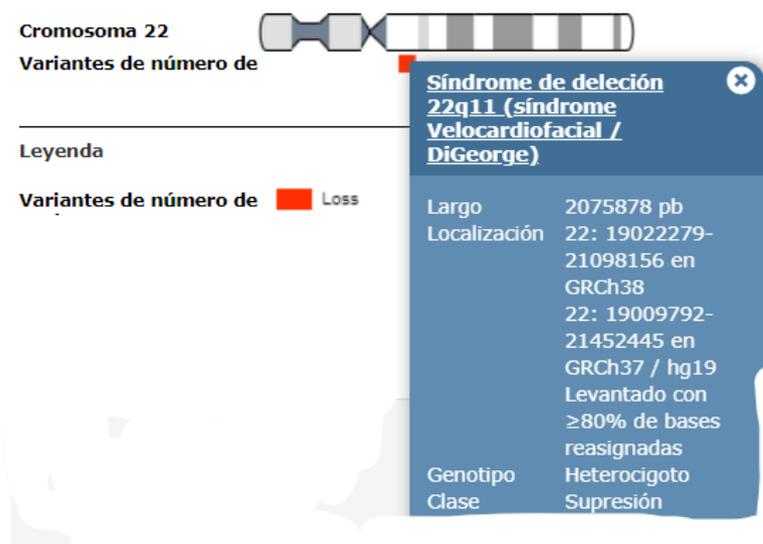
- Cáncer

Clínica de pacientes: El retinoblastoma es un tumor infantil poco común de la retina que se presenta tanto en un grupo familiar (40%) como en forma esporádica (60%) con una incidencia media de 1 por 17000 nacidos vivos.

- *Síndrome de DiGeorge.*

Localización: la mayoría de los pacientes con una deleción hemigélica de 22q11.2.

Cariotipo:



Origen: las microdeleciones de 22q11.2 generalmente abarcan 3 Mpb de ADN genómico y son detectables mediante análisis FISH (67). Hay varias repeticiones de bajo número de copias en el cromosoma 22 (LCR22). Los que flanquean la región de deleción 22q11 parecen facilitar la recombinación homóloga; sin embargo, es probable que la

desalineación entre los bloques de LCR22 facilite la eliminación. La mayoría de los pacientes con VCFS / DGS tienen una deleción de 3 Mpb, algunos tienen un punto de ruptura de deleción distal anidado que da como resultado una deleción de 1.5 Mpb y algunos pacientes raros tienen deleciones, translocaciones o mutaciones puntuales únicas de TBX1 (Yagi). En general, el 96% de los pacientes tienen una deleción definida de 1,5-3 Mb que incluye 24-30 genes.

La haploinsuficiencia de TBX1, un factor de transcripción o mutación del gen T (Yagi), parece ser un factor importante en el fenotipo.

Fenotipo:

- Defectos cardiacos
- Inmunodeficiencia
- hipocalcemia neonatal
- insuficiencia velofaríngea
- apariencia facial distintiva
- Retraso en el desarrollo del habla y del aprendizaje
- anomalías del comportamiento, esquizofrenia

Clínica de pacientes: en aproximadamente el 94%, la eliminación es 'de novo', y el 6% se hereda de un padre.

En resumen (**Tabla 1**), observamos de forma comparativa los diferentes síndromes asociados a un defecto de la impronta genómica, la localización y el gen que se ve afectado.

SÍNDROME	LOCALIZACIÓN	GEN
PWS	15q11-q13	SNURF-SNPRPN
AS	15q11-q13	UBE3A
BWS	11p15	IGF2, LIT1, CDKN1C
SRS	11p15.5 o 7	IGF2, LIT1, mUPD7
Retinoblastoma	13q14.2	RB1
S. DiGeorge	22q11.2	LCR22, TBX1, CRKL

Tabla 1. Comparativa de los síndromes producidos por variaciones en la impronta

En relación con lo explicado anteriormente, en general algunos de los trastornos del sistema nervioso humano (**Tabla 2**) se relacionan con alteraciones epigenéticas y TRA:

FUNCIÓN/ TRASTORNO	MECANISMOS IMPLICADOS
Aprendizaje y memoria	Modificaciones de histonas, metilación del ADN, miRNA
Neurogénesis adulta	Modificaciones de histonas, metilación del ADN
Respuesta al estrés	Modificaciones de histonas, metilación del ADN
Enfermedad de Alzheimer	Modificaciones de histonas, metilación del ADN
Esquizofrenia	Modificaciones de histonas, miRNA
Depresión	Metilación del ADN
Trastorno bipolar	Modificaciones de histonas, metilación del ADN, miRNA
Comportamiento de adicción y recompensa	Modificaciones de histonas, metilación del ADN, miRNA
Trastorno por estrés postraumático	Modificaciones de histonas, metilación del ADN
Envejecimiento cognitivo	Modificaciones de histonas, metilación del ADN

(68)

Tabla 2. Mecanismos epigenéticos implicados en ciertas funciones del sistema nervioso humano (68).

Actualmente hay muchas técnicas para el diagnóstico genético en general, pero ninguna de ellas nos permite detectar todas las alteraciones. Para cada caso habrá una técnica más adecuada.

En el apartado siguiente, se explicarán algunas de las técnicas utilizadas para la detección de modificaciones epigenéticas.

2.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS/ DIAGNÓSTICO GENÉTICO.

La secuenciación del ADN es una de las principales herramientas que se utilizan para el análisis genético.

La secuencia es el orden que presentan los nucleótidos en la cadena de ADN, y los métodos y técnicas que se utilizan para conocer este orden es lo que se llama secuenciación. La finalidad de secuenciar el ADN es conocer que nucleótidos y en qué orden están formando parte de la cadena de ADN. Al comparar estas secuencias con secuencias de referencia se pueden detectar posibles mutaciones o epivariaciones.

Existen distintos tipos de mutaciones: mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos, mutaciones dinámicas y variaciones en la impronta. Para poder detectar los distintos tipos de mutaciones se utilizan diferentes técnicas, que se aplican según la patología a estudiar.

Las mutaciones están asociadas a más del 80% de las enfermedades genéticas.

2.3.1. CGH array “Array Comparative Genomic Hybridization”:

Comparando la técnica CGH array y el cariotipo, ambos sirven para detectar grandes reordenamientos en el genoma (69). El cariotipo tiene una resolución bastante inferior, de 10-5 Mpb, permitiendo detectar trisomías (tres copias de un cromosoma) y monosomías (pérdida de un cromosoma). También permite detectar deleciones y duplicaciones mayores de 10-5 Mpb, translocaciones (cambio de material entre dos cromosomas) y marcadores en mosaico. El CGH array tiene mucha más resolución de 200-50Mb, y permite detectar reordenamientos más pequeños. Además, en el CGH array se necesita una cantidad muy pequeña de ADN del paciente (50 ng), lo cual es una ventaja frente al cariotipo, donde es necesario cultivar la muestra del paciente, lo que demora los resultados 15 días.

La técnica de CGH array implica la hibridación de forma competitiva del ADN del paciente con un ADN de referencia. El ADN de referencia debe de ser del mismo sexo que el del paciente y debe de estar bien clasificado, es decir, se deben conocer completamente las variaciones que presenta. Ambos ADNs se marcan con dos fluorocromos distintos, el ADN del paciente verde y el ADN de referencia rojo, y se hibridan sobre una plataforma de CGH array. (**Figura 15**). Una parte del genoma objetivo se imprime en estas plataformas.

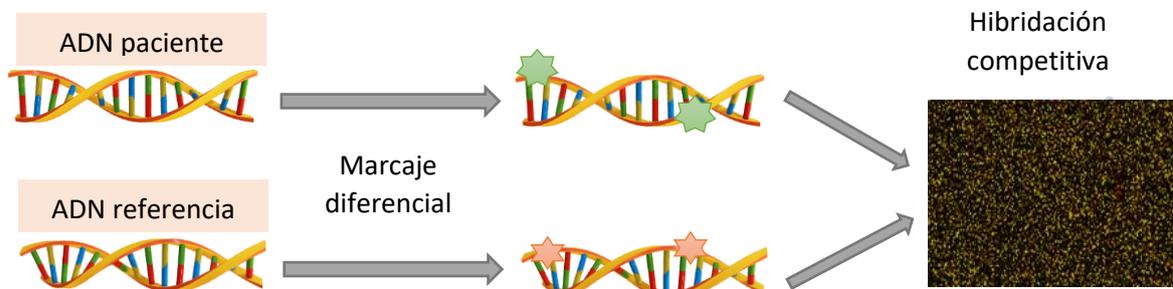


Figura 15. Hibridación competitiva en la técnica de CGH array.

En las plataformas de CGH array utilizadas para el diagnóstico, se definen dos tipos de regiones: Las primeras son las regiones diana, “target regions”, son las regiones que se han asociado a síndromes de microdelección o diferentes enfermedades, o un área que contiene genes importantes para el desarrollo. En estas áreas, los arrays están muy cubiertos y son muy representativos. Las segundas regiones, de menor interés, son los “backbone”, que son el resto del genoma. Aquí, la resolución de la matriz es ligeramente menor.

Se debe mantener un equilibrio al diseñar la matriz, porque cuanto mayor sea la cobertura del esqueleto, mayor será la posibilidad de detectar deleciones y duplicaciones de importancia clínica incierta. También debe tenerse en cuenta que

cuanto mayor sea el número de "áreas objetivo", mayor será el poder diagnóstico obtenido. Para los casos de postnatales, se utiliza una plataforma de matriz llamada CGX 180K, esta matriz presenta diferentes características y áreas muy representadas, como:

- Más de 980 regiones con significado funcional durante el desarrollo
- Más de 200 síndromes o regiones asociadas con el autismo
- Sondas pseudoautosómicas para detectar variaciones numéricas en los cromosomas sexuales
- 41 regiones subteloméricas únicas y 43 regiones pericentroméricas únicas
- Más de 250 síndromes de microdelección /microduplicación conocidos

La matriz CGX 180K presenta una resolución media de 20 Kpb en las regiones diana, es decir que las duplicaciones o deleciones de este tamaño o tamaños mayores, son detectadas.

El ADN del paciente y el control se hibridan competitivamente sobre la plataforma. Si el ADN del paciente es igual al del control en una región concreta, se va a hibridar la misma cantidad de ADN de los dos tipos. Esta región se verá amarilla ya que es la suma de ambos fluoróforos. Si el ADN del paciente en un punto del array presenta una deleción, hibridará más cantidad del ADN de referencia y por tanto se verá de color rojo. Si lo que tiene el paciente es una duplicación en un punto, hibridará más cantidad del ADN del paciente que de referencia, y el punto se verá de color verde. Finalmente, lo que obtenemos es una colección de puntos de diferentes colores, que se escanean con un escáner específico para detectar la intensidad de cada punto (**Figura 16**). Después un programa informático convierte estas diferentes intensidades en lecturas de deleciones o duplicaciones.

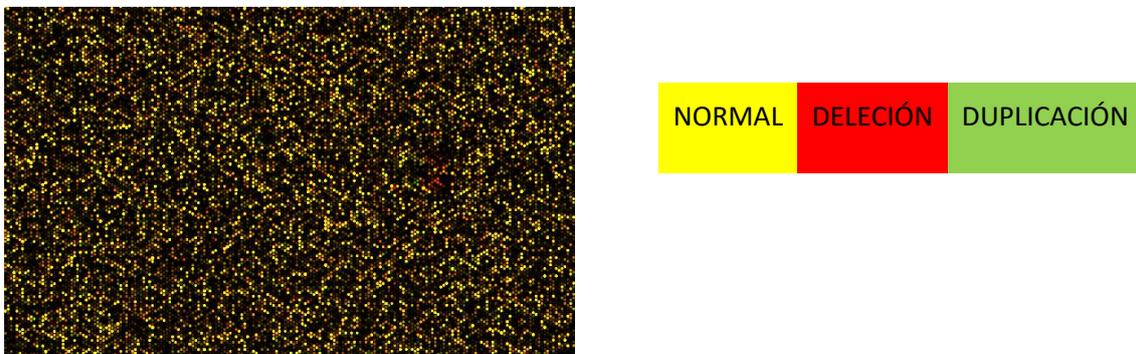


Figura 16. Diferencia de la intensidad de la señal. Visualización de resultados.

Existen diferentes programas para interpretar los resultados del array.

Chromosome Analysis Suite 4.2 (ChAS 4.2): El software Chromosome Analysis Suite utilizado para el análisis genético está especialmente diseñado para uso citogenético (**Figura 16**). ChAS le permite ver y resumir aberraciones cromosómicas en todo el genoma. Las aberraciones cromosómicas pueden incluir ganancia o pérdida de número de copia, mosaicismo o pérdida/ausencia de heterocigosidad (LOH/AOH). ChAS se compone de tres aplicaciones de software:

- Software de Análisis de Investigación de Salud Reproductiva (RHAS) para la configuración y personalización de análisis.
- Visor multimuestra (MSV) para número de copia y análisis de variantes de su conjunto de muestras.
- ChAS para el análisis en profundidad de muestras individuales.

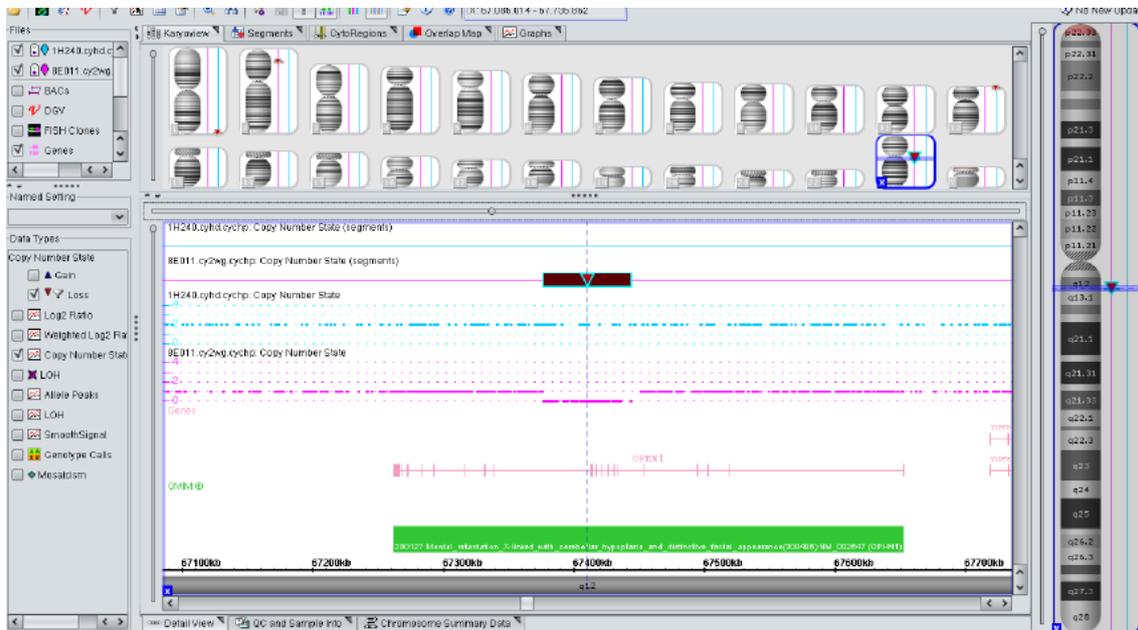


Figura 17. Ejemplo locus: 7q11.23 perteneciente a la región de la deleción que provoca síndrome de Williams

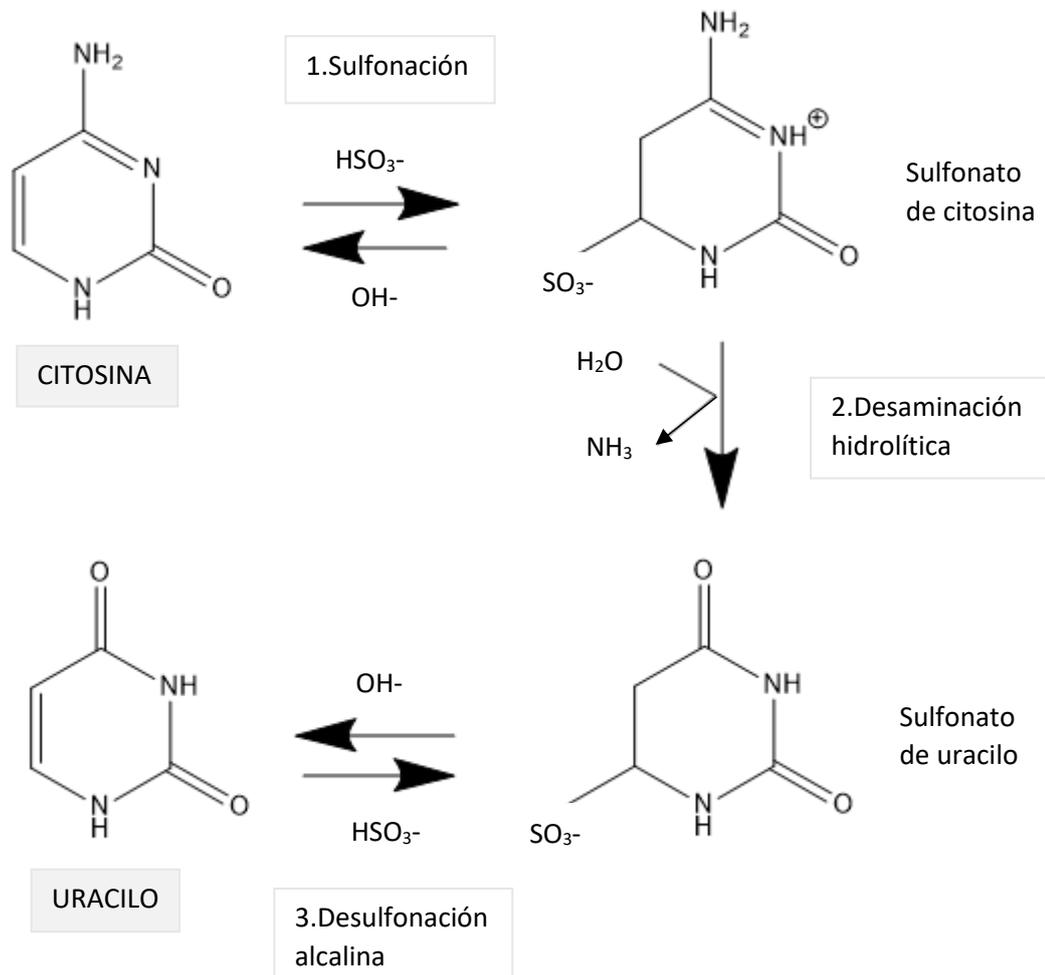
2.3.2. Tratamiento con bisulfito sódico:

El tratamiento con bisulfito es una técnica que consiste en provocar una reacción química de aminación (**Reacción 4**), en la que citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas metiladas no sufren ninguna modificación. Esta técnica se usa combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de manera que los uracilos se convierten en timinas (**Figura 18**).

Una de las técnicas más usadas es la llamada COBRA, análisis combinado de restricción bisulfito (COBRA “combined bisulphite restriction análisis”) (70). COBRA es una técnica cuantitativa, que permite determinar la cantidad de ADN metilado en un gen específico. El método COBRA consiste en un tratamiento previo de la muestra de ADN con bisulfito de sodio, convirtiendo así las citosinas no metiladas en uracilos, seguida de una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR se necesita el diseño de unos cebadores específicos para el ADN convertido. Los productos obtenidos en la reacción de la polimerasa son purificados, posteriormente

se añade una enzima de restricción que provoca el corte específico de la hebra de ADN cuando se encuentra con zonas del ADN no metiladas.



Reacción 4. Reacción de bisulfito de sodio sobre citosina

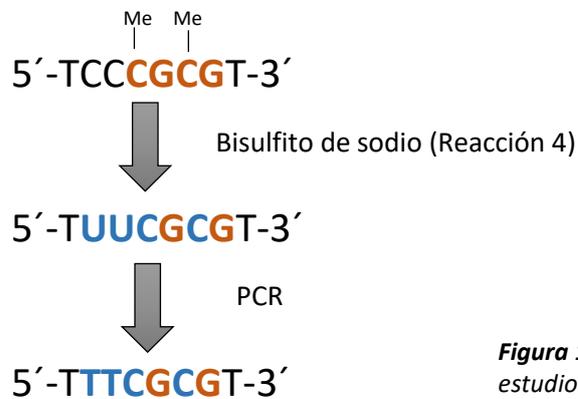


Figura 18. Tratamiento con bisulfito de sodio. Método de estudio del ADN

2.3.3. MSP “Methylation Sensitive PCR”:

Técnica descrita por Herman y colaboradores en el 1996 (71). El protocolo simplificado para el desarrollo de esta técnica es:

- 1) Modificación química con bisulfito. Las citosinas no metiladas pasan a uracilo.
- 2) PCR usando primers o cebadores específicos para ampliar bien alelos metilados o sin metilar.

Esta es una técnica basada en la utilización de enzimas de restricción sensibles a la metilación combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (72). La muestra de ADN se trata primero con una enzima sensible a la metilación y luego se amplifica mediante PCR. En el primer paso si la enzima se encuentra en la región donde no hay metilación de bases, la enzima cortará en la posición correcta y por tanto tras la PCR no se encuentra el producto de reacción. Sin embargo, cuando la secuencia de ADN está metilada, el grupo metilo unido a la cadena puede proteger a la hebra de ADN de la digestión por enzimas, evitando así la aparición de un corte, por lo que el producto de reacción puede verse en la PCR (**Figura 19**). En la PCR, el ADN se desnatura y la especificidad se obtiene agregando cebadores responsables de copiar regiones específicas del ADN diana (73).

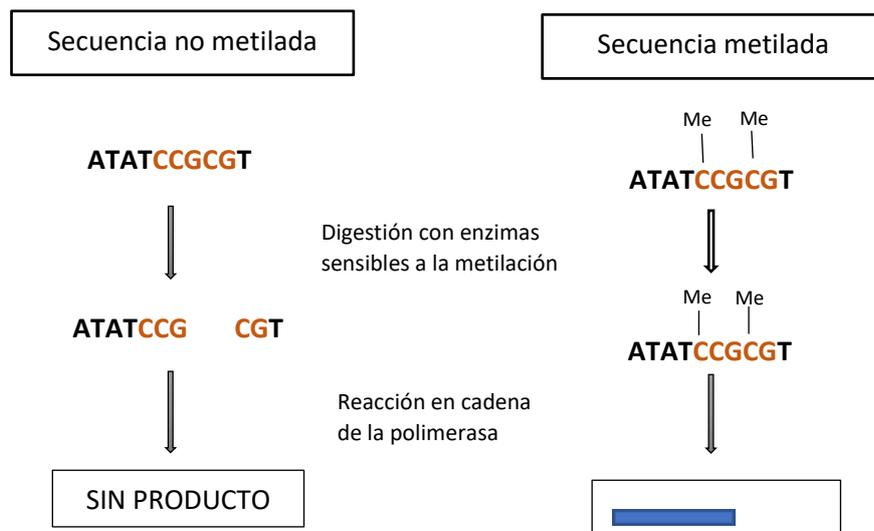


Figura 19. Comparación de secuencia no metilada y secuencia metilada de reacción en PCR.

Los pasos en el desarrollo de una PCR son: (**Figura 20**)

- 1º. Desnaturalización: consiste en romper las fuerzas de unión entre las dos hebras del ADN, obteniendo las dos hebras por separado. 1 minuto a 94°C.
- 2º. Hibridación de los primers o cebadores: los cebadores se unen complementariamente a las secuencias de ambas hebras de ADN. 45 segundos a 54°C.
- 3º. Extensión o amplificación: la ADN-polimerasa extiende la cadena de ADN adicionando nucleótidos al extremo 3' de los primers. 2 minutos a 72°C.

Este proceso se repite entre 25 y 40 veces, y en cada ciclo se obtienen dos copias de cada molécula de ADN que estamos amplificando. El tamaño del fragmento del ADN producido va a depender de los cebadores (74).

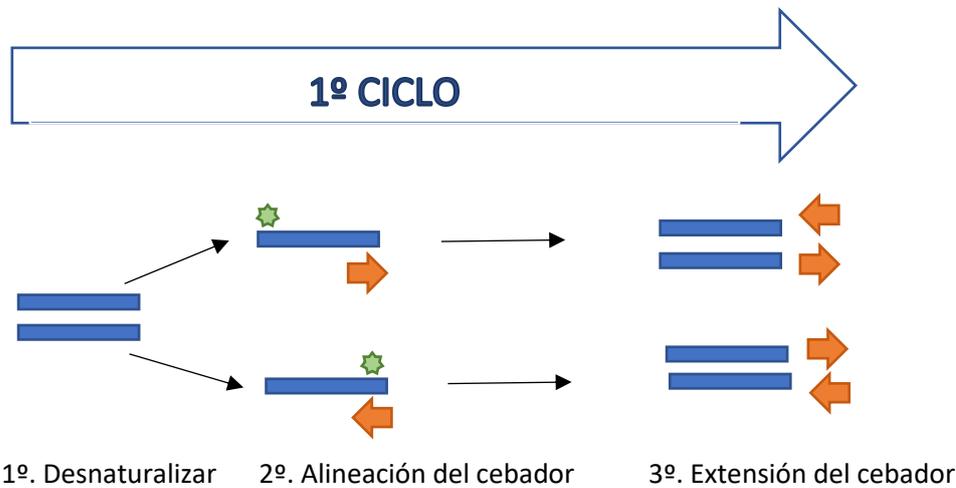


Figura 20. Reacción en cadena de la polimerasa.

La muestra de ADN, la ADN-polimerasa, la disolución tampón y los cebadores seleccionados se depositan en tubos de ensayo que se introducen en un termociclador de PCR. El termociclador se caracteriza por la graduación de cambios grandes de temperatura.

La ventaja del MSP es que es una técnica altamente sensible ya que se detecta un alelo metilado en una población de >1000 alelos no metilados. La desventaja es que no es una técnica cuantitativa, y en caso de metilación heteróloga, el valor puede no reflejar la realidad.

En resumen (**Tabla 3**), observamos de forma comparativa la resolución (pb) de las diferentes técnicas explicadas.

PARES DE BASES (pb)			Técnica	Técnica	Técnica
100Mpb	100000000	Cromosoma	ARRAY-CGH		CARIOTIPO
10Mpb	10000000				
1Mpb	1000000				
100Kpb	100000	Gen		PCR	
10Kpb	10000				
1Kpb	1000				
100pb	100	Exón			
10pb	10				
1pb	1				

Tabla 3. Comparativa de la resolución de las técnicas.

2.4. META-ANÁLISIS.

Actualmente existe un crecimiento de la información científica, lo que imposibilita que se tenga conocimiento de los artículos publicados en su totalidad. Un meta-análisis es un estudio que busca recopilar toda la información disponible sobre un tema en concreto, agruparla siguiendo criterios estipulados y evaluarla a través de herramientas de calidad.

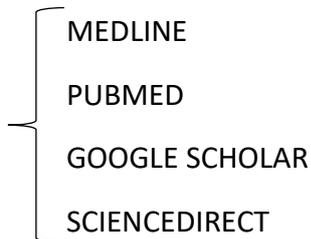
El objetivo principal es estimar el tamaño del efecto agregado después de combinar los resultados individuales de cada estudio seleccionado bajo un análisis estadístico suficientemente efectivo.

Realizamos un meta-análisis para sintetizar los datos de una serie de estudios.

2.4.1. Material y métodos.

2.4.1.1. Selección de bases:

Se eligieron 4 bases de datos, de fácil acceso y que nos proporcionan la información relevante que estamos buscando.



- MEDLINE
- PUBMED
- GOOGLE SCHOLAR
- SCIENCEDIRECT

2.4.1.2. Ecuación de búsqueda:

En el contexto de las bases de datos académicas, las ecuaciones de búsqueda consisten en una combinación de palabras clave y operadores para expresar una necesidad de la información que se quiere encontrar. Por diversas razones, el lenguaje natural no funciona bien en estas bases de datos. Por lo tanto, solo las ecuaciones bien formadas pueden proporcionar información relevante.

Una ayuda considerable es el uso de varios términos (incluidos sinónimos) y operadores booleanos relacionados para combinarlos y generar la primera versión de la ecuación de búsqueda.

Tras probar varias ecuaciones de búsqueda, la ecuación que seguimos para el desarrollo del trabajo es:

(Assisted reproduction, ART, epigenetic disease) and (epigenetic risk)

2.4.1.3. Registro en la base de datos:

Se añade la ecuación de búsqueda en las distintas bases de datos obteniendo los siguientes resultados (**Tabla 4**).

Bases de datos	Resultados a priori (n)	Año
MEDLINE	35	
PUBMED	51	1993-2021
GOOGLE SCHOLAR	7860	1996-2021
SCIENCEDIRECT	725	1996-2021

Tabla 4. Tabla resumen de las bases de datos, con los resultados a priori.

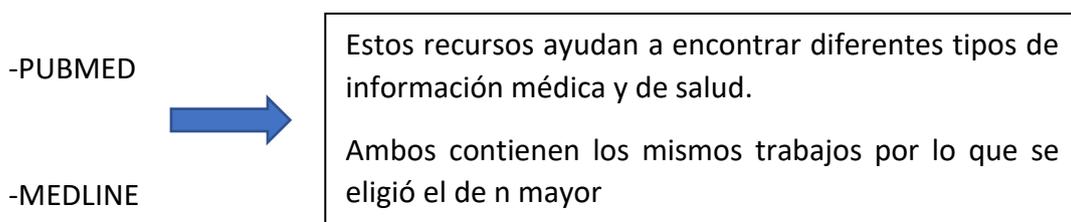
2.4.1.4. Almacenamiento en la base de datos:

La base de datos nos ayuda a solucionar muchos problemas para acceder a toda la información que necesita.

De esta manera se puede acceder de forma rápida a la información, podemos manipularla compararla de forma sencilla ya que está registrada en la misma base de datos, varios usuarios pueden acceder a la misma información. El programa de base de datos tiene opciones simples para borrar información, agregar datos o eliminar información duplicada.

La información está estructurada, todos los datos que ingrese tendrán la misma estructura, por lo que no tendrá ninguna dificultad a la hora de encontrar la información.

(Anexo I)



-GOOGLE SCHOLAR: dado el abultado número de resultados (n:7860) se procedió a acotar la búsqueda para obtener resultados más precisos. Se introdujo el motor de búsqueda exclusivamente mediante el título:

(Assisted reproduction, ART, epigenetic disease) and (epigenetic risk)

De esta manera se obtuvieron n:76, consiguiendo una búsqueda más precisa.

-SCIENCEDIRECT: dado el abultado número de resultados (n:725), se procedió a acotar la búsqueda para obtener resultados más precisos, el motor de búsqueda se acotó exclusivamente a "research articles" y se modificó le ecuación de búsqueda [(Assisted reproduction, ART, epigenetic disease) and (epigenetic risk) and (imprinting)]. De esta se obtuvieron n:74.

2.4.1.5. Análisis de datos:

Se realizaron las búsquedas, con los criterios antes descritos y todos los datos se recogieron en una tabla de datos (**Anexo I**).

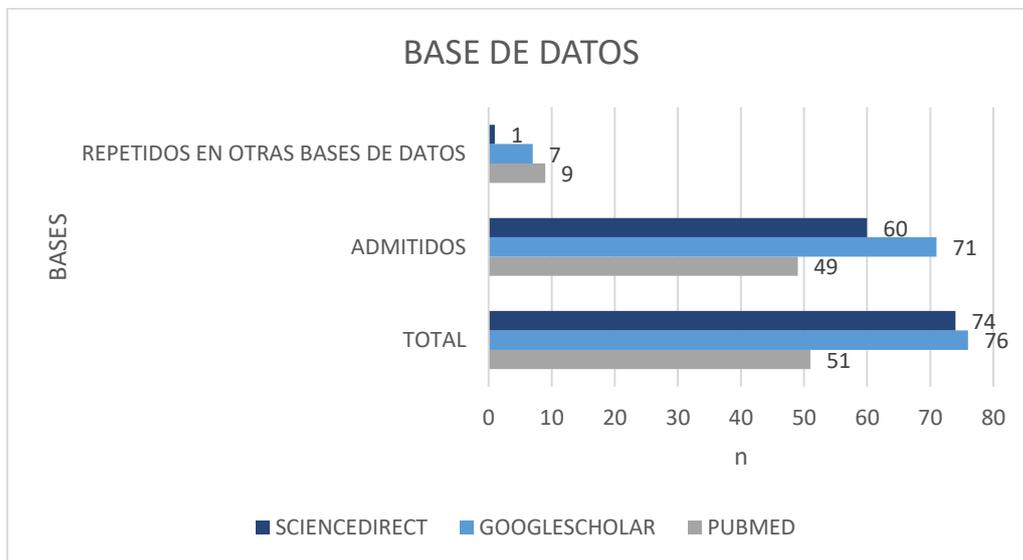
Se recogieron un total de 201 resultados, entre las tres bases de datos. Entre todos los resultados se admitieron 180 y se desearon 21 ya que no cumplían los criterios requeridos. Los criterios fueron que el título y/o resumen de los trabajos seleccionados estuviera relacionado con las TAR y con alteraciones en la epigenética.

Por otra parte, se observó que 17 de los trabajos encontrados se repetían en las bases de datos (**Tabla 5 y Gráfica1**).

Bases de datos	Total (n)	Admitidos (n)	Repetidos en otras bases de datos (n)
PUBMED	51	49	9
GOOGLE SCHOLAR	76	71	7
SCIENCEDIRECT	74	60	1
TOTAL (n)	201	180	17

Tabla 5. Análisis de datos para meta-análisis

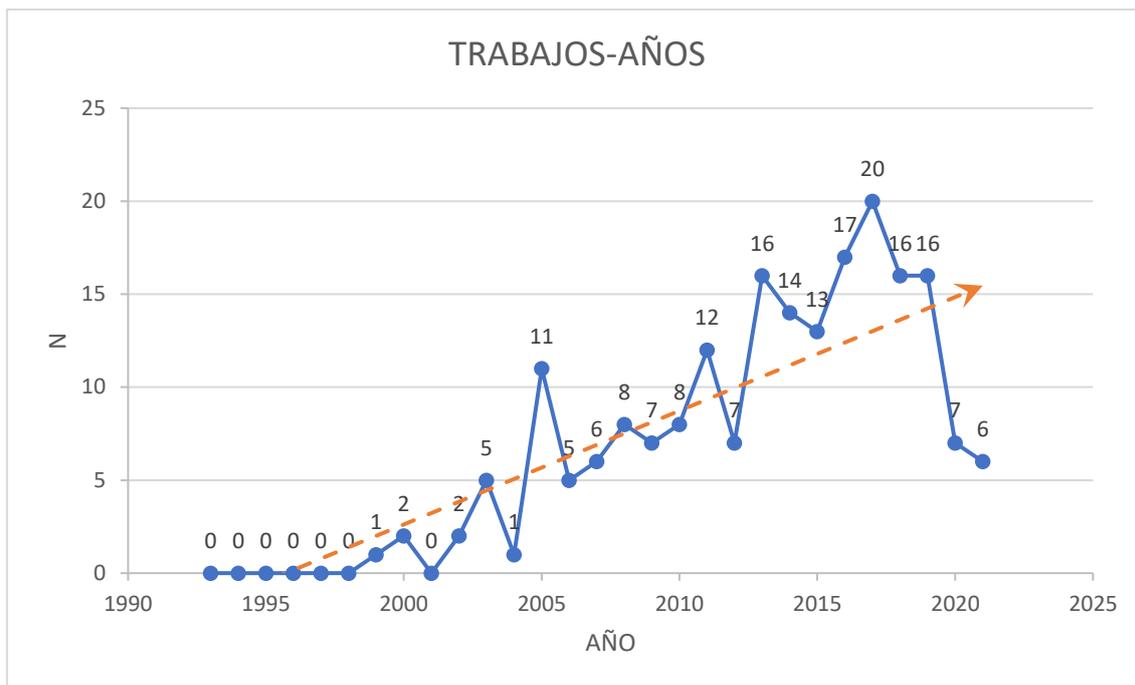
Se realizó una comparativa entre el total de los trabajos obtenidos en las bases de datos, los admitidos y los trabajos repetidos en cada base de datos (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Gráfica comparativa entre las bases de datos.

Los estudios que se repetían entre las bases de datos, se eliminaron para evitar errores. De esta manera, se trabajó con un total de 163 trabajos.

Los trabajos de la base de datos están publicados entre el año 1993 y 2021 (**Gráfica 2**). Se observa un aumento en el número de estudios en los últimos años.



Gráfica 2. Gráfica comparativa entre número de trabajos (n) y el año de publicación. En azul la línea de tendencia.

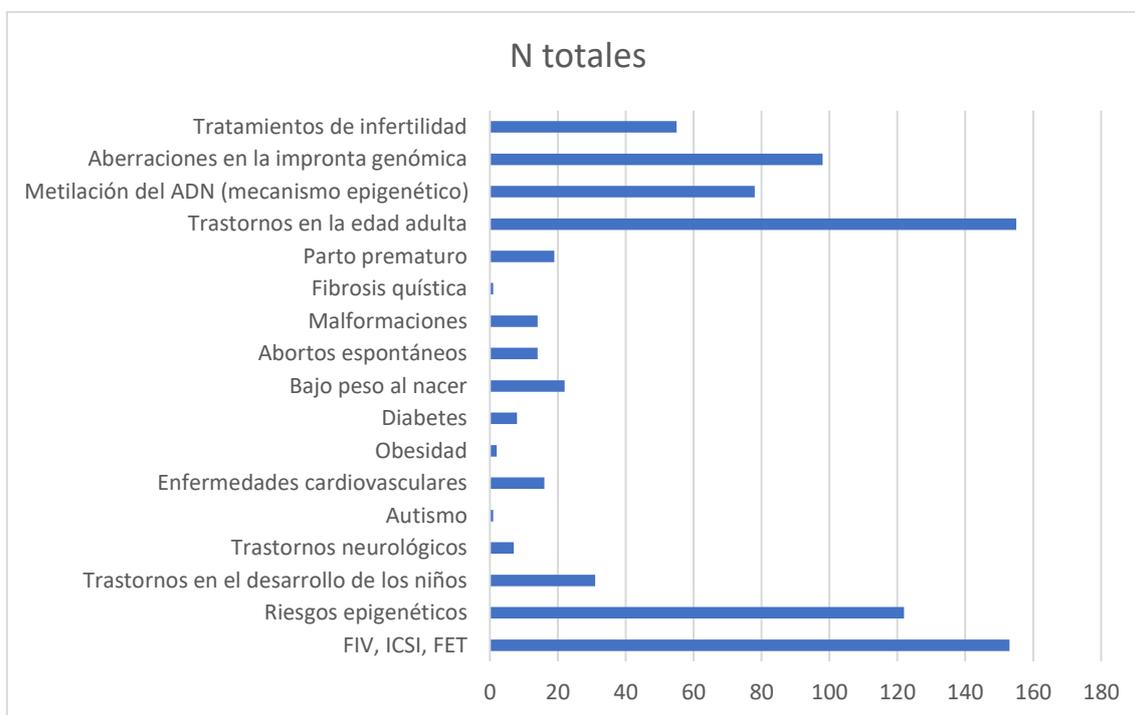
El contenido de cada trabajo se analizó de forma precisa y se ordenaron los trabajos en nuestra base de datos. Para poder comparar la información de forma homogénea.

A continuación, se procedió a la extracción de información de cada uno de los trabajos de estudio analizando por separado diferentes variables relevantes para nuestro estudio (Tabla 6).

VARIABLES	N totales
FIV, ICSI, FET	153
Riesgos epigenéticos	122
Trastornos en el desarrollo de los niños	31
Trastornos neurológicos	7
Autismo	1
Enfermedades cardiovasculares	16
Obesidad	2
Diabetes	8
Bajo peso al nacer	22
Abortos espontáneos	14
Malformaciones	14
Fibrosis quística	1
Parto prematuro	19
Trastornos en la edad adulta	155
Metilación del ADN (mecanismo epigenético)	78
Aberraciones en la impronta genómica	98
Tratamientos de infertilidad	55

Tabla 6. Análisis de datos. Variables y el número de trabajos correspondientes en total, sin relación entre ellos. (n= número de trabajos)

El número de trabajos relacionados con cada variable es muy diferente (**Tabla 6, Gráfica 3**). Para sacar conclusiones y obtener una homogeneidad de resultados se procedió a comparar las variables entre ellas de forma ordenada como se describe a continuación.



Gráfica 3. Gráfica de columnas agrupadas para comparar el número total de trabajos encontrados de las variables a tener en cuenta.

Se tuvo en cuenta las FIV, ICSI y FET porque son las técnicas más utilizadas en la reproducción asistida. Por el mismo motivo solo se tuvo en cuenta el mecanismo de metilación de ADN, ya que es el mecanismo epigenético más estudiado, comparándolo con el mecanismo epigenético de modificación de histonas (n=4) que no se tuvo en cuenta.

El procedimiento a seguir para relacionar ciertas enfermedades o trastornos con las TRA y con las modificaciones epigenéticas fue observar que número de trabajos totales nos da cada variable, cuanto mayor sea el número mayor será la relación. Para contar los trabajos que reúnen las condiciones que deseamos, se utiliza la función: =CONTAR.SI.CONJUNTO(rango;"sí";rango;"sí";rango;"sí"), luego solo se sumaron, con la función =SUMAR(rango).

2.4.2. Resultados y discusión.

Se comparó el número de trabajos que hablan de la tecnología de reproducción asistida (n=153) con el número de trabajos que lo relacionan con el bajo peso al nacer de los niños nacidos mediante TRA, los cuales se relacionan con el número de trabajos que se refieren al parto prematuro y un mayor número de abortos espontáneos comparado

con la reproducción natural (**Figura 21**). Se pudo observar que el bajo peso al nacer, que está relacionado con el parto prematuro y los abortos espontáneos, mantiene relación con el mayor número de embarazos múltiples que se producen debido a las TRA, como se manifestó en el apartado anterior.

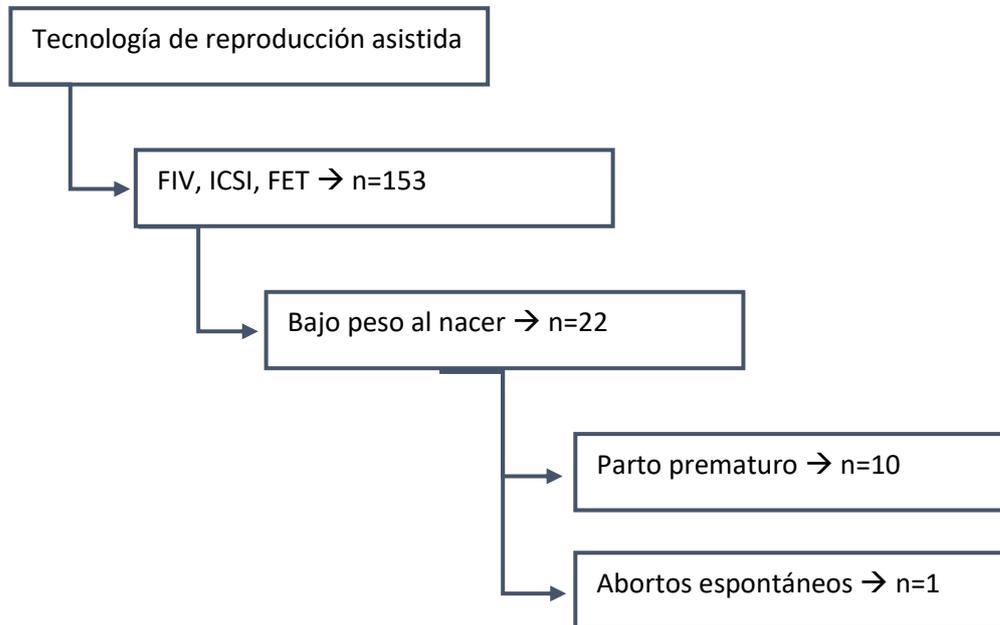


Figura 21. Relación entre las técnicas de reproducción asistida y el bajo peso al nacer de los niños nacidos mediante TRA, a su vez, relacionado con el parto prematuro y abortos espontáneos. (n=número de trabajos)

A continuación, se observó el número de trabajos que relacionan las TRA con los trastornos en la edad adulta. Sin entrar en qué trastornos son, se puede concluir que efectivamente hay una conexión entre las TRA y trastornos que se presentan en la infancia o en la edad adulta en los nacidos mediante estas técnicas (**Figura 22**). Teniendo en cuenta el tipo de trastorno que pueden ocasionar, se observa que el número de trabajos referidos a trastornos neurológicos no es muy elevado comparándolo con el número de trabajos que especifican que se producen trastornos en el desarrollo de los niños nacidos mediante TRA. Aunque el número de trabajos sea menor, sí que se puede esperar una relación, ya que se encontraron trabajos (n=6) que hablaban de parálisis cerebral, discapacidad intelectual y de autismo (n=1) asociados con las TRA.

Se tuvieron en cuenta los trastornos en la edad adulta para no reducir el estudio exclusivamente a trastornos congénitos o en edad pediátrica, aunque, hay que puntualizar, que los estudios a lo largo de la vida de un individuo nacido mediante TRA son muy escasos.

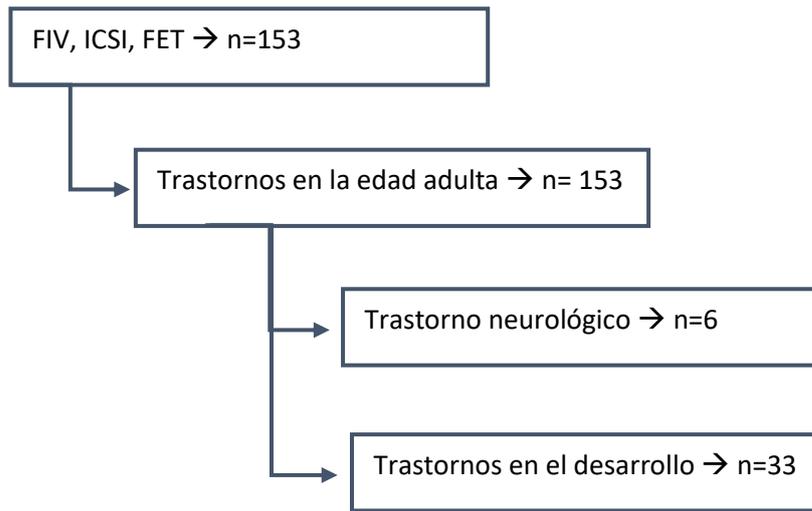


Figura 22. Relación entre las TRA y los trastornos en la edad adulta.

Por otra parte, se procedió a comparar el número de trabajos en los que se encuentra una relación entre las TRA y las modificaciones epigenéticas. Se tuvo en cuenta que estas modificaciones podrían producir trastornos en los niños nacidos mediante TRA y se observó que la mayoría de los trabajos que atendían a las modificaciones epigenéticas de los niños TRA encontraban relación con los trastornos de los niños (**Figura 23**).

También se buscó conexión entre los trastornos y las alteraciones de la impronta, y si guardaba alguna relación con las malformaciones de los niños nacidos mediante TRA. De todos los trabajos del estudio que atienden a las malformaciones (n=14), la mayoría (n=9) están relacionados con alteraciones en la impronta.

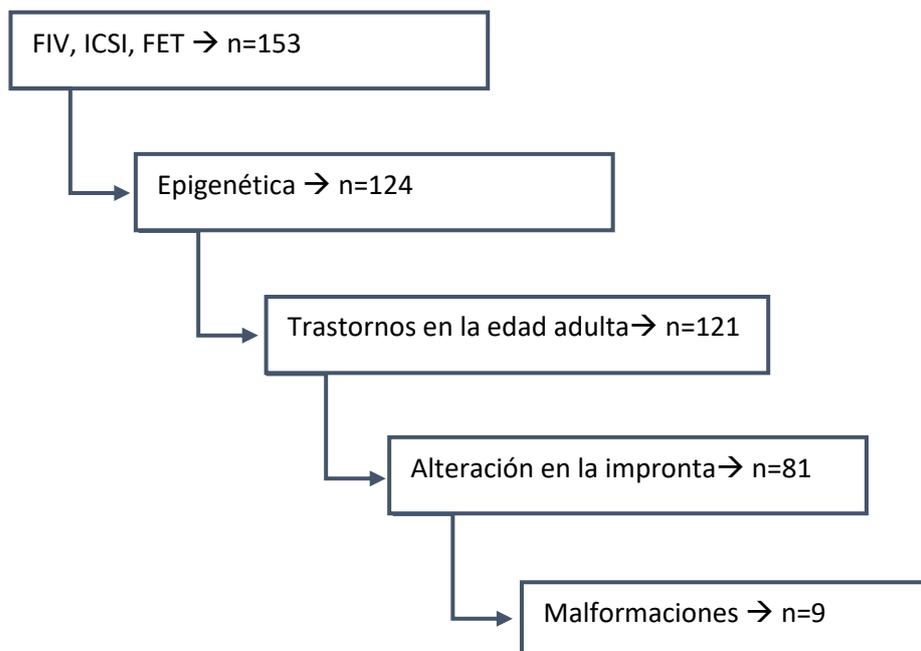


Figura 23. Relación entre las TRA, las modificaciones epigenéticas, los trastornos, la impronta y las malformaciones

Siguiendo la línea de estudio de la Grafica 5, pero buscando relación con el tratamiento de infertilidad seguido por los padres, se encontró una relación entre los tratamientos de infertilidad que siguen los padres con los trastornos encontrados en los niños que nacen mediante TRA (**Figura 24**).

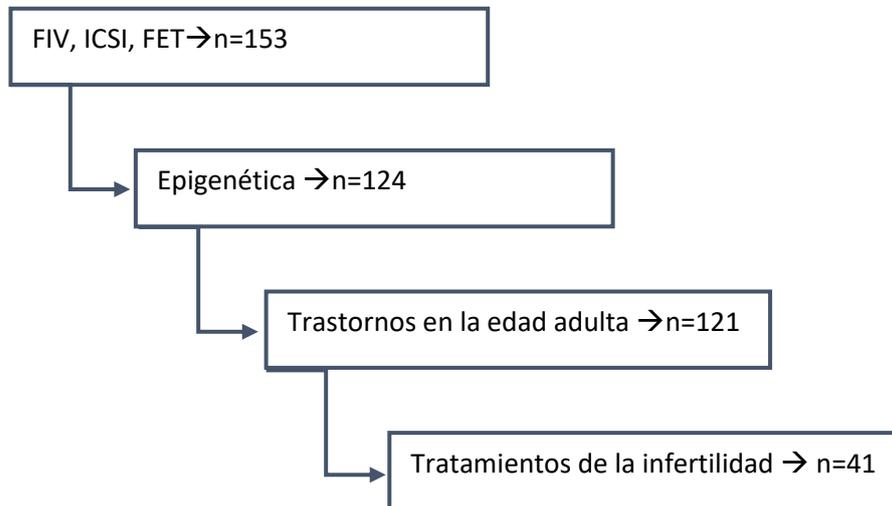


Figura 24. Relación entre las TRA, las modificaciones epigenéticas, los trastornos y tratamientos de infertilidad.

Se observó que la modificación epigenética más estudiada en todos los trabajos es la metilación del ADN. El resto de los trabajos en los que, sí se hablaba de modificaciones epigenéticas, pero no explícitamente de la metilación del ADN, se referían a modificación de histonas (n=4), o solo a modificaciones epigenéticas sin especificar (el resto). Se comparó la metilación del ADN con la alteración de la impronta (**Figura 25**).

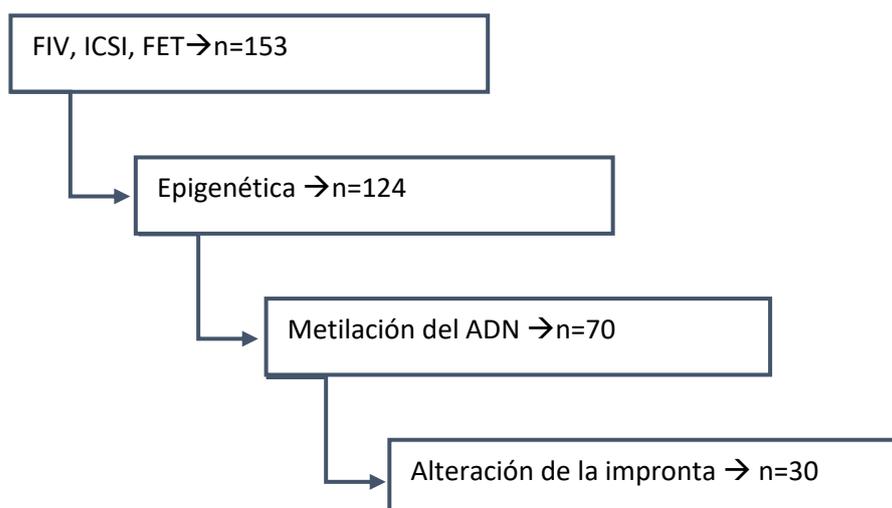


Figura 25. Relación entre las TRA y la metilación del ADN, mecanismo epigenético.

En algunos de los trabajos del estudio se especifica qué enfermedades desarrollan los niños nacidos mediante TRA en la edad adulta. Se compararon los trastornos por separado con las modificaciones epigenéticas y se observó que sí que guardaban relación con algunas enfermedades de la edad adulta como son la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (**Figura 26**).

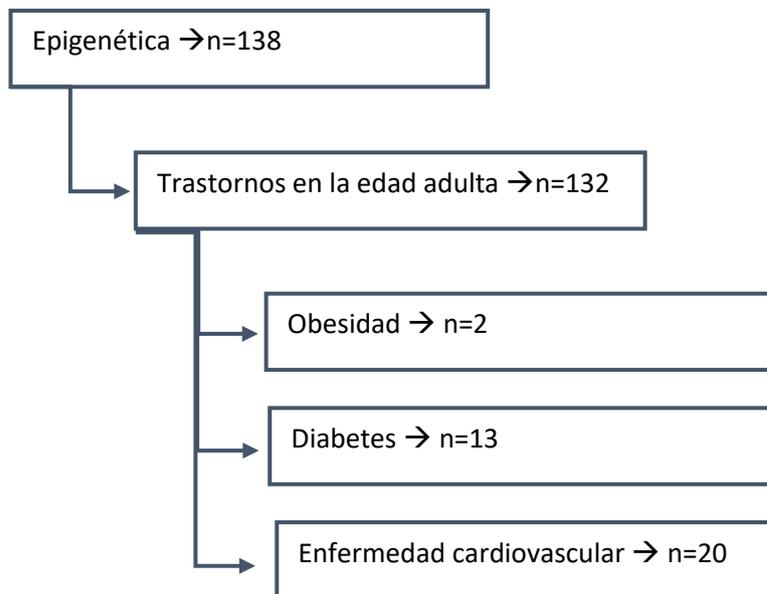


Figura 26. Relación entre los trastornos epigenéticos y que tipo de enfermedades presentan en la edad adulta.

Los mecanismos epigenéticos, que regulan la expresión de los genes sin modificar la secuencia de ADN también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades.

Aunque el resultado a largo plazo de los niños concebidos mediante TRA es generalmente tranquilizador, todavía existen algunas preocupaciones. Específicamente, estudios recientes han demostrado que puede haber un vínculo entre las TRA y las condiciones clínicas de origen genético o epigenético, incluido los llamados defectos de impronta genómica. Este es el resultado de varios estudios diferentes que han observado un exceso de casos de enfermedades clínicas raras (PWS, AS, BWS, SRS) en los niños concebidos mediante TRA. Hasta la fecha, el número de estos pacientes descritos en los estudios es pequeño, pero muestra que claramente se necesitan estudios a gran escala para dilucidar el vínculo entre los defectos de la impronta genómica y la concepción asistida, y para establecer la base biológica exacta del vínculo. En vista del fuerte interés público en este campo médico, todos los profesionales que trabajan en la medicina reproductiva y campos relacionados tienen la responsabilidad de comprender estos datos emergentes y poder discutirlos de manera informada y responsable. Advirtiendo de las limitaciones que presentan los estudios actuales.

Todos los autores citados señalan que existe un mayor riesgo de ciertas modificaciones epigenéticas, relacionadas con la tecnología de reproducción asistida. El principal

problema con estos estudios es que, debido a la baja incidencia de estas enfermedades, es difícil determinar una asociación lo suficientemente fuerte como para llegar a una relación de que estos niños tienen un mayor riesgo de desarrollar tales síndromes. La evidencia parece indicar que el desarrollo folicular múltiple y/o la infertilidad paterna pueden ser los culpables. El desarrollo de embriones y ovocitos en el medio de cultivo, la administración de hormonas o la manipulación mecánica de ovocitos y embriones pueden provocar cambios en la expresión génica.

2.4.3. Limitaciones.

En la mayoría de los estudios se requiere un análisis más detallado, por lo que los trabajos son limitados:

- Falta de estudios longitudinales de tamaño suficiente y poblaciones específicas para la realización de estudios comparativos entre niños nacidos con TRA y niños en gestación natural.
- Poco conocimiento sobre la expresión y principales datos epigenéticos de ovocitos y embriones (19) (28) (75).
- Pobre seguimiento de los casos de estudio para observar las consecuencias a largo plazo de los pacientes.

Las limitaciones para un seguimiento de los estudios están en la rareza de los casos clínicos y en el insuficiente tamaño de los estudios. Por otra parte, la variabilidad en los protocolos de las técnicas TRA hace complicado, también, un análisis riguroso de los problemas asociados.

2.4.4. Conclusiones.

Se han recogido en la base de datos todos los artículos que han encajado en nuestro motor de búsqueda (total n=201). De esos trabajos solo se han tenido en cuenta para el meta-análisis n=163, los artículos restantes no se han incluido ya que a la hora de hacer un cribado no cumplían los requisitos de admisión, se descartaron mediante título y resumen. Los artículos que se han repetido entre las bases de datos utilizadas han sido 17, que también se eliminaron para no duplicarlos.

Se han comparado las variables de estudio. Se observan evidencias de una relación entre las técnicas de reproducción asistida, sobre todo las técnicas FIV, ICSI Y FET, y algún trastorno epigenético. Basándonos en la cantidad de estudios recogidos podemos sacar la conclusión de que el mecanismo epigenético más estudiado ha sido la metilación del ADN. Los trastornos que hemos podido asociar con las TRA son partos múltiples, bajo peso al nacer de los bebés, partos prematuros, diabetes, trastornos neurológicos y desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la edad adulta.

También podemos deducir que no hay muchos estudios que relacionen el tratamiento de infertilidad de los progenitores con un aumento de epivariaciones de los niños nacidos mediante TRA. Aunque sí que se observó conexión, por lo que se debería desarrollar más esa línea de estudio.

Observando los estudios que se centran en la impronta para relacionarlo con las epivariaciones y las enfermedades de imprinting, se observó que no hay muchos estudios porque no hay muchos casos de niños que padezcan estas enfermedades (Síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman, Síndrome de Beckwith-Widemann, síndrome de Russel-Silver). En la mayoría de los estudios se habla de aberraciones en la impronta genómica pero solo en n=6 trabajos se especifica la enfermedad de la impronta.

Como conclusión del estudio de meta-análisis podemos deducir que sí que hay una relación entre las TAR y los trastornos epigenéticos de los niños como se planteaba en el apartado anterior.

3. CONCLUSIONES

- Mayor riesgo de registrar ciertas modificaciones epigénéticas relacionadas con la tecnología de reproducción asistida.
- Baja incidencia de estas enfermedades, por lo que es difícil determinar una asociación fuerte con las TRA.
- La evidencia parece indicar que el desarrollo folicular múltiple y/o la infertilidad paterna pueden ser la causa de las enfermedades relacionadas con las TAR.
- El desarrollo de embriones y ovocitos en el medio de cultivo, y la manipulación mecánica de ovocitos y embriones pueden provocar cambios en la expresión génica.
- Los niños nacidos mediante TRA presentan un riesgo mayor de desarrollar ciertas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares y diabetes.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Esteller M. Introducción a la epigenética. SEBBM. 2014;179:4–6.
2. Holliday R. Epigenetics comes of age in the twentyfirst century. *J Genet*. 2002 Apr;81(1):1–4.
3. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005 Jun;308(5727):1466–9.
4. Mardones L, Villagrán M, Lanuza F, Leiva AM, Troncoso C, Martínez-Sanguinetti MA, et al. [The transcendence of prenatal feeding: From the Dutch hunger to the Chilean reality]. Vol. 90, *Revista chilena de pediatría*. Chile; 2019. p. 456–7.
5. Yokoyama H. Mercury Pollution in Minamatanull [Internet]. Springer Nature PP - Cham; 2018. Available from: <https://library.oapen.org/bitstream/id/9b9692e2-1ea5-48f2-a25b-2980d1e7d3ab/1002235.pdf>
6. Vaz M, Hwang SY, Kagiampakis I, Phallen J, Patil A, O'Hagan HM, et al. Chronic Cigarette Smoke-Induced Epigenomic Changes Precede Sensitization of Bronchial Epithelial Cells to Single-Step Transformation by KRAS Mutations. *Cancer Cell*. 2017 Sep;32(3):360-376.e6.
7. Szuhai K, Tanke HJ. COBRA: combined binary ratio labeling of nucleic-acid probes for multi-color fluorescence in situ hybridization karyotyping. *Nat Protoc*. 2006;1(1):264–75.
8. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger : principios de bioquímica* . Séptima ed. Principios de bioquímica. Barcelona: Omega; 2019.
9. Villar MD. Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. In 2009.
10. Garg P, Jadhav B, Rodriguez OL, Patel N, Martin-Trujillo A, Jain M, et al. A Survey of Rare Epigenetic Variation in 23,116 Human Genomes Identifies Disease-Relevant Epivariations and CGG Expansions. *Am J Hum Genet*. 2020 Oct;107(4):654–69.
11. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct;9(16):2395–402.
12. Carmen Avendaño J. Carlos Menéndez. *Medicinal Chemistry of anticancer drugs* (2 ed.). 2015. 325–356 p.
13. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*. 2008;659(1–2):40–8.
14. Eirín-López JM, Ausió J. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *BioEssays* [Internet]. 2009;31(10):1062–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.200900050>
15. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, updated. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan;29(1):303–4.
16. Pinborg A, Loft A, Romundstad LB, Wennerholm U-B, Söderström-Anttila V, Bergh C, et al. Epigenetics and assisted reproductive technologies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016 Jan;95(1):10–5.
17. Hitchins MP, Ward RL. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological

- mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 2009 Dec;46(12):793–802.
18. de San Simón. Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina. UM. Revista científica ciencia médica. [Internet]. Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón; Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332010000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 19. Laprise SL. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev.* 2009 Nov;76(11):1006–18.
 20. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med.* 2002 Mar;346(10):731–7.
 21. Kleijkers SHM, Mantikou E, Slappendel E, Consten D, van Echten-Arends J, Wetzels AM, et al. Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Hum Reprod.* 2016 Oct;31(10):2219–30.
 22. Katalinic A, Rösch C, Ludwig M. Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2004 Jun;81(6):1604–16.
 23. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2002 Mar;346(10):725–30.
 24. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update.* 2005;11(5):473–82.
 25. Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol.* 2002 Sep;192(3):245–58.
 26. Morison IM, Reeve AE. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1599–609.
 27. Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Jun;75(2):81–97.
 28. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet (London, England).* 2003 Jun;361(9373):1975–7.
 29. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet.* 2003 Jan;72(1):156–60.
 30. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, J Amor D. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. Vol. 75, *American journal of human genetics.* 2004. p. 526–8.
 31. Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu B-L, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet.* 2002 Jul;71(1):162–4.
 32. Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol*

- Hum Reprod. 2008 Feb;14(2):67–74.
33. Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2003 Feb;14(1):101–10.
 34. Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod.* 2008 Dec;23(12):2826–34.
 35. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JPW, van Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA. Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008 Nov;90(5):1662–73.
 36. Roseboom TJ. Developmental plasticity and its relevance to assisted human reproduction. *Hum Reprod.* 2018 Apr;33(4):546–52.
 37. Vrooman LA, Bartolomei MS. Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse. *Reprod Toxicol.* 2017 Mar;68:72–84.
 38. Rexhaj E, Paoloni-Giacobino A, Rimoldi SF, Fuster DG, Anderegg M, Somm E, et al. Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *J Clin Invest.* 2013 Dec;123(12):5052–60.
 39. Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, Kwong WY, et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar;104(13):5449–54.
 40. Chen M, Wu L, Zhao J, Wu F, Davies MJ, Wittert GA, et al. Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF. *Diabetes.* 2014 Oct;63(10):3189–98.
 41. Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ.* 2001 Apr;322(7292):949–53.
 42. Bhargava SK, Sachdev HS, Fall CHD, Osmond C, Lakshmy R, Barker DJP, et al. Relation of serial changes in childhood body-mass index to impaired glucose tolerance in young adulthood. *N Engl J Med.* 2004 Feb;350(9):865–75.
 43. High incidence of preterm births and early losses in pregnancy after in vitro fertilisation. Australian in vitro fertilisation collaborative group. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985 Oct;291(6503):1160–3.
 44. Choufani S, Turinsky AL, Melamed N, Greenblatt E, Brudno M, Bérard A, et al. Impact of assisted reproduction, infertility, sex and paternal factors on the placental DNA methylome. *Hum Mol Genet.* 2019 Feb;28(3):372–85.
 45. van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet.* 2011;45:81–104.
 46. La Rovere M, Franzago M, Stuppia L. Epigenetics and Neurological Disorders in ART. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug;20(17).
 47. Osman E, Franasiak J, Scott R. Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. *Semin Reprod Med.* 2018 May;36(3–04):e1–9.
 48. Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Hum Reprod Update.* 2014;20(6):840–52.
 49. Whitelaw N, Bhattacharya S, Hoad G, Horgan GW, Hamilton M, Haggarty P. Epigenetic

- status in the offspring of spontaneous and assisted conception. *Hum Reprod.* 2014 Jul;29(7):1452–8.
50. Vermeiden JPW, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril.* 2013 Mar;99(3):642–51.
 51. Kindsfather AJ, Czekalski MA, Pressimone CA, Erisman MP, Mann MRW. Perturbations in imprinted methylation from assisted reproductive technologies but not advanced maternal age in mouse preimplantation embryos. *Clin Epigenetics.* 2019 Nov;11(1):162.
 52. Grace KS, Sinclair KD. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. *Semin Reprod Med.* 2009 Sep;27(5):409–16.
 53. Kawwass JF, Badell ML. Maternal and Fetal Risk Associated With Assisted Reproductive Technology. *Obstet Gynecol.* 2018 Sep;132(3):763–72.
 54. Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1513–25.
 55. Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod.* 2010 Mar;25(3):605–12.
 56. Mani S, Mainigi M. Embryo Culture Conditions and the Epigenome. *Semin Reprod Med.* 2018 May;36(3–04):211–20.
 57. Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod.* 2014 Mar;29(3):618–27.
 58. Wennerholm U-B, Henningsen A-KA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod.* 2013 Sep;28(9):2545–53.
 59. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L. Epigenetics and the germline. *Reproduction.* 2005 Feb;129(2):137–49.
 60. Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. Vol. 27, *Nature genetics.* United States; 2001. p. 255–6.
 61. Shiota K, Yamada S. Assisted reproductive technologies and birth defects. *Congenit Anom (Kyoto).* 2005 Jun;45(2):39–43.
 62. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2009 Feb;91(2):305–15.
 63. Firth H V, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009 Apr;84(4):524–33.
 64. Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. Vol. 72, *American journal of human genetics.* 2003. p. 218–9.

65. Owen CM, Segars JHJ. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med*. 2009 Sep;27(5):417–28.
66. Cocchi G, Marsico C, Cosentino A, Spadoni C, Rocca A, De Crescenzo A, et al. Silver-Russell syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a twin girl born after in vitro fertilization. *Am J Med Genet A*. 2013 Oct;161A(10):2652–5.
67. Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ, editors. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2017.
68. Sananbenesi F, Fischer A. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. *Biol Chem*. 2009 Nov;390(11):1145–53.
69. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May;86(5):749–64.
70. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun;25(12):2532–4.
71. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Sep 3;93(18):9821–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8790415>
72. Zuo T, Tycko B, Liu T-M, Lin J-JL, Huang TH-M. Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics*. 2009 Dec;1(2):331–45.
73. Sepulveda AR, Jones D, Ogino S, Samowitz W, Gulley ML, Edwards R, et al. CpG methylation analysis--current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2009 Jul;11(4):266–78.
74. Zuccotti M, Grant M, Monk M. Polymerase chain reaction for the detection of methylation of a specific CpG site in the G6pd gene of mouse embryos. *Methods Enzymol*. 1993;225:557–67.
75. Allen C, Reardon W. Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG*. 2005 Dec;112(12):1589–94.

Anexo I. Base de datos

Nº	Título	Autores	Publicación	Año	Tipo	PDF	Buscador	Repetición	Repetición				admitido	
									FIV, v	a	r	b		
1	Genetic and	Jiang Z,	Best Pract	2017	Artículo	si	Pubmed	ScienceDi	SI	SI	SI	SI	SI	SI
2	Assisted Reproduc	DeAngelis	Semin	2018	Artículo	si	Pubmed				SI	SI		SI
3	The health	Chen M,	J Dev Orig	2017	Artículo	si	Pubmed		SI	SI				SI
4	Assisted reproduct	van	Hum	2012	Artículo	si	Pubmed		SI	SI	SI			SI
5	Beckwith-Wiedema	Shuman	GeneRevi	2000	Artículo	si	Pubmed			SI	SI			SI
6	Impairme nt of	Impairme	Androlog	2017	Artículo	si	Pubmed				SI	SI	SI	SI
7	Moderate maternal	Rahimi S,	Hum	2019	Artículo	si	Pubmed				SI			NO
8	The effects of	Heber	Biol	2021	Artículo	si	Pubmed			SI				SI
9	Epigeneti c	Arnaud P,	Birth	2005	Artículo	si	Pubmed			SI	SI			SI
10	"In-utero stress and	Argyraki	Hum	2019	Artículo	si	Pubmed			SI				SI

19	Pergialioti S, Vasilios; Prodrimou, Anastasia ; Dimitrouli	2015	Allahveisi, Azra; Rezaei, Mohamm adjaffar; Rezaei,	2017	Fulton, Debra L; Lin Tan, Seang; Taketo, Teruko;	2009	Uchida, Hiroshi; Maruyama, Tetsuo; Kagami, Maki;	2011	de Waal, Eric; Yamazaki, Yukiko; Bartolomei,	2015	Jiang, Lu; Zheng, Ting; Huang, Jun; Zhou,	2013	Sadeghi, Mohamm	2018	Rahimi, Sophia; ,Effect of folic acid suppleme ntation	2016	Yu, Ning; Li, Bing; Pan, Yi; ,A cloud- assisted applicatio	2013	Sayeras Haag, Rosa Cristina; ,Do assisted	2013	Le, F; Pan, PP; Wang, N; Wang, LY; Hu, CX; Liu, SY;	2016	Fulton, Debra L; Tan, Seang Lin; Taketo, Teruko;
	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo	Artículo
	SI		SI			SI						SI		SI									
	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar	Google Scholar
	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

