

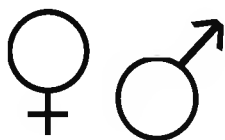
# IMPRONTA GENÓMICA: LA GENÉTICA DESCONOCIDA

Laureana Rebordinos González



SERVICIO DE  
PUBLICACIONES  
UNIVERSIDAD  
DE CÁDIZ

# IMPRONTA GENÓMICA: LA GENÉTICA DESCONOCIDA



Laureana Rebordinos González



**UCA**

Universidad  
de Cádiz

Servicio de Publicaciones  
2002

Rebordinos González, Laureana

La impronta genómica: La genética desconocida / Laureana  
Rebordinos González. -- Cádiz: Universidad. Servicio de  
Publicaciones, 2002. -- p.

ISBN 84-7786-779-8

1. Genética. 2. Cromosomas. I. Universidad de Cádiz. Servicio  
de Publicaciones, ed. II. Título

575.114

Laureana Rebordinos González  
Laboratorio de Genética CASEM-UCA  
Pol. Río San Pedro • 11510 Puerto Real • Cádiz  
Tel. 956 016 181 • Fax 956 016 180  
e-mail: laureana.rebordinos@uca.es

© Servicio de Publicaciones  
Laureana Rebordinos González

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz  
Depósito legal: CA-594/02  
I.S.B.N.: 84-7786-779-8

Diseño: Cadigrafía  
Maquetación y fotomecánica: Produce  
Imprime: Imprenta Repeto Cádiz

A todas las personas,  
compañeros y amigos que  
han contribuido a la creación  
y mejora del libro.



# Índice

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1.1. Definición</b> .....	11
<b>1.2. Desarrollo histórico</b> .....	12
<b>1.3. Eliminación de cromosomas en <i>Sciara</i></b> .....	12
<b>1.4. Inactivación del cromosoma X</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES</b> .....	17
<b>2.1. Técnicas de estudio</b> .....	19
2.1.1. Técnica del trasplante de núcleos .....	19
2.1.2. Técnica de los cromosomas fusionados .....	20
<b>2.2. Herencia de genes marcados</b> .....	21
<b>2.3. Tipos de genes marcados y efectos fenotípicos que producen</b> .....	22
<b>2.4. Impronta y cáncer</b> .....	24
<b>2.5. Características de la impronta genómica</b> .....	25
<b>2.6. Hipótesis de conflicto</b> .....	27
2.6.1. Regulación por competición de activadores .....	28
2.6.2. Regulación por metilación .....	29
<b>CAPÍTULO 3. PLANTAS ANGIOSPERMAS</b> .....	31
<b>CAPÍTULO 4. PECES</b> .....	37
<b>4.1. Expresión de isoenzimas</b> .....	39
<b>CAPÍTULO 5. METILACIÓN DE TRANSGENES Y CLONACIÓN</b> .....	41
<b>CAPÍTULO 6. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA IMPRONTA</b> .....	47
<b>BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE</b> .....	51
<b>FIGURAS</b> .....	57



# INTRODUCCIÓN







# Capítulo 1. Introducción

El nacimiento de la Genética como ciencia se debió a la publicación de los trabajos de Mendel y, fundamentalmente, al redescubrimiento de sus leyes a principios del siglo XX, cuando los científicos De Vries, Correns y Tschermak llegaron a las mismas conclusiones que Mendel en 1865. Durante este siglo de vida, el concepto de herencia como transmisión de genes de una generación a la siguiente, con igual efecto a partir de cada parental, se ha venido aplicando a multitud de genes en todos los grupos de seres vivos, hasta el punto de que la Genética ha emergido como uno de los temas centrales de la Biología actual. Distintos autores, sin embargo, consideran que Mendel seleccionó cuidadosamente un grupo de caracteres en guisantes que segregaban limpiamente, mientras hay muchos otros caracteres en guisantes y en muchas otras especies que no muestran herencia mendeliana. Uno de los cambios importantes de la Genética contemporánea es explicar los caracteres y condiciones que no siguen a Mendel, así como conocer el funcionamiento de mecanismos moleculares de expresión y regulación de genes, descubiertos en las últimas décadas, entre los que se incluyen la edición del ARN y la impronta genómica. Desde este punto de vista el concepto de impronta genómica ha adquirido importancia creciente, porque puede proporcionar una explicación para un conjunto de observaciones notablemente diversas en cuanto a transmisión genética y expresión que no se ajustan a las predicciones de genes estrictamente mendelianos.

## 1.1. DEFINICIÓN

El término *impronta* se usó en primer lugar en Biología por Lorenz, a finales de los años 30, para describir observaciones sobre el comportamiento animal. Por ejemplo, hay tiempos críticos, durante los primeros momentos de la vida, en los que se puede modificar el comportamiento por visiones o experiencias. Aplicando este sistema a gansos recién nacidos se consiguió que se comportaran como si un perro fuera su madre, si era éste el primer objeto móvil que veían después de nacer.

En la actualidad, el término *impronta* es la traducción del inglés “*imprinting*” y define un proceso mediante el cual se produce un marcado o modificación del material hereditario que consiste en una inactivación de la expresión del mismo. Los términos *impronta parental*, *impronta gamética*, *impronta genómica*,  *cromosómica* o  *genética* presentan diferencias de matices pero, todos ellos se refieren a un fenómeno que implica una expresión diferencial a nivel alélico o cromosómico dependiendo de su origen materno o paterno. Y esta dependencia parental en la expresión es lo que modifica el concepto mendeliano de la equivalencia en la expresión de los híbridos recíprocos.

No obstante, la idea de dependencia parental tampoco es nueva en Genética y la expresión monoparental de genes de mitocondrias, cloroplastos y ligados al cromosoma *Y* es un proceso ampliamente conocido. Ahora bien, lo que diferencia la dependencia parental en la



expresión de estos genes y la impronta es la forma en que se produce la transmisión de una generación a la siguiente y que produce diferencias en la presencia física de los genes en ambos casos. O sea, en la herencia citoplásmica los genes proceden de un único parental de manera que sólo hay un donante de los genes mientras que en la impronta están las dos copias físicamente presentes procedentes de cada uno de los parentales pero sólo se expresa uno de los alelos.

### 1.2. DESARROLLO HISTÓRICO

En Genética, históricamente la primera vez que se utilizó el término impronta fue en los años 60 para referirse a la eliminación o heterocromatinización selectiva de cromosomas de origen paterno en el insecto *Sciara*. Posteriormente, a mediados de los años 70 el término se usó para describir la inactivación selectiva de cromosomas *X*, derivados paternamente, en membranas extraembrionarias en ratón a mediados de los años 70. Lo que tienen en común estos dos procesos es el marcado o etiquetado diferencial de los cromosomas *X* paternos con respecto a los demás cromosomas y a los *X* maternos, siendo esta diferenciación específica lo que constituye la impronta.

### 1.3. ELIMINACIÓN DE CROMOSOMAS EN *SCIARA*

Los cócidos son un suborden de los homópteros que se caracterizan por presentar unos mecanismos de eliminación del genoma paterno que agrupan a varias especies. En el género *Sciara* la impronta produce eliminación cromosómica en unos embriones pero no en todos, resultando en dos clases de embriones que difieren en el número de copias efectivas de cromosomas particulares, y esta desigualdad es la base de la determinación del sexo. Los cigotos contienen dos juegos de autosomas (*Am*: de origen materno; *Ap*: de origen paterno) y 3 de cromosomas *X* (*X*). Dos de los *X* son paternos en origen (*Xp*) y uno materno (*Xm*) de manera que la constitución cromosómica es *AmApXmXpXp*. Durante la embriogénesis temprana un cromosoma *X* paterno se elimina a partir de la línea germinal de ambos sexos y de la línea somática de las hembras. En la línea somática de los machos ambos *X* de origen paterno son eliminados. Al final resulta que las líneas germinales masculinas y femeninas y la línea somática femenina son *XmXp*, sin embargo, la línea somática masculina es *XmO*. Así, mientras la línea germinal de ambos sexos es *AAXX* las constituciones cromosómicas del soma son diferentes: *AAXX* (hembra) y *AAXO* (macho) (**Figura 1**).

El proceso biológico mediante el que se consigue esta eliminación es a través de una meiosis atípica en machos. En la primera división meiótica los cromosomas paternos son eliminados y en la segunda las dos cromátidas hijas de los *X* maternos se mueven a un polo. El espermatozoide se forma a partir del único producto meiótico que contienen las cromátidas *X* precoces (ahora cromosomas). Todos los demás productos degeneran, por lo que los espermatozoides contienen dos cromosomas *X*.



La eliminación específica de cromosomas en la línea somática está basada en impronta controlada maternamente. Se ha demostrado que el sitio marcado en el  $X$  está cerca del centrómero y la pérdida de cromosomas se produce porque no hay migración de los cromosomas en el huso mitótico debido a una no disyunción de las cromátidas hermanas. Utilizando translocaciones obtenidas experimentalmente entre los cromosomas  $X$  y autosomas se ha visto que solamente los translocados con el centrómero son marcados y eliminados, pero esta región es distinta de la región en la que se mantienen unidas las cromátidas. En cuanto al control molecular, una enzima con actividad fosfatasa o topoisomerasa es la responsable de la separación en anafase y su actividad está regulada por la estructura de la cromatina de los cromosomas eliminados. Pero, además se requeriría un elemento regulador para la formación de esta estructura en la cromatina de los cromosomas  $X$ . Sería necesario aislar este elemento regulador, descubrir su naturaleza y sus dianas en los cromosomas para entender completamente el proceso.

En otros grupos de cócidos el juego de cromosomas paternos se convierte en heterocromático e inactivo genéticamente en embriones que se desarrollan como machos, inducido por un cromosoma transmitido paternamente. Esta inactivación ocurre en la embriogénesis temprana y los cromosomas permanecen heterocromáticos en la mayoría de los tejidos durante el desarrollo. En hembras ambos juegos son funcionales. En algunos casos hay destrucción selectiva de uno o más cromosomas paternos durante la profase premeiótica. Los cromosomas no destruidos se eliminan a continuación pero antes de la espermatogénesis, de manera que sólo los maternos forman esperma.

En *Sciara* y demás grupos de cócidos la impronta determina el sexo y, por tener un control materno, presenta la posibilidad de ser un mecanismo utilizado por la madre para llegar a una tasa de machos y hembras adecuada durante la instalación en un nicho ecológico particular.

Debido a que el descubrimiento de este proceso se había llevado a cabo en los cócidos que son un grupo de insectos atípico se pensó que sería un proceso excepcional y no algo generalizado, hasta que se descubrió a mediados de los años 70 que la inactivación del  $X$  en mamíferos también implicaba impronta parental.

#### 1.4. INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA $X$ EN MAMÍFEROS

La inactivación del cromosoma  $X$  en mamíferos es un mecanismo de compensación de la dosis génica, necesario debido a la diferencia entre los cromosomas sexuales ( $XX/XY$ ). La compensación se produce para que la relación existente entre el número de cromosomas  $X$  y juegos de autosomas se ajuste a 0,5 y se consigue en euterios por inactivación al azar de uno de los dos cromosomas  $X$  en el embrión, mientras que en los tejidos extraembrionarios, que forman la placenta, saco embrionario y demás órganos relacionados, el cromosoma  $X$  que se inactiva es siempre el del padre. En marsupiales el cromosoma  $X$  paterno es el que se



inactiva preferentemente en todas las células, de manera que la impronta es un componente importante de la inactivación del  $X$ .

Se ha identificado el gen  $X_{ist}$  como gen clave en el proceso de inactivación del cromosoma  $X$  y su expresión determina la inactivación del cromosoma que lo porta (efecto *cis*). El proceso general consistiría en que el gen  $X_{ist}$  del cromosoma  $X$  materno sufriría una impronta o inactivación consistente en la unión de ARN antisentido producido por el gen  $T_{six}$ , durante la meiosis de la hembra, seguido por metilación específica de agrupamientos de nucleótidos CG, conocidos como islas  $CpG$ , en el promotor  $X_{ist}$ . La inactivación del cromosoma  $X$  en tejidos extraembrionarios de la hembra ocurre porque el gen  $X_{ist}$  materno no podría expresarse debido a la metilación de su promotor, de manera que el factor de transcripción actuaría sobre el gen  $X_{ist}$  del cromosoma  $X$  paterno activándolo porque su promotor no estaría metilado. La activación del gen  $X_{ist}$  determina la inactivación del cromosoma en el que está situado.

El mecanismo molecular por el que se produce la inactivación es mediante la producción de ARN por el gen  $X_{ist}$ , cuyo papel sería fijarse al cromosoma  $X$  y actuar como señal para la fijación de proteínas que determinarían un cambio cromatínico que conduce a la inactivación genética. Posteriormente, la metilación del ADN del cromosoma inactivado supone el mantenimiento de ese estado de inactivación. La inactivación se puede revertir por tratamientos con inhibidores de la metilación, corroborando la implicación de la metilación en el proceso de inactivación.

A medida que avanza el desarrollo la impronta del gen  $X_{ist}$  materno va desapareciendo y en el momento de la inactivación del cromosoma  $X$  en el embrión ambos genes  $X_{ist}$  tienen la misma probabilidad de ser activados por el factor de transcripción, pero dada la cantidad limitante de éste al final sólo uno de los dos cromosomas  $X$  activaría su gen  $X_{ist}$ . Aquel cromosoma que lo activase sería inactivado (**Figura 2**).

El momento de conteo cromosómico, para establecer la relación entre el número de cromosomas  $X$  y juegos de autosomas, que desembocará en la inactivación de todos los cromosomas  $X$  menos uno, es crítico durante la embriogénesis y después de ese momento no se puede compensar la dosis si se produce una duplicación del cromosoma  $X$ . Recientemente, se ha descubierto un gen, al que se ha denominado *eed*, que es miembro del grupo *Polycomb*, una familia de genes que controlan la actividad génica durante el desarrollo, que es responsable del mantenimiento de la inactividad en el cromosoma  $X$  una vez que se ha producido. Aunque no se conoce todavía el mecanismo molecular exacto por el que actúa el gen *eed*, sí se conoce que está implicado en el empaquetamiento del ADN en los cromosomas.

Una vez establecida la inactivación, el gen  $X_{ist}$  se comporta como una unidad heredable y en todas las células a las que se va transmitiendo por mitosis el  $Xi$  se sigue manteniendo inactivo.



Los  $X_a$  ( $X_{\text{activo}}$ ) y  $X_i$  ( $X_{\text{inactivo}}$ ) difieren en la metilación de islas  $CpG$  localizadas en los extremos 5' de genes ligados al cromosoma  $X$ . El ADN de los promotores de genes en  $X_i$  está metilado, y envuelto en nucleosomas, mientras que el  $X_a$  está libre de nucleosomas y mostrando huellas indicativas de factores de transcripción. Cada sitio metilado  $CpG$  es autónomo y auto perpetuante con respecto a la metilación.

Sin embargo, en marsupiales algunas islas  $CpG$  de varios genes ligados al  $X$  no están metiladas en el  $X_i$ , lo que en un principio se planteó como impedimento a la validez de esta teoría. Teniendo en cuenta que la inactivación del cromosoma  $X$  es mucho menos estable en marsupiales, estos resultados confirman la implicación de la metilación en el establecimiento y estabilización de la inactivación, pero también sugieren que además de la metilación de las islas  $CpG$  están implicados otros mecanismos, como ahora se ha demostrado con el gen *eed*.

En ratón el cromosoma  $X$  inactivo tiene replicación tardía, mantenida activamente por un factor actuando en *trans* en hembras y cuando falta se pasa de replicación tardía a replicación temprana. No se sabe si este factor también modifica el patrón de replicación de los autosomas y su relación con el gen *eed*. La extensión de la inactivación es reversible de modo que con la edad o el tiempo los loci inactivados pueden ser reactivados. Sin embargo, el centro de inactivación no se necesita para mantener la inactivación del cromosoma  $X$  en células somáticas.



# **CARACTERÍSTICAS GENERALES**







## Capítulo 2. Características generales

### 2.1. TÉCNICAS DE ESTUDIO

Una vez descubierta la presencia e importancia de este proceso en mamíferos se disparó el interés por el mismo y se desarrollaron unas técnicas para estudiarlo.

#### *2.1.1. Técnica del trasplante de núcleos*

La primera de ellas trataba de ver si, en general, el desarrollo embrionario está afectado o no por marcado diferencial, y es la técnica que se conoce como del intercambio o trasplante de núcleos, que permite intercambiar físicamente la información genética entre dos embriones de ratón. Esta técnica aprovecha el hecho de que una vez fecundado el óvulo, pero antes de empezar a dividirse el embrión el núcleo del óvulo y el del espermatozoide permanecen separados durante un breve intervalo de tiempo en el citoplasma de la célula huevo. Los dos núcleos son visibles al microscopio óptico y presentan una posición y tamaño característicos. Con una aguja se puede extraer selectivamente cualquiera de esos dos núcleos o ambos a la vez. De esta forma se crearon embriones ginogenontes (con dos núcleos maternos, es decir, dos series cromosómicas maternas) y androgenontes (con dos núcleos de origen paterno, es decir, dos series de cromosomas paternos) (**Figura 3**).

En los primeros experimentos de este tipo se utilizaron líneas isogénicas de ratones de manera que el fondo genético de un sexo era igual al del otro. Por lo tanto, si el desarrollo de un ratón solo dependiera de su dotación de genes no importaría que los recibiera todos de uno de los dos progenitores. Pero, no es eso lo que ocurre porque ambos tipos son abortivos debido a que los ginogenontes desarrollan un embrión bastante normal pero su placenta y membranas vitelinas se hallan severamente atrofiadas. En los androgenontes se observa lo contrario con membranas normales pero embriones muy débilmente desarrollados. Puesto que los genes eran los mismos se concluyó que habían sufrido algún tipo de modificación o impronta diferencial que dependía de su origen materno o paterno. Este proceso parecía desactivar selectivamente algunos genes que en condiciones normales debían intervenir durante el desarrollo embrionario temprano. De los genes aportados por el padre parecían estar inactivos algunos esenciales para el desarrollo embrionario, mientras que los aportados por la madre los inactivos parecían ser los que intervienen en la formación de la placenta.

La conclusión de estos experimentos es que se necesitan ambos gametos para el desarrollo embrionario normal, de manera que este proceso de impronta impediría el desarrollo partenogénico de individuos.



Estos resultados se han podido corroborar en humanos mediante el estudio de abortos y situaciones anormales de desarrollo embrionario, y se ha encontrado que el desarrollo de un teratoma (que es un tumor embrionario) se debe a la presencia de dos juegos de cromosomas maternos y que la causa de un tumor o lunar hidatiforme (que es una malformación placentaria) es la presencia de dos juegos cromosómicos paternos.

### 2.1.2. Técnica de los cromosomas fusionados

Para determinar a que nivel (cromosómico, brazos cromosómicos, genes, etc.) se produciría este fenómeno se utilizó una técnica citogenética que permitía utilizar cromosomas fusionados. Así los cromosomas no se podían separar en meiosis y como consecuencia un gameto recibía dos copias de un cromosoma y el otro ninguna. Este proceso provoca disomías cromosómicas uniparentales (fragmentos de cromosomas homólogos, brazos cromosómicos o incluso juegos de cromosomas homólogos completos procedentes del mismo parental) con deficiencias para el segmento cromosómico del padre del sexo opuesto (**Figura 4**). Se han obtenido utilizando construcciones de translocación para cromosomas completos o segmentos cromosómicos. De acuerdo con la regla de la equivalencia de los híbridos recíprocos todos los animales resultantes de este tipo de cruzamientos deberían ser idénticos. Sin embargo, se encontró que esta regla no se cumplía para varios de los cromosomas de ratón. De esta forma se vió que, por ejemplo, ratones con dos cromosomas 11 de origen materno eran anormalmente pequeños, mientras que los que lo heredaban de su padre eran gigantescos. A través de distintas combinaciones de translocaciones se ha visto que otros cromosomas provocaban muerte del embrión y anomalías del comportamiento. De este modo se ha elaborado un mapa de no complementación en el que se han encontrado 7 segmentos con efecto diferencial mayoritario en comportamiento y supervivencia y en algunos se han encontrado efectos opuestos (grande frente a pequeño, hipoactivo frente a hiperactivo, etc). También se han observado proporciones esperadas distorsionadas en la descendencia para algunos cromosomas uniparentales, sugiriendo que pueden ocurrir efectos letales en fases muy tempranas del desarrollo.

Este efecto también se ha observado en humanos a través del estudio de diversos síndromes y, por ejemplo, la ausencia de contribución paterna del *15q* produce el síndrome de Prader-Willi caracterizado por hipotonía y fallo para desarrollarse normalmente en la infancia, pies y manos pequeñas, retraso mental y marcada obesidad. Este síndrome ocurre con una frecuencia de 1 por cada 25.000 individuos. En relación con esta enfermedad se encuentra la conocida como síndrome de Angelman, producida por la ausencia de la correspondiente copia materna del *15q* y caracterizada por retraso mental severo, expresión típica de felicidad, movimientos rítmicos, hiperactividad y risa inapropiada, como síntomas más característicos. Ocurre con una frecuencia similar de 1 por cada 25.000 individuos. En individuos normales la replicación del cromosoma de origen paterno es anterior al materno mientras que en individuos con uno de los dos síndromes la región en cuestión se replica sincrónicamente. La asincronía en la replicación es una de las características del cromoso-



ma  $X_i$ , como se ha descrito anteriormente, pero también es una característica presente en todos los genes sometidos a impronta.

También se encontró que los efectos de impronta no persisten en la siguiente generación, y por tanto, la modificación no supone algo permanente en el cromosoma. Por ejemplo, un ratón pequeño macho con las dos copias del cromosoma  $11$  heredadas de su madre producirá descendencia de tamaño normal. Los genes procedentes de la madre pierden su impronta femenina para ser de nuevo etiquetados como genes de macho.

## 2. 2. HERENCIA DE GENES MARCADOS

A nivel de expresión marcado o impronta de un gen significa inactivación, o sea, decir que un gen tiene impronta materna significa que la copia de ese gen que se hereda vía materna no se va a expresar, pero el gen físicamente está ahí, y, además, como la impronta es una modificación reversible cuando ese mismo gen pasa a una línea germinal masculina volverá a activarse de nuevo.

La transmisión de los genes marcados es mendeliana pero su expresión depende del sexo parental que lo haya transmitido. Por ejemplo, en el árbol genealógico para la herencia de un carácter afectado por impronta paterna se observa que el gen solamente se inactiva cuando se transmite por el macho. Las hembras son portadoras no manifestantes (**Figura 5**).

Ahora bien la impronta no se establece en el mismo gen de todos los individuos indicando que hay variabilidad en los genes marcados y, en este sentido, hay que distinguir los genes que sufren impronta y que son los que manifiestan el fenotipo final y los genes responsables del establecimiento de la misma. La variabilidad encontrada en el fenotipo de los genes marcados indica a su vez variabilidad o polimorfismo en el gen o genes responsables del establecimiento del mecanismo. El efecto de variabilidad en la expresión de genes marcados parece deberse a un mosaico de expresión dentro de las células del organismo afectado, debido a uno o más genes responsables de la impronta. Por lo tanto, no sólo los genes responsables de la impronta actuarán de manera diferencial en machos y en hembras sino que personas del mismo sexo con distintos genes controladores del proceso de impronta diferirán también en su dotación de genes marcados con dicha impronta.

Esto se ha visto claramente estudiando el patrón de expresión de la enfermedad conocida como corea de Huntington (EH), que se produce con una frecuencia de 1 por cada 10.000 individuos, y es un carácter modificado por una impronta específica y ligada al sexo. Es una enfermedad neurológica fatal, se hereda de forma dominante y todo el que reciba el gen  $EH$  de uno de los progenitores sufrirá la enfermedad con síntomas de movimientos espasmódicos de dedos y cara y falta de coordinación. Es, además, una enfermedad de referencia desde el punto de vista genético porque fue la primera enfermedad para la que se desarrolló una sonda que permitió detectar a los portadores antes de manifestar los síntomas porque, generalmente, la enfermedad se manifiesta en adultos diagnosticándose como



edad media los 38 años. No obstante, un 10 % de los casos se detectan en niños de hasta 2 años y medio, de ellos el 90 % habían heredado la enfermedad de su padre y es la transmisión paterna lo que había disparado la edad de manifestación de la enfermedad.

Se estableció que las diferencias en la expresividad de la enfermedad se debían a factores genéticos porque:

- Hay menos variabilidad en la edad de establecimiento dentro de familias que entre familias.
- Gemelos idénticos muestran menor variabilidad en la edad de establecimiento que gemelos fraternos.

El modelo que mejor explica la variabilidad en la expresión y el efecto parental en la herencia es considerar una expresión variable del carácter (localizado en el cromosoma 4) de manera que el carácter se presentará como un mosaico en los tejidos afectados. La proporción de células afectadas que expresan la mutación está controlada por genes modificadores que pueden cambiar el balance desde un tejido casi normal a uno casi mutante. Un gen modificador que inclina la balanza hacia una mayor cantidad de tejido mutante determinaría un adelanto en la edad de aparición de la enfermedad. La situación contraria lo retrasaría (hay casos de manifestación a los 70 años). Además, la mayor incidencia de casos juveniles por herencia paterna se debería a la localización del gen modificador en el cromosoma X. Como los machos tienen un sólo X cualquier aberración no podría ser compensada, por ello sólo el 10 % de los casos juveniles se heredan de la madre.

### 2.3. TIPOS DE GENES MARCADOS Y EFECTOS FENOTÍPICOS QUE PRODUCEN

Todavía no está claro si la impronta se mantiene a lo largo de toda la vida, en todos los tejidos de un individuo, en todos los individuos de una cepa particular o de una especie a otra en segmentos cromosómicos homólogos. En algún caso incluso se ha visto que el cambio es irreversible en transgenes cuando pasa a través de un sexo determinado, de manera que el gen quedará permanentemente marcado.

Una vez determinada la influencia del efecto a nivel global del genotipo y de regiones cromosómicas se intentó determinar si genes concretos estaban también marcados. Su descubrimiento ha sido:

- 1.- Casualmente, durante el análisis molecular de los fenotipos en ratón que ocasionaba la pérdida de función de uno de los dos alelos (*H19*, *Igf2*, *Mash2*).
- 2.- Por asociación con regiones marcadas. Debido a la característica de los genes marcados de concentrarse en *clusters* (regiones cromosómicas concretas) la identifica-



ción de un gen marcado conduce a la detección rápida de otros genes próximos que estén también marcados (*Igf2r, Ins1, Ins2, Mas, X<sub>ist</sub>*).

- 3.- Como regiones candidatas para enfermedades humanas que muestran efectos de origen parental en las que se han descrito disomías uniparentales en ratones y humanos (*Sn-rpn, Znf 127, Par 1, Par 5*)
- 4.- Por búsquedas para metilación diferencial (*U2afbp-rs*).

La frecuencia con que se han descubierto genes marcados por azar en estudios de desactivación de genes sugiere que la proporción total de genes marcados en mamíferos podría oscilar entre 0,1-1 %. La expresión o manifestación de genes marcados se puede reconocer a distintos niveles, en relación directa con lo mencionado anteriormente sobre su descubrimiento:

- Morfológicos: una proporción considerable de genes marcados en mamíferos afectan al crecimiento fetal, de manera que en general los genes expresados paternamente favorecen el crecimiento fetal, mientras que los expresados maternamente lo suprimen. Además la expresión de estos genes después del nacimiento produce manifestaciones fenotípicas muy características en humanos y en las que, por ejemplo, se observan efectos contrapuestos del tipo comportamiento hipercinético frente a hipocinético.
- A nivel citológico: Está relacionado con alteraciones cromosómicas como son la eliminación selectiva de cromosomas en cócidos o las disomías uniparentales responsables de determinados síndromes en mamíferos.
- Comportamiento: Se han observado diversos síndromes como el síndrome de Prader-Willi, el de Angelman, la corea de Huntington o el síndrome del X frágil en los que se ha descubierto la existencia de impronta genética. Estos síndromes se caracterizan por manifestarse como desórdenes psiquiátricos y neurológicos graves por lo que se piensa que los genes marcados tienen un papel en el desarrollo o función del cerebro en el comportamiento.
- Médicos: Además de los síndromes citados anteriormente existen varios tipos de cáncer relacionados con impronta genética y que se describirán en el apartado siguiente.
- Bioquímicos: Se refieren principalmente a diferencias en el estado de metilación o de empaquetamiento de genes. Las diferencias en el grado de metilación entre alelos es una característica de los genes sometidos a impronta. También lo es el grado de empaquetamiento de los genes que conduce a la replicación tardía de la zona marcada.



### 2. 4. IMPRONTA Y CÁNCER

En humanos existen dos *clusters* principales o zonas de agrupamiento de genes marcados, que contiene cada una al menos 5 genes. El *cluster* situado en el cromosoma 11p está relacionado con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) y se produce por desregulación de la impronta en el *cluster*.

El síndrome de BW se caracteriza por gigantismo pre y postnatal de hasta el 16 % con respecto al peso normal de nacimiento, macroglosia y otras organomegalias, así como una alta predisposición a desarrollar tumores embrionarios y durante la infancia, siendo el tumor de Wilms de riñón el más frecuente (50-60 %), seguido del carcinoma adenocortical (15 %). El locus de BWS se ha localizado en el cromosoma 11p y la implicación de la impronta en este síndrome se sugirió por la transmisión materna preferencial de mutaciones en familias BWS, trisomías e isodisomías paternas, aumento de penetrancia con transmisión materna en casos familiares y translocaciones en el cromosoma materno. Estas observaciones sugieren que, o bien un exceso de productos de genes expresados paternamente (estimuladores del crecimiento), o una deficiencia de productos de genes expresados maternamente (supresores del crecimiento), o ambos son los sucesos claves en la patogénesis molecular del BWS.

En concreto, la pérdida de la impronta del gen *Igf2* es el defecto más común encontrado en el síndrome de gigantismo fetal (BWS). No se sabe porqué se produce pérdida de impronta, pero se ha atribuido a diferencias temporales en el tiempo de replicación entre homólogos en regiones marcadas, así como a diferencias en las frecuencias de recombinación entre células germinales masculinas y femeninas en las mismas regiones. La tumorigénesis ocurre por la inactivación sucesiva de los 2 alelos de un gen supresor de tumores en una célula determinada (**Figura 6**). En los casos familiares el primer suceso es heredado y el segundo ocurre somáticamente, sin embargo, en los casos esporádicos ambos sucesos ocurren somáticamente. Si un locus supresor de tumores está sujeto a inactivación por impronta genómica este modelo predice que esta inactivación será el primer suceso. Debido a que la impronta es un proceso dependiente del gameto de origen este suceso de inactivación debería ocurrir generalmente en solamente el cromosoma materno o paterno. En tumores en los que el segundo suceso es la pérdida de todos o parte de los cromosomas portando el alelo supresor de tumor funcional, el origen parental del alelo supresor de tumor retenido en el tumor no será al azar. Esta predicción está reforzada experimentalmente mediante datos obtenidos para el tumor de Wilm y otros tumores embrionarios. El cromosoma portador de genes supresores potencialmente presentes en el tumor en estos casos ha sido siempre paterno. Considerando esto existirían dos clases de cáncer de familia. i) En la primera clase los alelos supresores de tumores que llevan alteraciones en la secuencia de nucleótidos se heredan como la mutación que predispone al cáncer. En tales familias la enfermedad estará genéticamente ligada a marcadores en el cromosoma que lleva el alelo supresor de tumor. En este caso el sexo del parental del que se hereda el alelo defectuoso no tiene efecto. La manifestación del cáncer es un efecto genético en el que la impronta no tendría participación y esto parece que ocurre con el tumor de retinoblastoma. ii) En la segunda clase de cáncer de familia un supresor de tumor inactivado genéticamente sería la primera mutación.



Debido a que la inactivación de este alelo no depende de sí mismo, sino que refleja la actividad del o de los genes que generan la impronta, la herencia del fenotipo del tumor no estará ligada al locus supresor del tumor. Este sería el caso del tumor de Wilm y también algunos casos de rhabdomiocarcinoma. A pesar de las evidencias citogenéticas y bioquímicas que indican la localización en el cromosoma 11p de un locus supresor del tumor de Wilm no se han podido establecer mediante el estudio de pedigrís relaciones de ligamiento entre la predisposición a la enfermedad y marcadores en el 11p.

## 2. 5. CARACTERÍSTICAS DE LA IMPRONTA GENÓMICA

En la actualidad, en mamíferos se conocen unos 50 genes endógenos afectados por impronta que presentan homología entre ratones y humanos y como características más sobresalientes presentan expresión paterna y están agrupadas en *clusters* o regiones cromosómicas concretas. Esta organización en *clusters* es una de las características más evidentes de los genes marcados y se piensa que refleja una regulación coordinada de los genes en un dominio cromosómico. Se han descubierto unos centros responsables del marcaje de las zonas que se necesitan para el control regional de la impronta o expresión marcada.

Las principales características de los genes marcados son:

- 1.- La modificación impuesta en los cromosomas conlleva una replicación tardía. Los genes sometidos a impronta están agrupados en *clusters* y organizados como dominios en tales regiones cromosómicas. Estos dominios contienen genes que muestran expresión parental específica pero también presentan diferencias específicas entre alelos en cuanto a metilación del ADN, tiempo de replicación y organización nuclear del cromosoma. En ratón se han descrito diez regiones afectadas por impronta agrupadas en seis cromosomas, que generalmente muestran equivalencia en humanos. Algunos de ellos están sometidos a estos dos procesos a la vez.
- 2.- A nivel de secuencias de ADN, los genes marcados presentan una proporción casi el doble de islas CpG con respecto a la media del genoma del ratón. Además se encuentran en alta frecuencia secuencias, conocidas como repetidas directas, próximas a las zonas sometidas a impronta. Sin embargo, estas características no son exclusivas de los genes marcados por lo que no se pueden utilizar para la búsqueda de nuevos genes de este tipo.
- 3.- La impronta suprime la transcripción porque cuando se han clonado genes sometidos a impronta muestran niveles muy bajos o anormales de ARNm a partir del locus reprimido. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo molecular por el que ocurre esta represión se cree que los factores de transcripción no tienen acceso a los promotores de los genes marcados debido a la conformación de la cromatina en estas zonas. La modificación espacial de la cromatina se debería a la acetilación de histonas debido a la metilación del ADN. Además se ha encontrado una alta pro-





porción de transcritos antisentido de genes marcados, la mayoría de ellos no codificantes y posiblemente con funciones regulatorias. No se sabe cómo pueden actuar estos antisentido, bien a través de alteraciones en la estructura de la cromatina y metilación del ADN, o bien puede que sean un reflejo de otros elementos reguladores como secuencias silenciadoras o activadores. Sin embargo, parece que podría existir más de un mecanismo de actuación de la impronta porque en un marsupial (zarigüeya) se ha encontrado que el gen marcado (*Igf2r*) no presenta ni metilación en el promotor ni transcritos antisentido.

- 4.- El mecanismo por el que se establezca la impronta debe actuar después de la replicación del ADN y debe permanecer restringido a un cromosoma para mantener una marca parental específica en todas las células diploides.
- 5.- La impronta debe ser impuesta durante la gametogénesis porque es el único estado durante el cual los genomas masculinos y femeninos están separados y podrían ser modificados de manera diferencial.
- 6.- El mecanismo debe ser reversible, de manera que un gen reprimido debido a la transmisión a través de un parental pudiera ser heredado por una descendencia a partir del sexo opuesto y ser, por lo tanto, transmitido a la siguiente generación como forma expresada.

La metilación es actualmente el mejor candidato para la modificación epigenética que debe implicar la impronta, porque se han detectado diferencias en metilación entre determinados genes dependiendo de que su origen sea materno o paterno, además se ha visto que los genes reprimidos en el cromosoma *X* inactivo de las hembras están metilados (**Figura 7**). También experimentos de ratones transgénicos han estrechado la correlación entre metilación e impronta porque se han detectado patrones de metilación diferentes en transgenes según su transmisión sea paterna o materna. Por otra parte, la metilación es un proceso reversible y que se adapta a los ciclos de vida, gametogénesis y embriogénesis estudiadas hasta ahora. Sin embargo, habría que explicar porqué los transgenes siguen este esquema aunque el grado de metilación de los gametos masculino y femenino en mamíferos es justo el contrario. Aunque una variedad de organismos han mostrado efectos de tipo parental, es en mamíferos donde se ha generado mayor interés por su relación con enfermedades importantes.

Los resultados de los experimentos de transferencia nuclear apuntan a la impronta como un mecanismo para evitar el desarrollo de partenogénéticos y, por lo tanto, de proteger la reproducción sexual, sin embargo, a partir de datos obtenidos de la técnica de cromosomas fusionados y de genes endógenos se ha buscado otra explicación para este mecanismo y se ha formulado la hipótesis de conflicto.



## 2. 6. HIPÓTESIS DE CONFLICTO

La impronta se ha encontrado en mamíferos euterios, marsupiales y plantas con flores (angiospermas). Sin embargo, monotremos (grupo de mamíferos primitivos al que pertenece, por ejemplo, el ornitorrinco) y todos los demás vertebrados e invertebrados solamente muestran expresión diferencial dependiendo del sentido del cruzamiento en algunos casos como en peces o no diferencias en absoluto, apuntando a una ausencia de impronta genómica. Esta distribución filogenética de la impronta, junto con la observación de que una proporción bastante grande de genes marcados afectan al crecimiento fetal de manera antagonista (los genes paternos aumentan el crecimiento fetal y los maternos lo suprimen), condujo a la propuesta de que la fuerza motriz en la evolución de la impronta era un conflicto genético para obtener reservas maternas.

La hipótesis de conflicto se formuló a principios de los 90 y mantiene que la impronta genómica está relacionada con el establecimiento de la viviparidad, que básicamente implica el desarrollo de los individuos de una nueva generación a partir de tejidos y reservas maternas. Considerando que la mayoría de especies de mamíferos no son monógamas, o no lo serían en el momento de fijarse este mecanismo, el conflicto de intereses se establece entre los genes de origen materno y paterno. De este modo los genes paternos favorecerán la sobreexpresión para aumentar el suministro de reservas de la madre al feto o camada y garantizar su desarrollo y así su paso a la siguiente generación, mientras que los de la madre se opondrán a esta sobreexpresión porque intentarán repartir sus esfuerzos entre más de una camada, porque a través de todos ellos transmitirán sus genes a la descendencia. Los genes del macho se habrán seleccionado para promover placentación (coincidente con la capacidad de embriones androgenéticos para inducir desarrollo extraembrionario), mientras la selección habrá favorecido la impronta en la hembra que reduce el desarrollo extraembrionario del embrión (los ginogenéticos muestran poco desarrollo de las membranas extraembrionarias) (**Figura 8**).

Si esta teoría es cierta se espera impronta en loci que influyen en el crecimiento placentario y caracteres vitales del comportamiento neonatal, y en actividades clave para la supervivencia como mamar, estímulo del apetito y tasa de crecimiento postnatal. La teoría sugiere que muchas de las anomalías asociadas con deleciones o duplicaciones de loci marcados se basan en la disfunción de actividades relacionadas con caracteres de este tipo, y también que la impronta influye en el control del apetito a nivel hipotalámico. En este sentido, y como evidencia de esta teoría se conocen síndromes en humanos que tienen efectos contrarios, mucho/poco peso, lenguas largas/cortas, hígados grandes/pequeños según sea la procedencia materna o paterna del cromosoma que ha originado el síndrome. Además, también existen síndromes asociados a variaciones cromosómicas, caracterizados por incapacidad para mamar y chupar, y algunos que afectan a oncogenes actúan en el establecimiento y desarrollo de tumores en placenta o en órganos vitales de fetos. La demostración definitiva de esta hipótesis sería relacionar estos síndromes con defectos en el marcado de genes.

El apoyo más fuerte a esta teoría radica en un grupo de genes que controlan el crecimiento del embrión, se regulan de manera conjunta, y están situados en un *cluster* en el cro-



mosoma 7. El funcionamiento de este grupo de genes muestra que los genes expresados paternamente promueven el crecimiento embrionario, mientras que los maternos actúan para restringir el uso de reservas maternas. El gen de insulina 2 (*Ins2*) se expresa paternamente en el saco embrionario de ratón, pero bialélicamente en el páncreas. El gen que codifica para el factor de crecimiento (*Igf2*), que estimula el crecimiento de células indiferenciadas, es de expresión paterna y está aguas abajo (hacia el extremo 3') del *Ins2*. Los ratones son muy sensibles a los niveles de este péptido porque las mutaciones que disminuyen los niveles de IGFII afectan su tasa de crecimiento. Por ejemplo, ratones que heredan una mutación nula en *Igf2* a partir de los padres son 60 % menores que los normales y mantienen este enanismo a lo largo de la vida. Al final del *cluster* está el *H19*, un gen raro que codifica para un RNA que no se traduce. Su expresión es exclusivamente materna (**Figura 9**).

Para explicar el funcionamiento de estos genes debemos considerar además otro gen, el *Igf2r*, que codifica para el receptor del factor de crecimiento IGFII, está mapeado en el extremo proximal del 17, y presenta expresión materna.

El receptor del factor de crecimiento IGFIIIR transporta ciertas moléculas para que se degraden en los lisosomas y la expresión materna de este gen sería un sumidero del exceso del *Igf2* limitando el crecimiento del embrión. Los fetos que carecen del receptor son aproximadamente 30 % más grandes que los normales, tienen elevados niveles de *Igf2* circulando y fallecen al nacer. La letalidad se puede cancelar por herencia paterna de una mutación nula de un *Igf2*. El gen *H19* expresado maternamente también funciona para bajar la concentración de *Igf2* suprimiendo su transcripción en el cromosoma materno.

Aunque el *Igf2* y el *H19* son genes expresados a partir de diferentes cromosomas parentales parece probable que su impronta estuviera ligada como se evidencia por la observación de que sus patrones específicos de tejido y temporales son esencialmente idénticos. La delección del gen *H19* en heterocigotos maternos produce un aumento de peso al nacer (27 % mayores que los silvestres) que se mantenía en adultos. Este sobrepeso que se atribuía a la ganancia de función de *Igf2* se comprobó cuando hembras portadoras de la delección *H19* se cruzan con machos con un alelo *Igf2* mutante. Los dobles mutantes son normales y no se afectan más fenotipos que los codificados por los genes *Igf2* e *Ins2* (**Figura 10**).

### 2.6.1. Regulación por competición de activadores

El mecanismo de regulación conjunta de estos genes es mediante una competencia entre sus promotores por un juego de elementos regulatorios que actuarían como activadores.

De acuerdo con este modelo un juego compartido de activadores en *cis* aguas arriba (hacia el extremo 5') del gen *H19* regula la actividad del promotor de los genes. El gen *H19* materno une los activadores y, por ello, el gen *Igf2* materno es inactivo. El gen *H19* paterno está metilado e inactivo y los activadores pueden unirse al gen *Igf2* paterno (**Figura 11**). En



los tejidos específicos las excepciones se deben a la existencia de activadores adicionales para el gen *H19* no sometidos a impronta o a otros mecanismos.

Solamente se han detectado dos activadores en la proximidad de estos genes, a +9 y +11 Kb relativo al principio de transcripción del gen *H19*. Para comprobar su efecto se consiguió una línea de ratón sin activadores y se vió que cuando la delección se heredaba de las madres había un descenso dramático en ARN a partir del gen *H19*. Los niveles de ARN *Igf2* no se afectaron por la delección materna de acuerdo con el hecho de que este alelo es normalmente silencioso. Cuando la delección se heredaba de los padres los niveles de *Igf2* descendían exactamente en la misma forma que el ARN *H19* en los heterocigotos maternos mientras los niveles de ARN del *H19* no estaban afectados. Así, los activadores 3' se necesitan igualmente para expresión de los dos genes pero en diferentes cromosomas parentales.

### 2.6.2. Regulación por metilación

El mejor candidato para la marca epigenética en el *cluster* formado por los genes *H19/Igf2/Ins2* es una región de extensa metilación específica paterna del gen *H19* y su flanco 5'. Se piensa que esta metilación actúa como una señal negativa para bloquear la interacción del gen *H19* paterno con activadores haciéndolos de ese modo disponibles para ocupar el gen *Igf2* paterno y estaría de acuerdo con la desaparición de la impronta con la delección (Figura 12).

Se generó una cepa con una delección del dominio de metilación paterno específico, incluyendo el gen estructural *H19* y 10 Kb de la secuencia flanqueante 5'.

La hipótesis de partida era que la herencia paterna de la delección *H19* no tendría consecuencias fenotípicas puesto que el alelo paterno de *H19* es normalmente silencioso. Así fue y el alelo materno *H19* y el alelo paterno de *Igf2* no se afectaron por la delección *H19* en *cis*. Sin embargo, cuando la delección *H19* se heredó de una hembra la progenie neonatal expresó ambos alelos *Igf2* en todos los tejidos estudiados. Por tanto, la delección del gen *H19* y sus secuencias flanqueantes 5' producen pérdida de impronta del gen *Igf2* que está a 80 Kb en dirección 5' de la delección.

El gen *Igf2* normalmente muestra expresión bialélica solamente en dos tejidos cerebrales (plexos coroideos y leptomeninges) durante el desarrollo. Cuando se analizó la producción de *H19* en estos tejidos a partir de heterocigotos que habían heredado la delección vía materna no hubo consecuencias y los dos alelos se detectaron a niveles equivalentes. Así, el efecto de *H19* en la expresión está restringido a los tejidos en los que *Igf2* está marcado.

La impronta del gen *Ins2* también desapareció por la delección del gen *H19*. La pérdida de impronta del gen *Ins2* se puede explicar con la competencia de activadores, si la expresión del gen está bajo el control de los mismos elementos regulatorios que gobiernan la expresión de los genes *H19* e *Igf2* en el saco embrionario. Eso es, en el cromosoma paren-



tal los activadores compartidos activan simultáneamente los genes *Igf2* y *Ins2* cuando el gen *H19* está silencioso. En los tejidos como el páncreas en los que se produce expresión bialélica del *Ins2* ésta se debería a activadores específicos de este tejido localizados 5' con respecto al gen.

Las evidencias más directas en favor de metilación del ADN como la marca epigenética proceden de una disrupción del gen de la ADN metiltransferasa en ratón. Embriones homocigotos para una mutación nula en el gen de la metiltransferasa expresan ambos alelos de *H19* y han silenciado ambos genes de *Igf2*.

Todo lo explicado hasta el momento se basa fundamentalmente en datos obtenidos a partir de mamíferos porque es en los que más se ha estudiado debido al interés que se despierta siempre por la posibilidad de que se extienda a humanos. Sin embargo, se conocen muchos organismos muy distintos en los que se ha descrito la existencia de impronta afectando a procesos bastante diferentes. De todos ellos comenzaremos por las plantas angiospermas.

**PLANTAS  
ANGIOSPERMAS**





## Capítulo 3. Plantas Angiospermas

Presentan en su desarrollo una serie de similitudes con el desarrollo embrionario de mamíferos en el sentido de que las semillas se forman a partir de reservas que se transmiten de la planta madre. Tanto los mamíferos como las angiospermas presentan una división del trabajo durante el desarrollo entre el propio embrión que da lugar al individuo adulto y los tejidos extraembrionarios que toman nutrientes de la madre (**Figura 13**). Estos tejidos son las membranas extraembrionarias de los mamíferos que derivan del cigoto y el endospermo de las angiospermas. A pesar de las semejanzas en el desarrollo hay una clara diferencia en el mecanismo de fecundación en angiospermas. La fertilización en maíz incluye dos sucesos: uno de los dos núcleos espermáticos se une con el núcleo de la célula huevo mientras el otro núcleo del gameto masculino se fusiona con los dos núcleos centrales llamados polares dando lugar al endospermo triploide. A pesar de las diferencias que muestran con respecto a mamíferos se obtienen respuestas similares en respuesta a la alteración de la dosis normal de los genomas paterno y materno. La impronta en maíz se conoce desde mediados de los años 60. Las diferencias en la actividad de los genomas heredados materna y paternamente en endospermo de maíz se han observado mediante manipulación genética a distintos niveles. La primera evidencia de la existencia de impronta se obtuvo variando la proporción de cromosomas derivados materna y paternamente, cuando se desvía de la proporción 2 de origen maternos : 1 de origen paterno (2M:1P) el desarrollo se paraliza y no se consigue el grano porque no se forma adecuadamente una capa de células de transferencia de nutrientes al endospermo. Esto se produce tanto cuando hay un exceso de genoma paterno como cuando hay un exceso materno, indicando que el mantenimiento de la dosis 2:1 es muy importante para el normal desarrollo de la semilla. También se observa un efecto de la impronta en la contribución parental de acuerdo con lo siguiente:

<b>Combinación normal:</b>	2m: 1p
	4m: 2p
<b>Granos pequeños:</b>	3m: 1p
<b>Combinaciones abortivas:</b>	1m: 1p
	2m: 2p
	4m: 1p
	5m: 1p
	6m: 1p
	7m: 1p
	3m: 2p
	5m: 2p
	6m: 2p





A nivel de cromosomas individuales las disomías para cromosomas o brazos concretos produjeron efectos cuantitativamente diferentes, desde diferencias en el tamaño detectables sólo estadísticamente hasta una reducción en el tamaño del grano, claramente apreciable en el caso de la ausencia de un representante paterno para los brazos 8 y 19. El reemplazamiento de los brazos que faltan por brazos maternos no complementan este efecto.

El efecto casi indetectable de desequilibrios de dosis a nivel de brazos cromosómicos individuales indica que el efecto de desequilibrio a nivel de genoma total refleja la acción acumulada de genes localizados en distintos brazos cromosómicos.

Por la forma en la que ocurre la impronta en plantas y las características del desarrollo parece ser que este mecanismo en principio tendría una función similar a la de evitar el desarrollo partenogenético como en mamíferos. Aunque en maíz es posible desarrollar haploides maternos y paternos, éstos no son fértiles y son plantas mucho menos vigorosas que las normales y, por tanto, con un aspecto totalmente diferente. En este sentido la totipotencia del gametofito haploide demuestra la ausencia de genes vitales en maíz transmitidos por un sólo sexo, pero no excluye la posibilidad de impronta en genes no vitales. Las plantas ginogenéticas y androgenéticas son generalmente más pequeñas y se diferencian de las diploides. Sin embargo, no se ha descrito nunca el desarrollo de endospermo ginogenético ni androgenético a pesar de muchos intentos.

Hay razones importantes para haber mantenido la tasa genómica en el endospermo. Claramente el sistema evitará el desarrollo espontáneo del endospermo en ausencia de polinización e igualmente cualquier desarrollo resultado de la fusión de ambos núcleos de espermatozoides con los dos núcleos polares. Más importantemente debe también restringir el éxito de embriones agamospermos, protegiendo así la reproducción sexual. El hecho de que la impronta afecte sólo al endospermo se ha explicado como un mecanismo que permite la reproducción asexual del embrión y reduce el coste evolutivo.

También se ha propuesto que sea un mecanismo de regulación de la dosis génica porque se ha detectado impronta en los géneros *Solanum* y *Avena* y podría ser un mecanismo generalizado de control entre angiospermas.

Otra explicación propuesta para este fenómeno es que sea un medio de optimizar la distribución de recursos maternos. Se ha hipotetizado que el mecanismo de la doble fertilización y la estructura de saco embrionario confiere una ventaja en el desarrollo de las plantas. Esta hipótesis no está totalmente aclarada, pero el hecho de que su función esté solamente sustituida en casos raros de familias avanzadas y especializadas como las orquídeas, en las que hay haustorios desarrollados a partir del embrión que funcionan como estructuras para la absorción, confirman que éste es un sistema conservado y heredado en las angiospermas.

Sin embargo, también en plantas se ha detectado impronta en un gen individual que no se podría encuadrar dentro de la teoría anterior porque en principio no parece importante para el desarrollo embrionario. Es el caso del gen *R*, que origina una capa de aleurona coloreada cuando se transmite maternamente, pero moteada cuando se transmite vía polen. El



gen *R* codifica para un factor de transcripción involucrado en activar genes estructurales en la ruta biosintética de la antocianina. Algunos alelos *R* confieren pigmentación uniforme en la aleurona cuando se transmiten maternamente (genotipo de endospermo *RR/r*). Cuando *R* se hereda del padre los granos resultantes (genotipo *rr/R*) son moteados.

Las características de la impronta del alelo *R* son las siguientes (**Figura 14**):

- El polen sigue siendo moteado cuando se transmiten dos copias de *R* vía paterna, o sea,  $rr/R = rr/RR$ , por lo que la expresión no es un efecto dependiente de la dosis.
- Los resultados equivalentes  $RR/rr = RR/r$  corroboran la característica anterior, de manera que  $rr/RR$  y  $RR/rr$  son distintos.
- El efecto recesivo era el mismo que el de una delección.
- Las segregaciones de los genotipos  $RR/r$  y  $rr/R$  en  $F_2$  coinciden con las proporciones esperadas para genes nucleares.
- Aparecen granos quiméricos con zonas uniformes y otras moteadas cuando se pierden los alelos  $RR/r$  de la aleurona durante el desarrollo del grano, indicando que es un proceso reversible.
- Utilizando alelos *R* que confieren pigmentación en la aleurona, embrión y planta la diferencia atribuida al parental solo se detectó en la aleurona.

La explicación evolutiva al mantenimiento de este sistema no está claro y se ha propuesto que se deba a ligamiento con otros genes que sí estén afectados por impronta.

Existen, sin embargo, otros organismos en los que también hay procesos afectados por impronta y que no mantienen similitud en el desarrollo con mamíferos, por ejemplo, los peces.



# **PECES**





## Capítulo 4. Peces

Los peces son ovíparos, o sea, las reservas en el ovocito están fijadas antes ya de la fecundación y, por otra parte, son partenogenéticos aunque en baja frecuencia. En estos organismos se ha detectado la existencia de impronta a partir de dos tipos de resultados diferentes:

- expresión de isoenzimas en cruzamientos recíprocos
- herencia del patrón de metilación en transgenes (var capítulo 5).

### 4.1. EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS

Los resultados derivados de la expresión de genes isoenzimáticos parecen indicar un tipo de impronta o marcado diferencial al comparar el momento de expresión de determinados genes en los híbridos relativos a las especies parentales, en algunos casos, o inhibición de uno de los alelos.

Estos efectos se han evidenciado en cruzamientos intergenéricos de peces pertenecientes a los géneros *Leptomis*, ejemplificado por el pez sol (L) y el *Micropterus* al que pertenece la perca americana (G). Se analizaron los cruces: L x L, G x G, L x G y G x L para 13 enzimas diferentes.

La F<sub>1</sub> procedente del cruzamiento *Leptomis cyanellus* x *Leptomis gulosus* y, en general, entre centráquidos (Perciformes: *Centrarchidae*) del mismo género siguió un desarrollo morfológico normal y las isoenzimas de fosfoglucoisomerasa (PGI) se expresaron a la vez y en el momento en que se expresaban en cada especie parental, tanto en embriones como en adultos.

Sin embargo, para algunas isoenzimas se producen patrones de expresión muy diferentes en híbridos recíprocos a partir de especies con patrones casi idénticos. Por ejemplo, algunas isoenzimas de PGI no están presentes en el oocito y no se sintetizan hasta después del destete en el cruce ♀L x ♂G, algunos electromorfos se retrasan dos días en su aparición comparados con la expresión en cada especie. Sin embargo, en el cruce ♀G x ♂L se detectaron las isoenzimas antes de destete, un día antes de la aparición en ambas especies parentales, y esto se detectó en algunas enzimas más (**Figura 15**).

Este fenómeno observado en peces incluye:

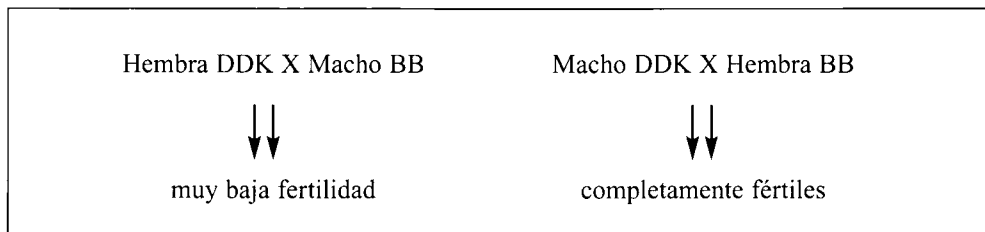
- 1.- Se producen patrones de expresión muy diferentes en híbridos recíprocos a partir de especies con patrones casi idénticos.



- 2.- Enzimas no relacionadas están coordinadamente desviadas en su expresión temporal en los híbridos recíprocos lo que sugiere que las aberraciones producidas no son específicas de locus.
- 3.- Es un mecanismo selectivo porque se produce expresión sincrónica de alelos en algunos loci pero expresión asincrónica en otros.
- 4.- Direccionalidad de la respuesta de desarrollo lo que sugiere un papel regulatorio importante para el citoplasma de especies maternas y una tasa de evolución reguladora no lineal en las diferentes líneas de especies.

Este fenómeno de asincronía, inhibición alélica y expresión preferencial de algunos alelos se ha observado para algunos loci en un número de híbridos interespecíficos de varias especies de peces tropicales y de salmónidos. Cuando la distancia entre especies en estudio se hizo mayor se produjeron mayores anomalías en el desarrollo a nivel morfológico así como un aumento en expresión anormal de isoenzimas alélicas en los tejidos diferenciados.

Una consecuencia de la impronta en estos organismos puede ser que los híbridos interespecíficos sean inviables o produzcan híbridos con fenotipos opuestos. Y se ha propuesto que sea un mecanismo implicado en especiación o mantenimiento de integridad de las especies porque es un efecto que se acentúa con la lejanía filogenética. Un apoyo importante para esta teoría reside en la observación de que ocurre un fenómeno similar en especies de mamíferos en las que se ha descrito la existencia de impronta. Por ejemplo, se ha observado que cruzamientos recíprocos entre especies de *Peromyscus* (un tipo de ratón nocturno conocido como musaraña) producen efectos opuestos en el tamaño y morfología de la placenta (aunque no en su función). Algunas hibridaciones son solamente posibles en una dirección y esto ocurre también con la cepa de ratón conocida como DDK, en la que existe una incompatibilidad entre la contribución genómica paterna y el citoplasma DDK, de manera que los resultados de los cruzamientos por la cepa BB se ajustan al esquema:



Se ha demostrado que los resultados de estos cruzamientos no se deben a un efecto de herencia materna sino que el responsable es un componente paterno del núcleo diploide y que el locus responsable de la incompatibilidad que se ha mapeado en el cromosoma 11 es reversible mediante modificadores específicos de cepas que controlan el nivel de metilación.

# **METILACIÓN DE TRANSGENES Y CLONACIÓN**







## Capítulo 5. Metilación de transgenes y clonación

Se ha demostrado que el grado de metilación y expresión de transgenes en peces y mamíferos está afectado por el sexo del parental del que procede el alelo.

La metilación de transgenes en peces aumenta después del paso por la línea germinal masculina, lo que conlleva un descenso de la expresión del gen, y disminuye después del paso por la femenina lo cual va acompañado de aumento de expresión. Además, tanto en ratones como en peces transgénicos se ha detectado un patrón mosaico en la expresión que indica que la impronta no se mantiene en todas las células. El procedimiento habitual seguido para conseguir peces transgénicos es microinyectar embriones antes de la primera división, que cuando llegan a adultos se cruzan con un pez normal para poder controlar el origen parental del alelo en hemicigosis (**Figura 16**).

El análisis de la metilación del transgén se lleva a cabo mediante digestión con enzimas de restricción del ADN purificado, porque si la diana está metilada la enzima no la reconoce y por tanto no se produce la banda correspondiente, de manera que a mayor grado de metilación menor número de bandas presentes en el gel de electroforesis.

En los experimentos llevados a cabo con peces en los que se utilizaron como parentales una hembra metilada y un macho no metilado, el ADN de la descendencia estaba no metilado y se producía un aumento en la expresión, mientras que en el cruzamiento recíproco, o sea, si era el macho el metilado se obtenía una descendencia hipermetilada que además se acompañaba de ausencia de expresión del gen (**Figura 17**).

Para determinar si estas diferencias eran hereditarias se analizaron tres generaciones sucesivas a partir de un cruzamiento en el que era el macho el metilado. En su descendencia se obtenían tanto machos como hembras metilados y la siguiente generación mostraba una hipermetilación con respecto al padre, mientras que se obtenía una hipometilación con respecto a la madre, determinado a partir del tamaño de las bandas obtenidas en las digestiones de ADN. Pero, además, se vió una característica muy importante de la impronta que es la capacidad de un sexo para revertir la impronta del otro sexo en la producción de sus propios gametos, de manera que un gen hipermetilado debido a su herencia paterna se puede hipometilar si se transmite por un óvulo a la siguiente generación, y a la inversa. Este resultado se ha obtenido en peces con transgenes diferentes indicando que es independiente del tipo de gen utilizado, de la secuencia y del tamaño del inserto, que varió en los experimentos realizados de 9 a 200 Kb. En uno de los casos estudiados el paso de un transgén a través de la línea germinal femenina metiló permanentemente el transgén, acompañado de una inactivación. Sin embargo, la impronta sólo determinaría un estado potencial de actividad o represión porque los transgenes mantienen la especificidad de expresión en los tejidos en los que se expresaba el gen original (**Figura 18**).



Para determinar si existía un estado de metilación diferencial entre los tejidos se determinaron los patrones de metilación de varios tejidos somáticos y se observó un patrón similar en todos ellos. Sin embargo, cuando se compararon con los espermatozoides éstos mostraron una clara hipometilación indicando que la mayor cantidad de metilación ocurría postfertilización. Además, se han encontrado diferencias en la metilación entre esperma de peces de diferente genotipo lo cual indicaría variación genética en el marcado del genoma durante la gametogénesis masculina. En los huevos no fecundados el grado de metilación fue similar o mayor a los tejidos somáticos por lo que el transgén se hereda en estados distintos y opuestos.

Se examinó el patrón de metilación de gametos a partir de peces genotípicamente diferentes para identificar las posibles diferencias y se vió que los patrones de metilación no fueron idénticos, de manera que aunque el patrón final de metilación del transgén no se establece hasta después de la fertilización, ya ocurre alguna metilación antes de fertilización y esta metilación muestra variabilidad genética (**Figura 19**).

Por otra parte, la mayor frecuencia de impronta en transgenes (20-25 % del total de transgenes), comparado con el bajo número hasta el momento de genes endógenos conocidos, afectados por el proceso no está suficientemente aclarado y se puede deber:

- 1.- Algunos transgenes pueden tener secuencias susceptibles de sufrir impronta, bien solos o en combinación con algunas secuencias celulares en el sitio de integración. También podrían detener los cambios dinámicos y diferencias entre loci homólogos de manera que se bloquearía el sitio de integración de un modo permanente, lo cual no ocurriría en circunstancias normales y por ello no serían detectadas.
- 2.- También los transgenes se pueden integrar más frecuentemente en dominios cromosómicos marcados porque estas regiones podrían ser hipersensibles a ADNasas y más permisivas para integración.

En este sentido sería de gran interés determinar si existen sitios específicos de integración de los transgenes y clonarlos para ver si influyen en la expresión del gen y también si es la integración en sí misma la que hace que se marque el transgén.

Además, habría que explicar las diferencias entre macho y hembra en cuanto a metilación y la relación entre estado general del gameto y efecto que produce. Las diferencias se han atribuido a diferencias en la estructura de la cromatina entre gametos masculinos y femeninos, pero también es posible que haya un efecto dependiendo del origen parental en el pez que sea reminiscente de la impronta genómica y que se haga patente a nivel de metilación de transgenes.

Por otra parte, el efecto producido en expresión de transgenes en mamíferos es el opuesto al detectado en peces. De manera que en ratones los genes heredados vía paterna están desmetilados y el paso de transgenes a través de la línea paterna produce desmetilación, o sea, confiere un mayor potencial de expresión indicando que el genoma paterno puede haber evolucionado para estar sometido a una mayor diversificación de funciones



durante el desarrollo. Mientras que la herencia materna o el paso a través de esta línea germinal produce un efecto opuesto, o sea, hipermetilación, acompañada de disminución en la expresión. Esto explicaría porqué en el curso de la evolución de la viviparidad es el genoma paterno el más importante para el desarrollo de tejidos placentarios. La línea germinal femenina es más represiva y podría haber resultado en el mantenimiento del control del desarrollo del embrión. Por otra parte, los gametos muestran el sentido contrario, o sea, el ovocito está desmetilado hasta gastrulación temprana indicando que se necesitan genes maternos en el desarrollo temprano.

Debido a que el locus está hipermetilado en el huevo no fertilizado pero la transmisión materna resulta en un descenso de metilación (y lo contrario en el macho) implica que el patrón de metilación gamética por sí solo no representa la impronta.

Las diferencias entre el estado de metilación de los gametos masculino y femenino y el comportamiento de transgenes en peces y mamíferos, dependiendo del sexo del parental que lo transmite, no están claras y se ha relacionado con diferencias en el sistema de determinación del sexo *XY* en mamíferos frente al *WZ* en peces.

La clonación de mamíferos utilizando como donantes de núcleos células diferenciadas debe ir acompañado de modificaciones en la expresión de genes y probablemente de modificaciones epigenéticas. Aunque el genoma introducido podría sufrir desmetilación activa o pasiva la metilación en las regiones marcadas por metilación diferencial debe estar protegida de esta reprogramación para que los genes marcados se mantengan intactos en el organismo clonado. El hecho de que la clonación sea todavía muy poco eficiente y que la gran mayoría de clones mueran durante el desarrollo podría indicar que el proceso de reprogramación es ineficiente. Además los embriones clonados muestran con frecuencia anomalías (gigantismo placentario o fetal y muerte perinatal) que son típicas de la desregulación de genes marcados, quizás indicando que las células somáticas donantes podrían haber tenido patrones de marcaje aberrante o que la reprogramación podría interferir con el propio mantenimiento de la impronta. Los últimos trabajos publicados apuntan a que la impredecibilidad de la clonación parece deberse a algunos genes inestables que se activan dependiendo del parental del cual proceden. Cuales de estos genes marcados se activan o inactivan varía entre embriones normales y clonados. El análisis de 6 genes marcados en ratones clonados mostró que en ningún ratón estaban los 6 expresándose correctamente, aunque el aspecto de los ratones era normal. Estos patrones de expresión alterados se mantuvieron en los ratones adultos, de manera que también indican que el desarrollo es muy tolerante a errores en la regulación de genes. Otra conclusión importante es que el éxito de la clonación es mayor utilizando núcleos de células madre. Sin embargo, el mayor porcentaje de individuos "normales" que se obtienen, al menos en animales mamíferos del tipo ovejas y cerdos es utilizando núcleos de células adultas porque tienen ya los genes marcados aunque existen todavía pocos datos que permitan comparar los resultados en diferentes especies utilizando células madre y células adultas.



# **ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA IMPRONTA**





## Capítulo 6. Origen y evolución de la impronta

Buscando una explicación general para el origen y mantenimiento de la impronta la cuestión que se plantea básicamente es si todos los casos descritos obedecen al mismo mecanismo aunque afecten a distintos procesos, o son mecanismos no relacionados. Si se supone que no están relacionados habría que admitir que evolutivamente surgió un mecanismo para marcar ADN más de una vez, lo que parece improbable. Si, por el contrario, suponemos que todos derivan del mismo mecanismo inicial la teoría más aceptada es que sea una herencia del proceso de modificación-restricción de bacterias para reconocer ADN extraño debido a que se ha detectado metilación en la mayoría de los casos descritos en distintos organismos. Además, todos los casos descritos en eucariotas tienen en común su relación con los dos sexos y, por tanto, deben tener relación también con los gametos, de manera que el mecanismo en sí mismo podría estar involucrado en la propia evolución de la anisogamia (unión de gametos desiguales) debido a que:

- la meiosis es un proceso común en todos los organismos estudiados
- este mecanismo afecta a cromosomas sexuales
- algunos mecanismos son responsables todavía del control del sexo.

No obstante se necesitan más datos moleculares y de más organismos, principalmente no mamíferos, para poder esclarecer el significado evolutivo de este mecanismo.

Para corroborar si efectivamente el establecimiento de la impronta pudo estar relacionado con reproducción sexual deberían estar afectados cromosomas implicados en la determinación del sexo. En este sentido se enmarcan los casos de *Sciara* y mamíferos.

La similaridad entre la impronta en mamíferos y pez cebra arguye por la conservación del proceso. El pez cebra tiene fertilización y desarrollo externo y posiblemente un sistema de determinación del sexo distinto que en ratón.

Si la función de la impronta fuera solamente evitar el desarrollo partenogénico de embriones en peces no debería haber impronta, sin embargo, los datos mostrados en el Capítulo 4 y otros relativos a metilación diferencial de transgenes indica una incidencia del mecanismo en este grupo de animales. Una hipótesis para explicar estos datos sería que en la actualidad la impronta constituiría un mecanismo para contribuir al mantenimiento de integridad de las especies aunque en su inicio podría haber estado relacionada con otros procesos más generales como la implantación de la reproducción sexual a través de la diferenciación de los gametos e incluso más en el propio desarrollo de la viviparidad. Esto explicaría la diferencia entre peces y otros organismos.





# **BIBLIOGRAFÍA**





## Bibliografía más relevante

- **Ariel, M., E. Robinson, J.R. McCarrey and H. Cedar (1995)** Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine *Xist* gene. *Nature Genetics* **9**: 312-315.
- **Barlow, D.P. (1995)** Gametic imprinting in mammals. *Science* **270**: 1610-1613.
- **Chandra, H.S. and V. Nanjundiah (1990)** The evolution of genomic imprinting. *Development Supplement*: 47-53.
- **Charlton, W.L., C.L. Keen, C. Meriman, P. Lynch, A.J. Greenland and H.G. Dickinson (1995)** Endosperm development in *Zea mays*; implication of gametic imprinting and paternal excess in regulation of transfer layer development. *Development* **121**: 3089-3097.
- **Crouse, H.V. (1966)** An inducible change in state on the chromosomes of *Sciara*: its effects on the genetic components of the X. *Chromosoma* **18**: 230-253.
- **Jaenisch, R. (1997)** DNA methylation and imprinting: why bother?. *Trends in Genetics* **13**: 323-329.
- **Lalonde, M. (1997)** Parental Imprinting and Human Disease. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 173-195.
- **Leighton, P.A., J.R. Saam, R.S. Ingram and S.M. Tighman (1996)** Genomic Imprinting in Mice: Its Function and Mechanism. *Biology of Reproduction* **54**: 273-278.
- **Li, E., C. Beard and R. Jaenisch (1993)** Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365.
- **Lyon, M.F. (1994)** The X Inactivation Centre and X Chromosome Imprinting. *European Journal of Human Genetics* **2**: 255-261.
- **Martin, C.C. and R. McGowan (1995)** Parent-of-Origin Specific Effects on the Methylation of a Transgene in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Genetics* **17**: 233-239.
- **Moore, T. and D. Haig (1991)** Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics* **7**: 45-49.
- **Moore, T., L.D. Hurst and W. Reik (1995)** Genetic Conflict and Evolution of Mammalian X-Chromosome Inactivation. *Developmental Genetics* **17**: 206-211.



- **Peterson, K. and C. Sapienza (1993)** Imprinting the genome: imprinted genes, imprinting genes, and a hypothesis for their interaction. *Annual Review of Genetics* **27**: 7-31.
- **Pfeider, K. (2000)** Mechanisms of Genomic Imprinting. *American Journal of Human Genetics* **67**: 777-787.
- **Razin, A. and H. Cedar (1994)** DNA Methylation and Genomic Imprinting. *Cell* **77**: 473-476.
- **Reik, W. and J. Walter (2001)** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics* **2**: 21-32.
- **Sapienza, C. (1991)** Genome imprinting and carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1072**: 51-61.
- **Wang, J. (2001)** Imprinted X inactivation maintained by a mouse polycomb group gene. *Nature Genetics* **28**: 371-375.
- **Whitt, G.S. (1981)** Developmental Genetics of Fishes: Isozymic Analyses of Differential Gene Expression. *American Zoology* **21**: 549-572.
- **Whitt, G.S., D.P. Philipp and W.F. Childers (1977)** Aberrant Gene Expression during the Development of Hybrid Sunfishes (Perciformes, Teleostei). *Differentiation* **9**: 97-109.

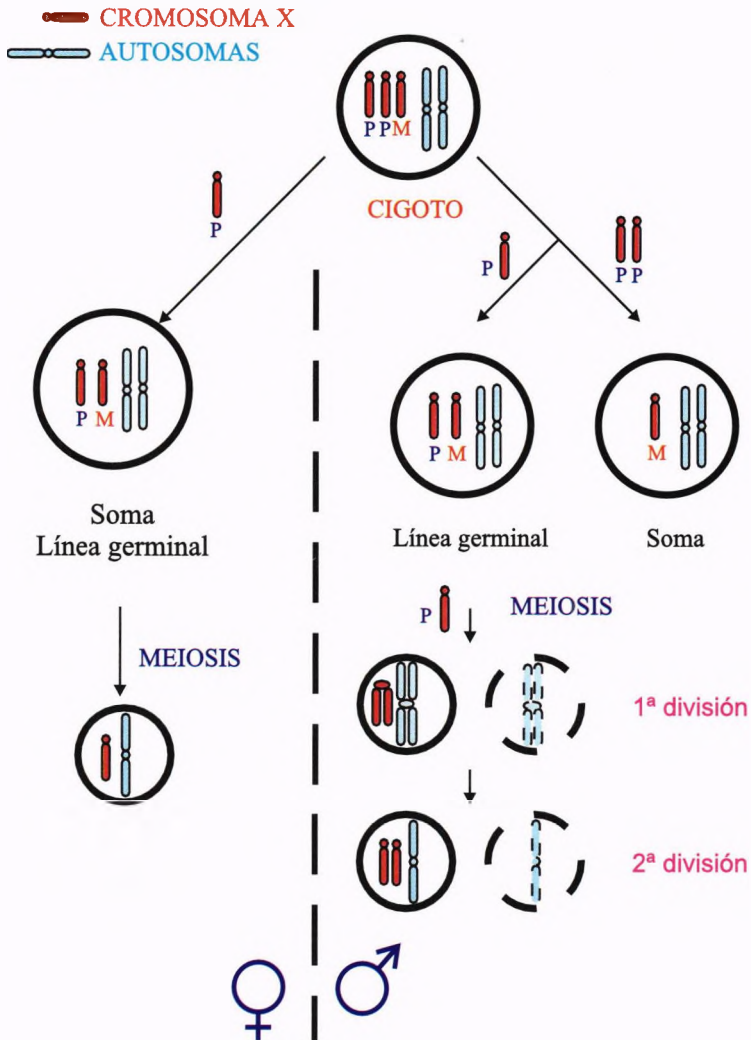




# FIGURAS



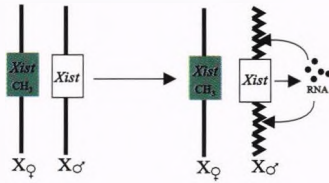




**FIGURA 1. ELIMINACIÓN EN *SCIARA***

En *Sciara* los cigotos contienen dos juegos de autosomas y tres de cromosomas X. Dos de los X son paternos ( $X_p$ ) y uno de origen materno ( $X_m$ ). Durante la embriogénesis temprana un cromosoma X paterno se elimina a partir de ambos sexos y de la línea somática de las hembras. En la línea somática de los machos ambos X de origen paterno son eliminados, de manera que las líneas germinales masculinas y femeninas y la línea somática femenina son  $X_mX_p$ , sin embargo, la línea somática masculina es  $X_mO$ . Al final, la línea germinal de ambos sexos es  $AXX$ , pero la constitución cromosómica de la línea somática de hembras es  $AXX$  y la de los machos  $AXXO$ .

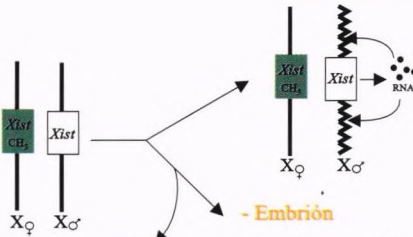
## MARSUPIALES



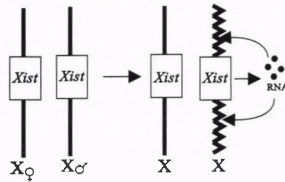
## EUTERIOS

### - RATONES

- Tejidos extraembrionarios



- Embrión



### - HUMANOS

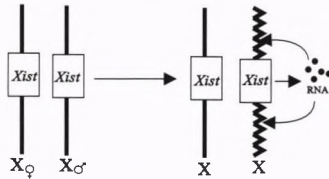
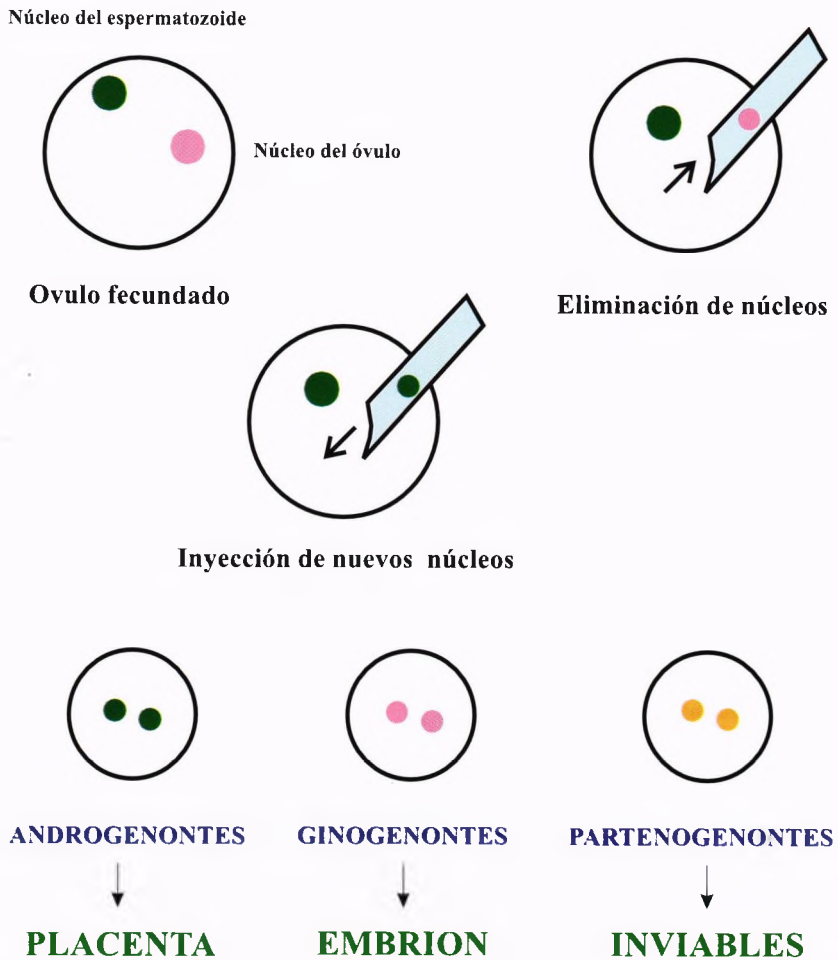


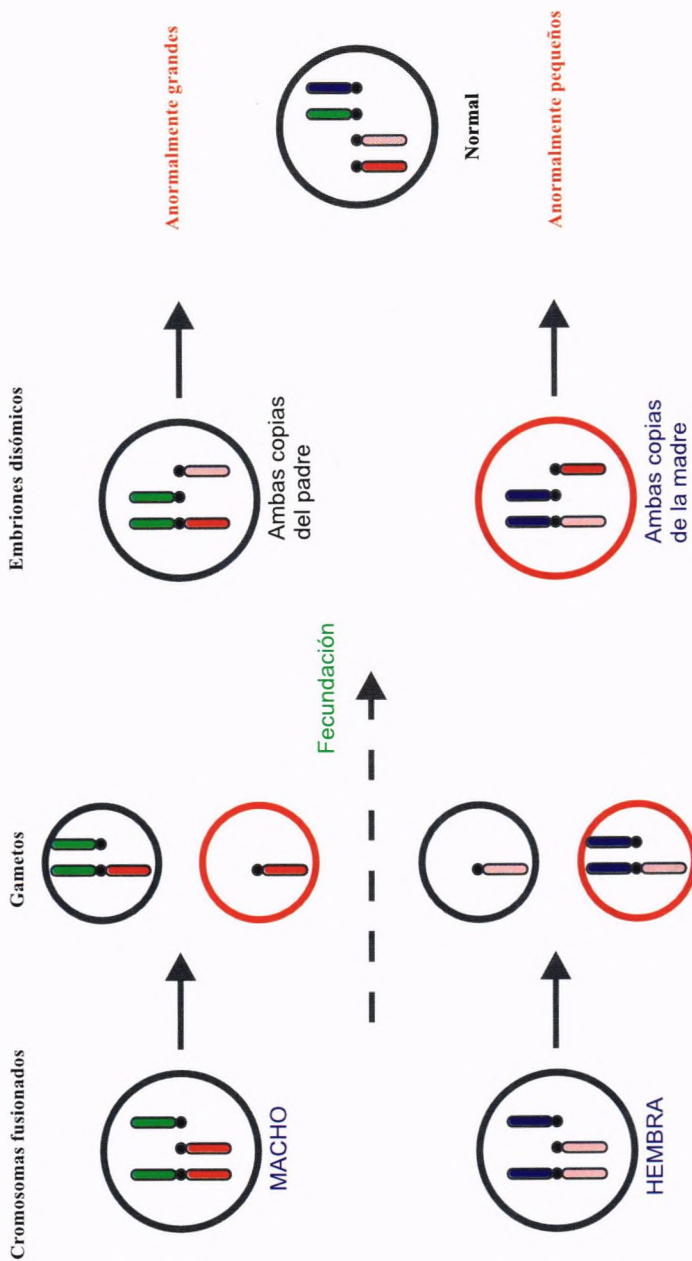
FIGURA 2. IMPRONTA EN LA INACTIVACIÓN DEL  $X$

Manifestación de la impronta en la inactivación del cromosoma  $X$  en diferentes grupos de seres vivos. En marsupiales el cromosoma  $X$  que se inactiva es el heredado del padre. En euterios hay diferencias: en humanos la inactivación, tanto en embrión como en tejidos extraembrionarios, es al azar, pero en ratón mientras en tejidos extraembrionarios se inactiva el cromosoma  $X$  paterno en el embrión al azar.



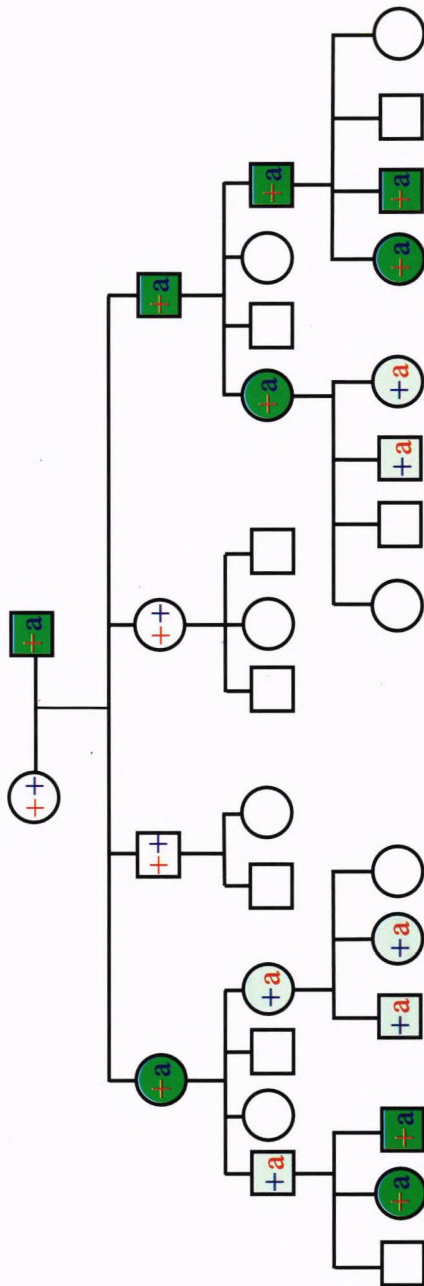
**FIGURA 3. TÉCNICA DEL TRANSPLANTE DE NÚCLEOS**

A partir de un óvulo fecundado en el que no se hayan fusionado los pronúcleos de los gametos se elimina uno de ellos y se microinyecta el que se desea estudiar. Cuando los dos núcleos son de origen paterno (androgenonte) se desarrollan solamente tejidos de tipo placentario, cuando son maternos (ginogenonte) se desarrollan tejidos embrionarios y si no hay fecundación (partenogenonte) no se desarrolla ningún tipo de tejidos.



**FIGURA 4. TÉCNICA DE LOS CROMOSOMAS FUSIONADOS**

Mediante esta técnica los cromosomas no se pueden separar en meiosis y se consiguen gametos desequilibrados que generan embriones con disomías, los cuales originan ratones anormalmente grandes cuando las copias del cromosoma proceden del padre y anormalmente pequeños cuando proceden de la madre.

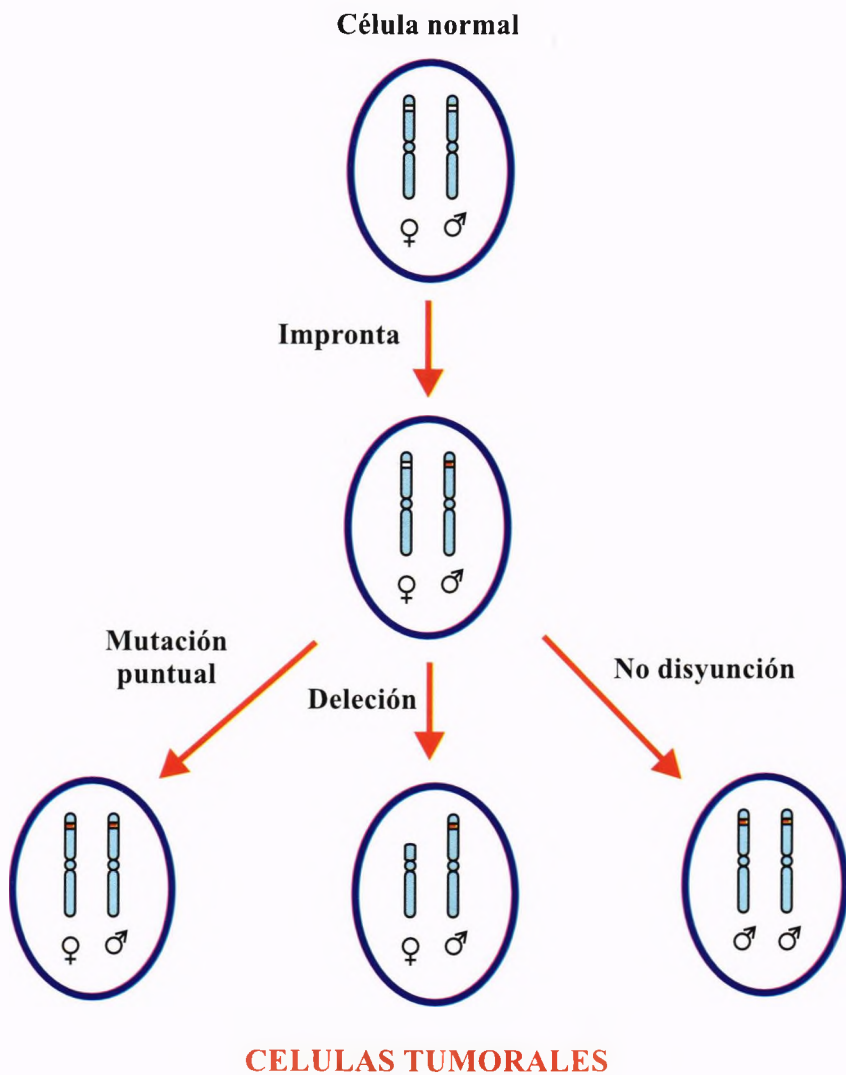


**+, a:** genes transmitidos vía materna

**+, a:** genes transmitidos vía paterna (presentan marcado)

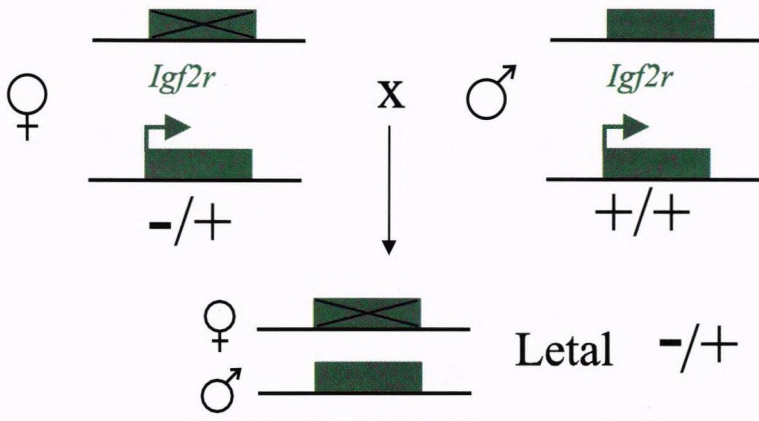
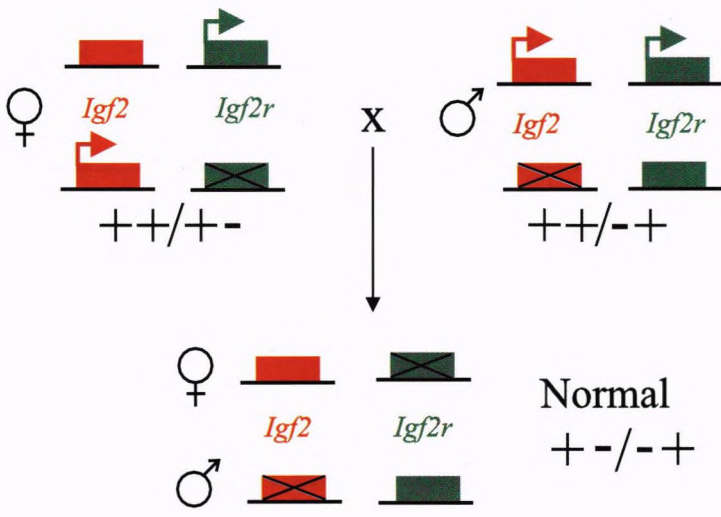
**FIGURA 5. HERENCIA DE GENES MARCADOS**

Los alelos de genes sometidos a impronta se heredan de manera mendeliana, sin embargo considerando su expresión los alelos *a* y *+* se inactivan cuando se transmiten vía paterna, mientras que las hembras son portadoras no manifestantes.



**FIGURA 6. IMPRONTA GENÓMICA Y CÁNCER**

La inactivación de un alelo de un locus supresor de tumores es el primer suceso en la producción de una célula tumoral. El segundo es una inactivación o pérdida del segundo alelo por una mutación o por mecanismos de no-disyunción que conducen a los 2 alelos inactivos a la misma célula.

**A****B**

**FIGURA 9. MUTACIÓN DEL GEN *Igf2r***

**A.** El efecto del gen *Igf2r* sobre el desarrollo se ha estudiado mediante mutaciones para estos genes. Los fetos que carecen de receptor *Igf2* mueren al nacer. **B.** El efecto letal producido por la falta de actividad del gen *Igf2r* se puede cancelar mediante herencia paterna de una mutación nula en el gen *Igf2*.



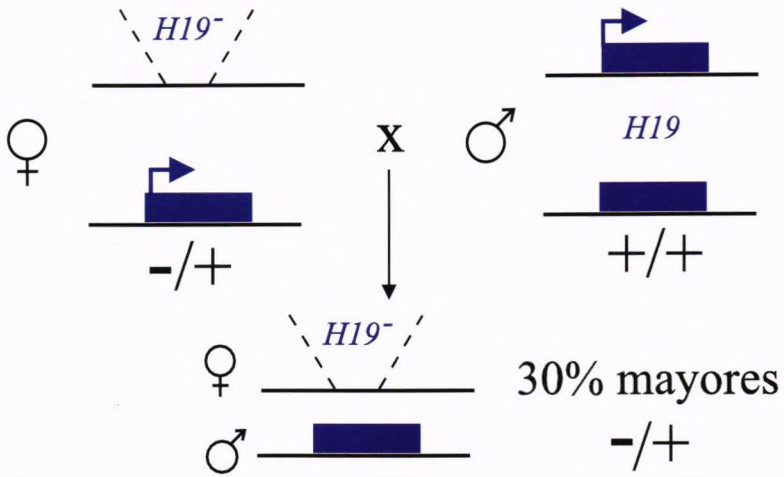
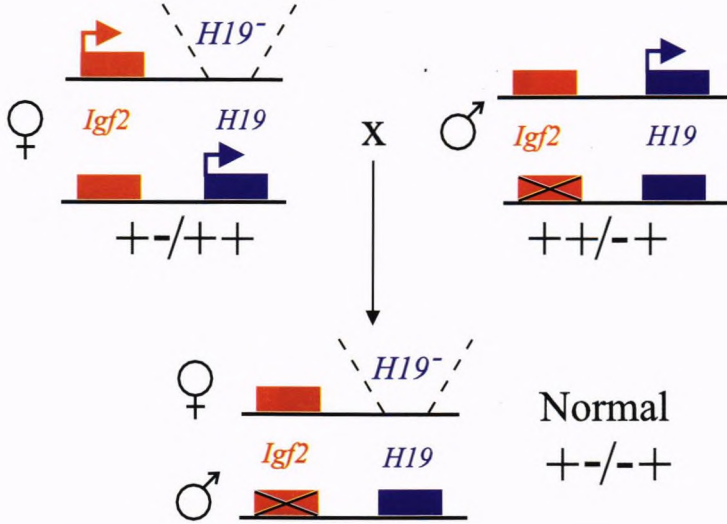
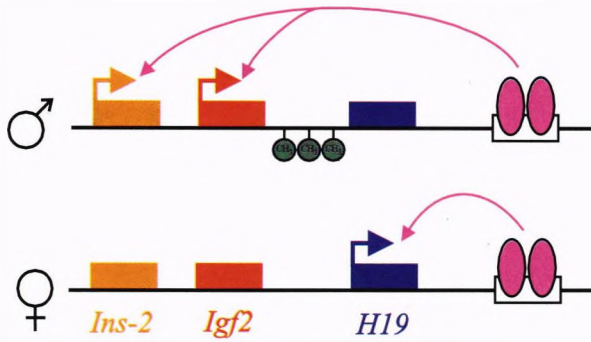
**A****B**

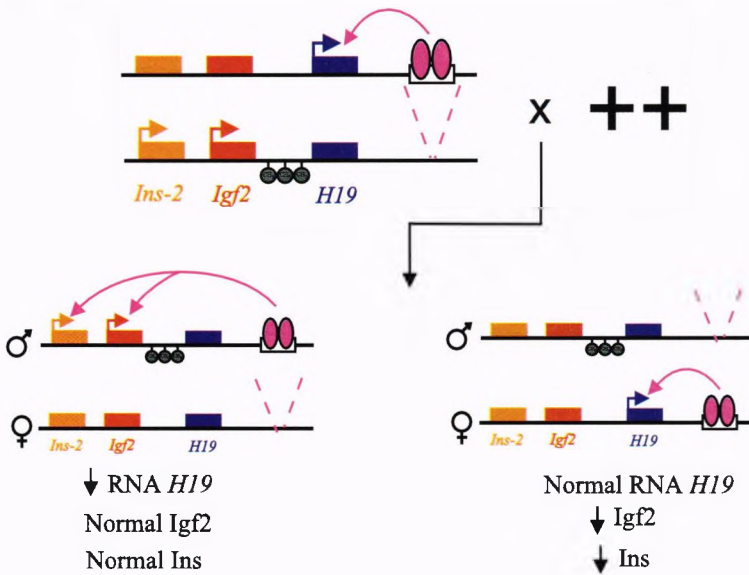
FIGURA 10. MUTACIÓN DEL GEN *H19*

**A.** El gen *H19* también actúa para bajar la concentración del producto del gen *Igf2*, la delección de *H19* heredado maternamente produce descendientes anormalmente grandes. **B.** Este efecto se suprime en los dobles mutantes para la delección del *H19* materno y un *Igf2* nulo de origen paterno.

# COMPETICIÓN DE ACTIVADORES



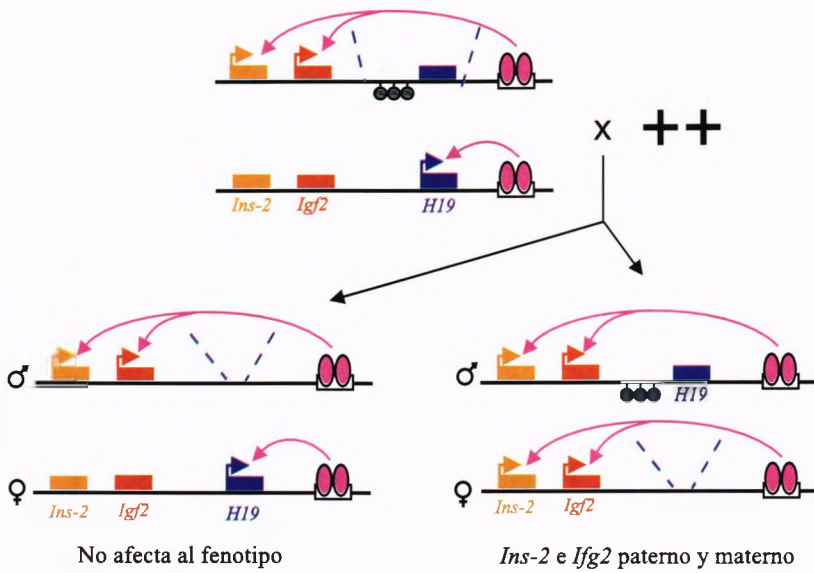
# DELECIÓN DE ACTIVADORES



**FIGURA 11. COMPETICIÓN DE ACTIVADORES**

La regulación conjunta de estos genes se explica mediante un modelo que incluye la competición por un juego de activadores situados en *cis* aguas arriba (hacia el extremo 5') del gen *H19*. El gen *H19* materno une los activadores y por ello el gen *Igf2* materno es inactivo. El gen *H19* paterno es inactivo porque está metilado y los activadores se pueden unir al gen *Igf2* paterno.

## DELECIÓN DE *H19* y 10 Kb 5'



## MUTANTES EN METILTRANSFERASA

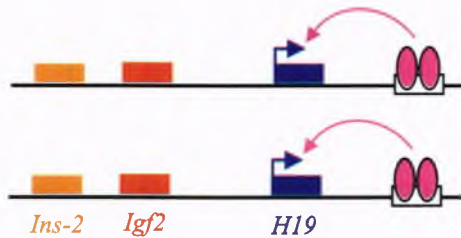
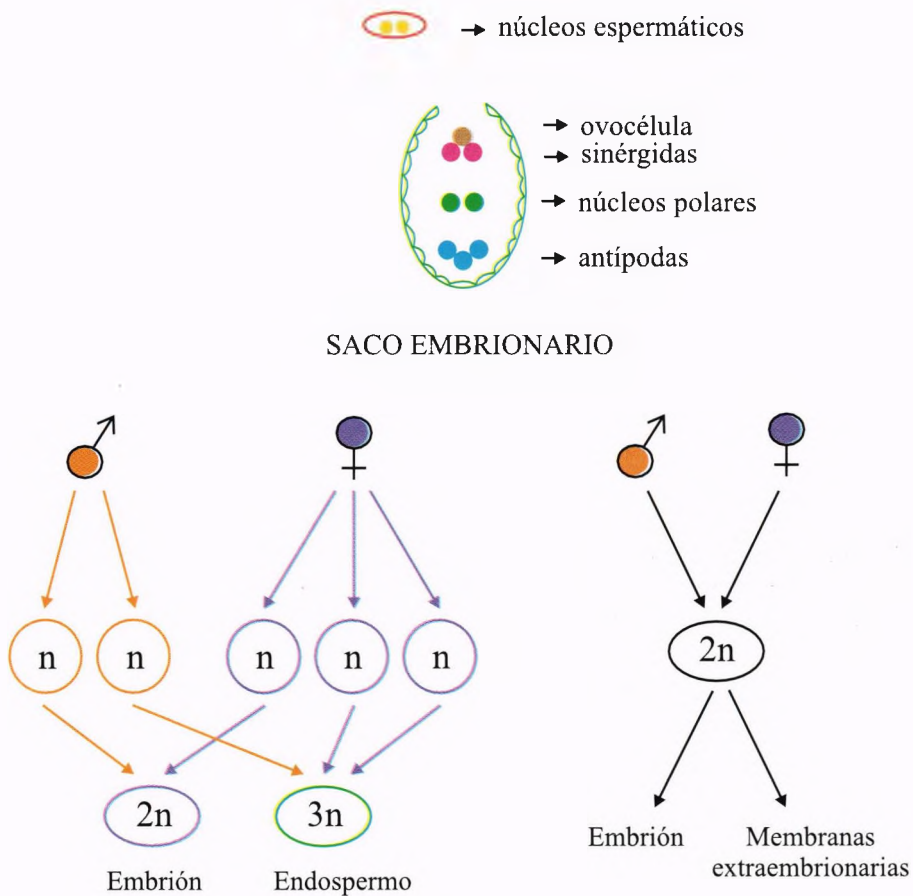


FIGURA 12. METILACIÓN EN IMPRONTA

En los individuos sin activadores debido a una delección heredada de las madres se produce una disminución de la expresión del gen *H19*, sin que se afecte el gen *Igf2*. En cambio, cuando la delección se hereda de los padres descendientes los niveles de *Igf2* sin que se afecte al *H19*.

Existe una metilación paterna del gen *H19* y de una región situada hacia el extremo 5' del gen. La herencia paterna de una delección para esta zona no tiene consecuencias fenotípicas debido a que es una zona inactiva. Sin embargo, la delección materna produce expresión bialélica de *Igf2*.

Embriones homocigotos para una mutación nula en el gen de la metiltransferasa expresan ambos alelos de *H19* y han silenciado los dos de *Igf2*



**FIGURA 13. FECUNDACIÓN EN ANGIOSPERMAS**

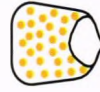
Durante la fecundación en angiospermas se produce la fusión entre un núcleo espermático y uno de la ovocélula dando lugar al embrión  $2n$ . El otro núcleo espermático se fusiona con los 2 núcleos polares dando lugar a un tejido  $3n$  que originará el endospermo. En mamíferos la fusión de los gametos masculino y femenino da lugar al cigoto  $2n$  del que se forman el embrión y las membranas extraembrionarias.

$R/r$  : Aleurona (3n)



**Rojo**

$RR/r$



**Moteado**

$rr/R$

## CARACTERÍSTICAS

1.-  $rr/R = rr/RR$

2.-  $RR/rr = RR/r$   
 $rr/RR \neq RR/rr$

3.- Delección del gen produce el efecto recesivo

4.- Granos quiméricos en el desarrollo



5.- Expresión específica en aleurona

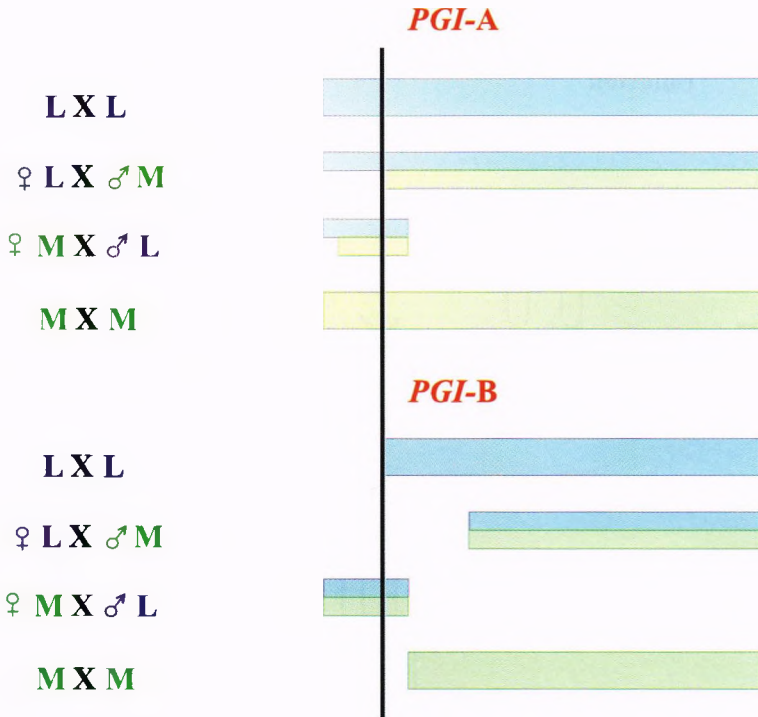
FIGURA 14. IMPRONTA GÉNICA EN PLANTAS

El gen  $R$  produce una coloración rojiza uniforme en maíz cuando se transmite maternamente, pero moteada cuando la transmisión es paterna. El color rojo se debe a la coloración de la aleurona que es un tejido triploide.

**Cruzamientos:**

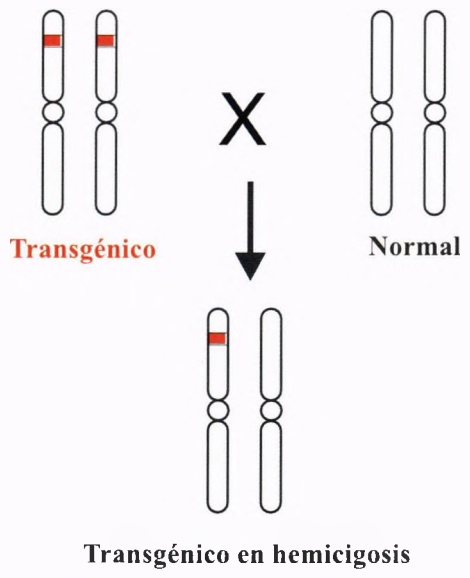
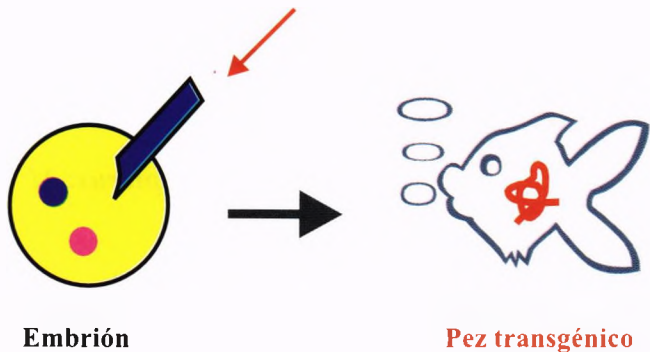
*Leptomis*: L

*Micropterus*: M



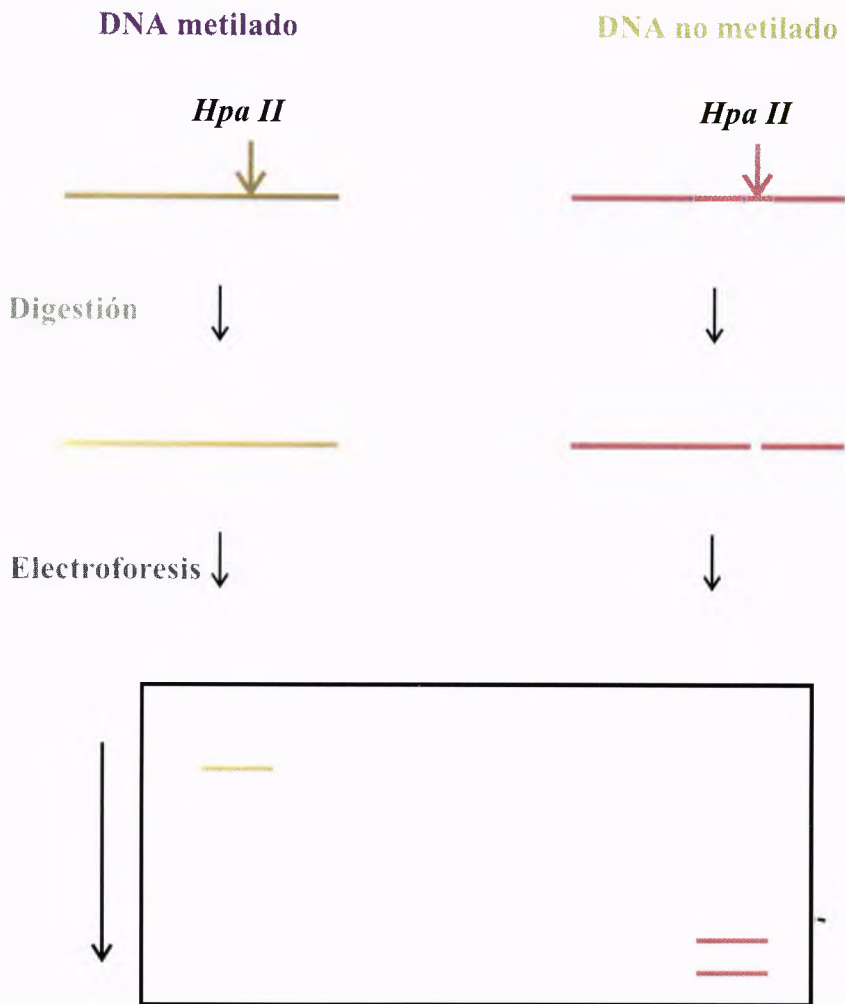
**FIGURA 15. IMPRONTA EN PECES**

Manifestación de la impronta en la expresión de isoenzimas en híbridos interespecíficos de peces. Dependiendo de la dirección del cruzamiento se producen patrones de expresión muy diferentes a partir de especies con patrones casi idénticos.



**FIGURA 16. PRODUCCIÓN DE PECES TRANSGÉNICOS**

Para conseguir peces transgénicos se microinyectan embriones con el gen o genes que se quieren transformar antes de la primera división. El pez transgénico adulto se cruza por un pez normal para controlar el origen parental del alelo en hemicigosis.

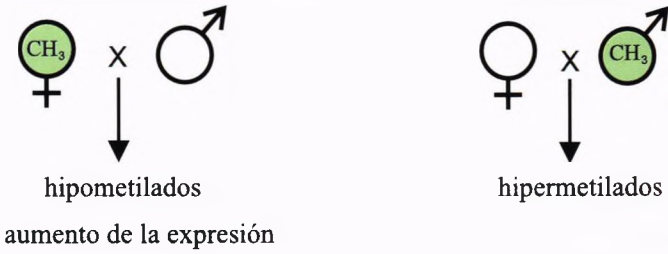


**FIGURA 17. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DE TRANSGENES**

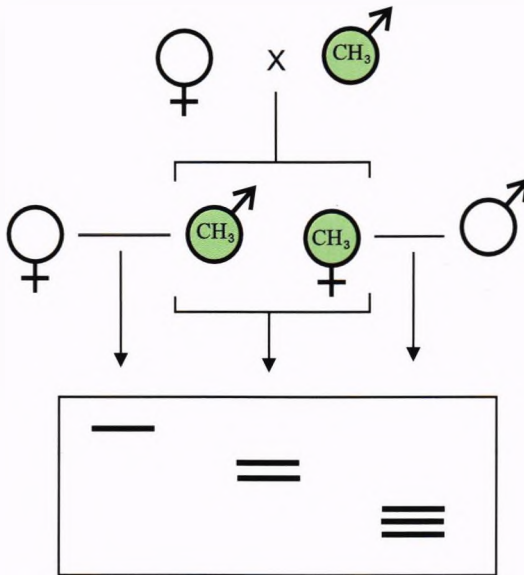
La metilación del ADN impide el reconocimiento de dianas por enzimas de restricción (por ejemplo *Hpa* II), produciendo una reducción en el número de fragmentos generados en una digestión.



## EFFECTO DE LA METILACION EN TRANSGENES



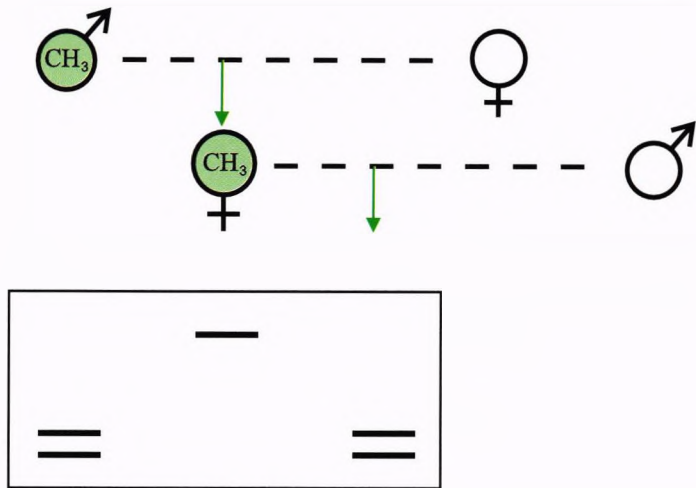
## HERENCIA DE LA METILACION EN TRANSGENES



**FIGURA 18.** EFECTO DE LA METILACIÓN EN TRANSGENES DE PECES

La herencia de un transgén vía materna produce una hipometilación en peces acompañada de aumento de expresión. En cambio, el paso del transgén por la línea masculina produce el efecto contrario. Estas diferencias son hereditarias como se puede comprobar al analizar el tamaño de las digestiones de ADN de 3 generaciones sucesivas procedentes de un macho hipermetilado

## REVERSIÓN DE LA METILACIÓN



## DIFERENCIAS DE TEJIDO EN METILACIÓN DE TRANSGENES

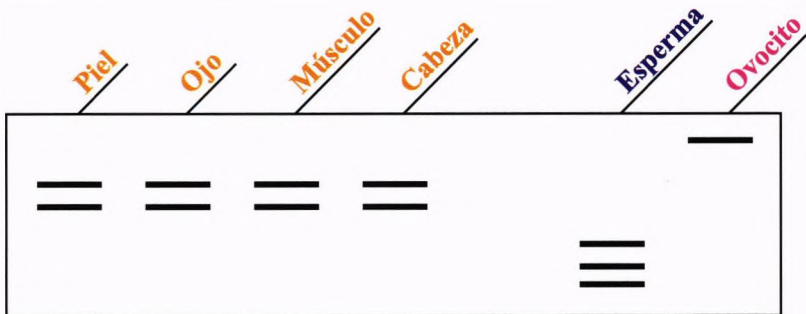


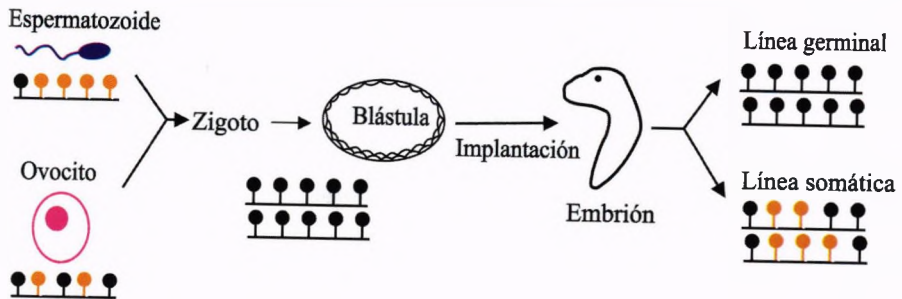
FIGURA 19. REVERSIÓN DE METILACIÓN

Los efectos de metilación son reversibles, de manera que un transgén hipermetilado por herencia paterna se puede hipometilar por una transmisión materna posterior.

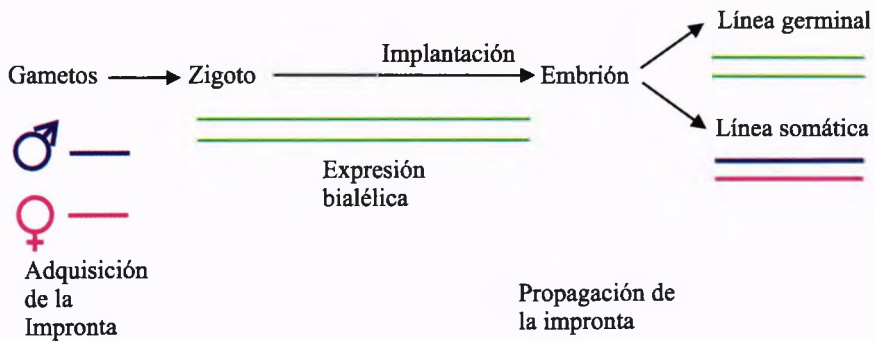
Existe un estado de metilación diferencial entre los tejidos somáticos y los gametos, mostrando un nivel de metilación similar en distintos tejidos estudiados que resultó ser mayor que el de los espermatozoides. En cambio el ADN de los oocitos se encuentra hipermetilado en comparación tanto con el esperma como con los tejidos somáticos.



# CICLO DE METILACIÓN



# EXPRESIÓN DE IMPRONTA



**FIGURA 7. CICLO DE METILACIÓN. EXPRESIÓN DE IMPRONTA**

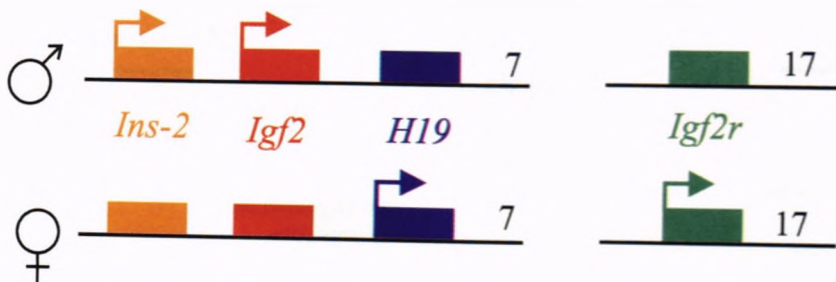
En mamíferos, los espermatozoides están hipermetilados, mientras que los ovocitos están hipometilados. Después de la fecundación la metilación desaparece y no reaparece hasta después de la implantación del embrión. Solamente los alelos de la línea somática se metilan, los de la línea germinal no muestran metilación.

Cuando se analiza la expresión de los genes sometidos a impronta se observa que su ciclo de expresión coincide con el ciclo de metilación. Así, se observa que se produce una expresión diferencial del gen en los gametos. Cuando se forma el cigoto desaparece la expresión diferencial y se mantiene la expresión bialélica hasta la implantación. En el embrión implantado se observa expresión bialélica en la línea germinal y manifestación de la impronta únicamente en las células de la línea somática.

## HIPÓTESIS DE CONFLICTO

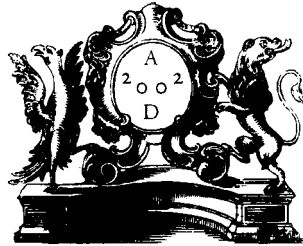
GEN	EXPRESION		FUNCION	FENOTIPO MUTANTE
	MATERNA	PATERNA		
<i>Igf2</i>	-	+	Crecimiento fetal	Ratones enanos
<i>Ins-2</i>	-	+	Expresión en saco embrionario	Disminución del crecimiento fetal
<i>H19</i>	+	-	Inhibe transcripción de <i>Igf2</i>	Mayor que el silvestre 30%
<i>Igf2r</i>	+	-	Receptor para <i>Igf2</i>	Mayor que el silvestre letal perinatal

## LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA



**FIGURA 8.** HIPÓTESIS DE CONFLICTO. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA

Características de los genes de mamíferos que han dado lugar a la hipótesis de conflicto. Los genes con expresión paterna propician un aumento del tamaño del embrión, mientras que los maternos se oponen a este crecimiento. Los genes *Ins2*, *Igf2* y *H19* están situados muy próximos en el cromosoma 7 del ratón.



*Este libro se terminó de imprimir el día 26 de septiembre,  
festividad de San Cosme y San Damián, patronos de los  
médicos, que realizaron curaciones milagrosas sin pedir  
nada a cambio a sus enfermos.*





ISBN 84-7786-779-8



9 788477 867791