Source: http://endospain.wordpress.com/

INTERNATIONAL INSTITUTE for RESTORATIVE REPRODUCTIVE MEDICINE

Epigenética de la endometriosis en el marco de un sistema integral de atención de la infertilidad

Alejandro Leal, PhD, FCP

Sección de Genética y Biotecnología

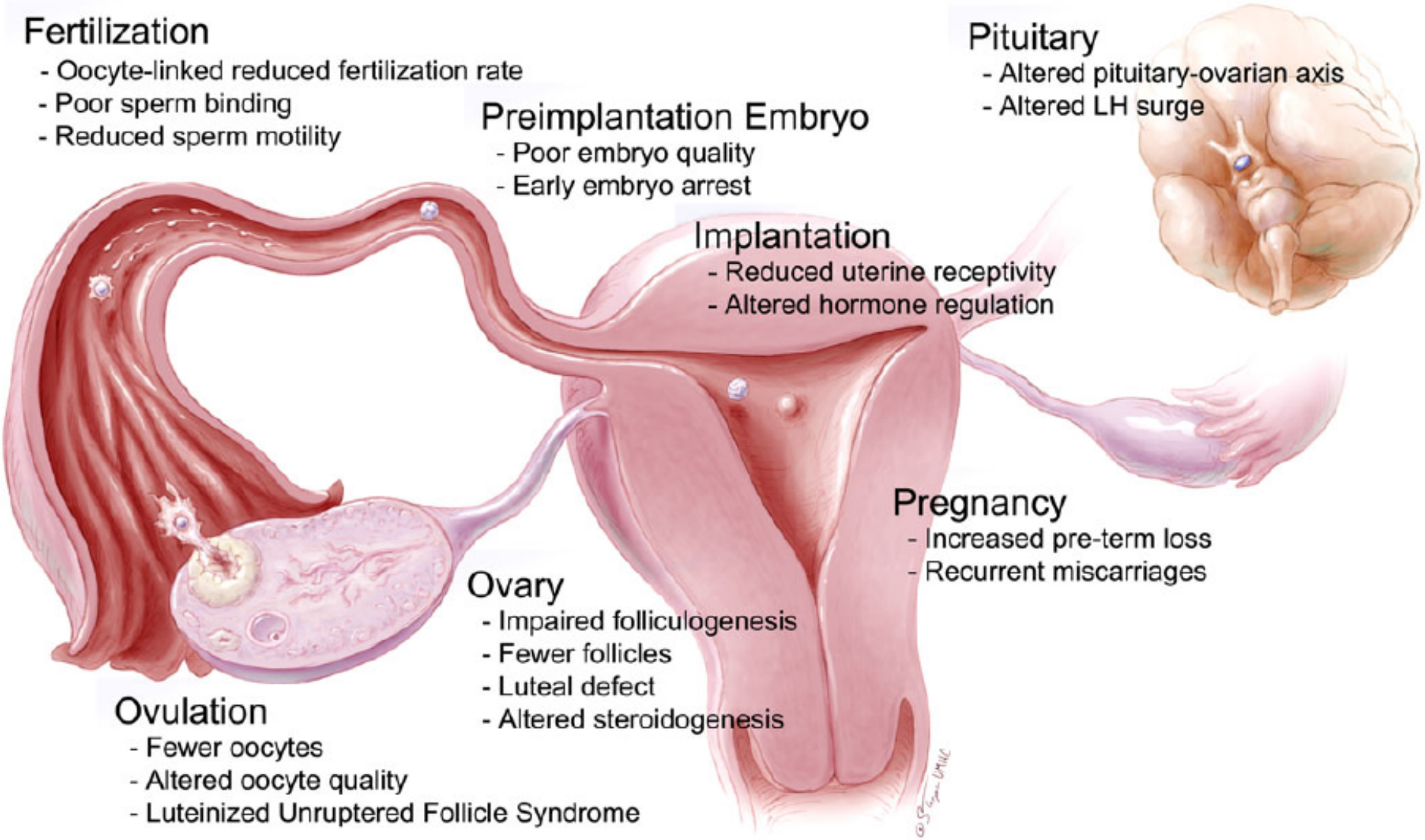
Escuela de Biología

Universidad de Costa Rica

Endometriosis

- von Rokitansky (1860). Uterusdrusen-Neubildung
- Tejido funcional similar al endometrial que crece fuera del útero
- Enfermedad hormonal, inmunológica & genética
- Contribución ambiental

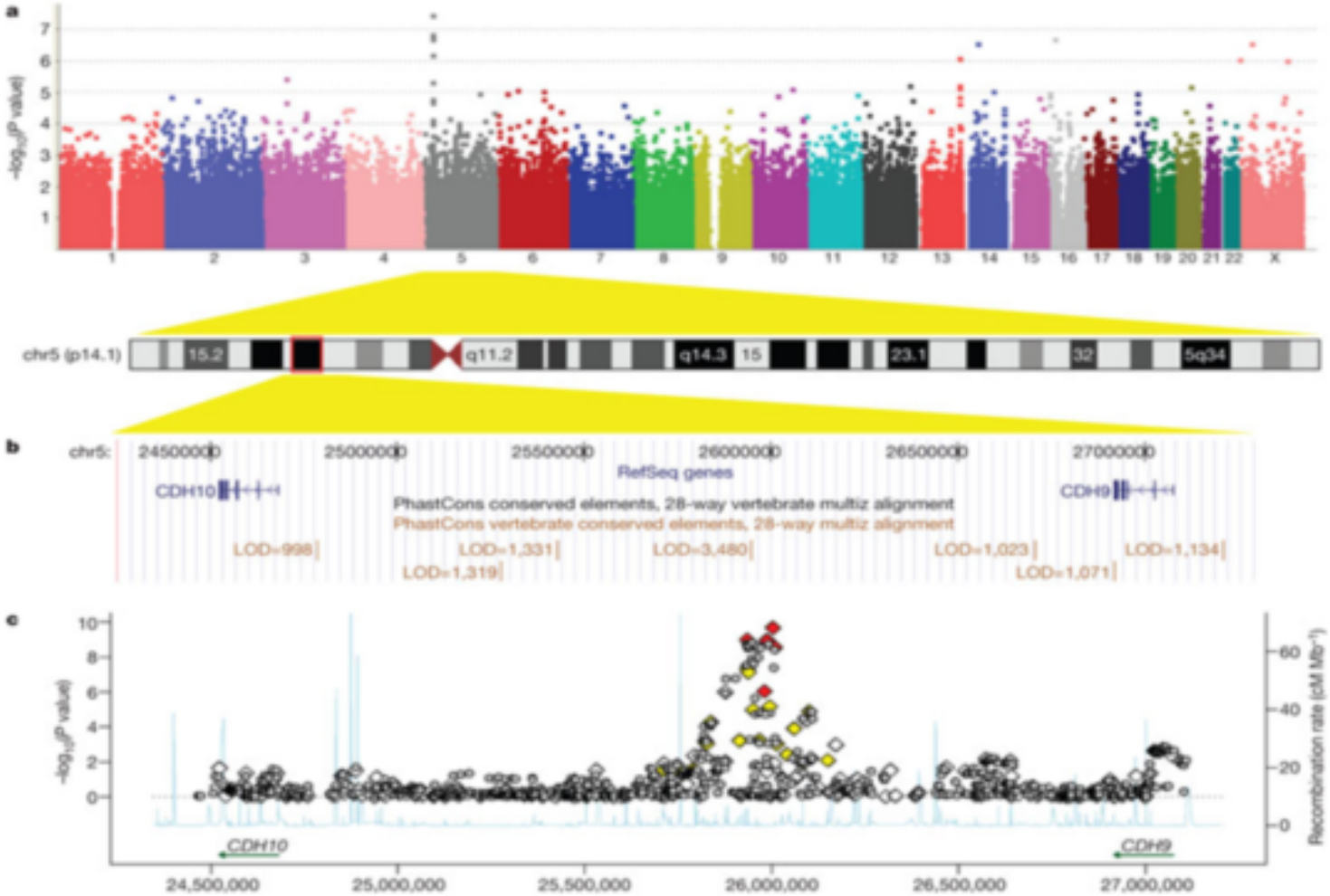
Factores asociados con fecundidad reducida en mujeres con endometriosis



Enfermedad genética

- Gemelos MZ (r=0,52) muestran mayor concordancia que gemelos DZ (r=0,19)
- Heredabilidad = 51% (Treloar et al. 1997)
- Estudios genómicos sugieren *loci* y genes candidatos, por de contribución limitada
- >100 artículos de ligamiento o asociación de endometriosis con varios polimorfismos pero ningún gen ha sido consistentemente identificado

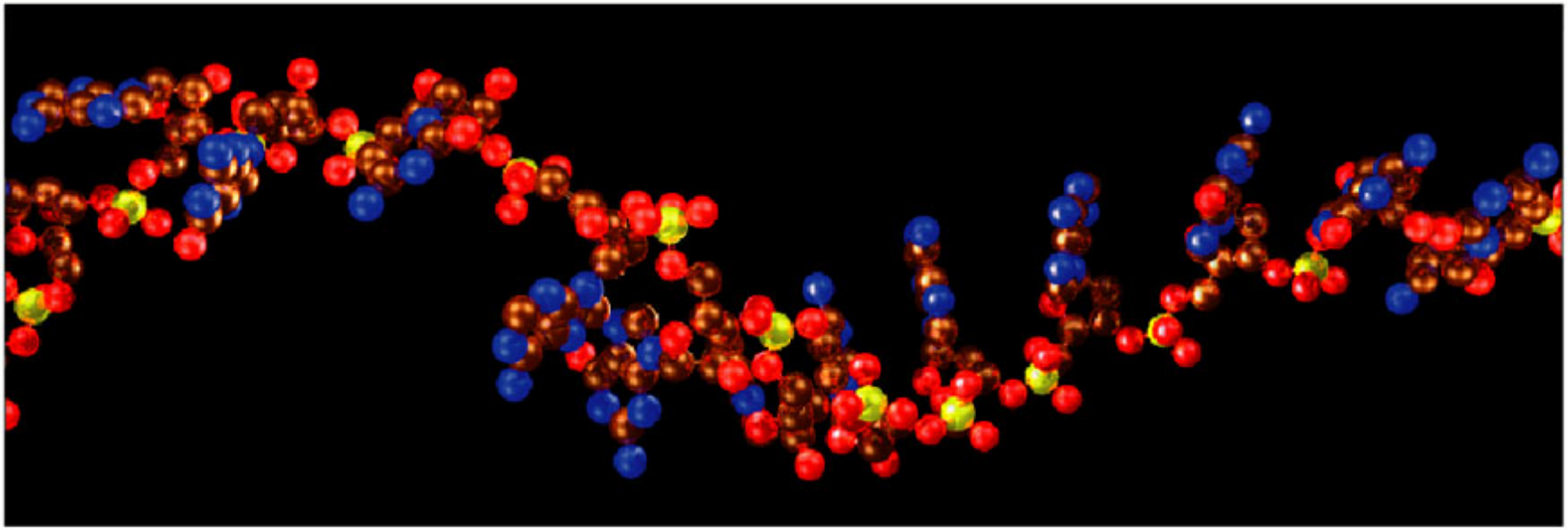
GWAS


a
-log10(P value)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X
chr5 (p14.1)
15.2
q11.2
q14.3
15
23.1
32
5q34
b
chr5:
2450000
2500000
2550000
2600000
2650000
2700000
RefSeq genes
CDH10
CDH9
PhastCons conserved elements, 28-way vertebrate multiz alignment
PhastCons vertebrate conserved elements, 28-way multiz alignment
LOD=998
LOD=1,331
LOD=3,480
LOD=1,023
LOD=1,134
LOD=1,319
LOD=1,071
c
-log10(P value)
Recombination rate (cM Mb⁻¹)
CDH10
CDH9
24,500,000
25,000,000
25,500,000
26,000,000
26,500,000
27,000,000

GWAS en endometriosis

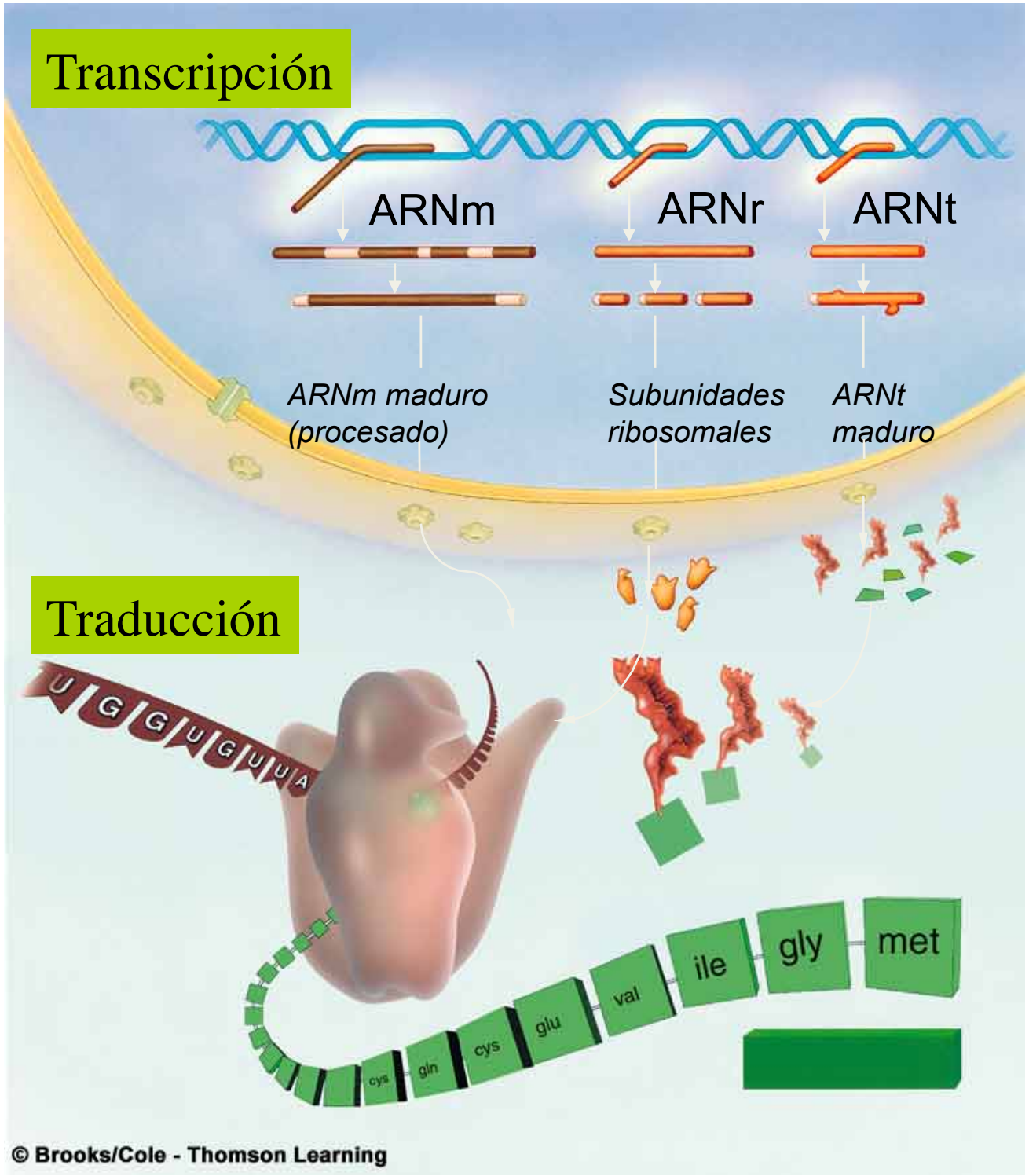
Gene	Symbol	OR	p
Transducin β-like 2	*TBL2*		$3{,}09 \times 10^{-7}$
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA	*CDKN2BAS*	1,56	$6{,}79 \times 10^{-6}$
Interleukin-1α	*IL1A*	1,52	$1{,}4 \times 10^{-6}$
Cytochrome P450 2C19	*CYP2C19*	1,25	$6{,}4 \times 10^{-5}$

(Painter et al. 2012 and 2014)

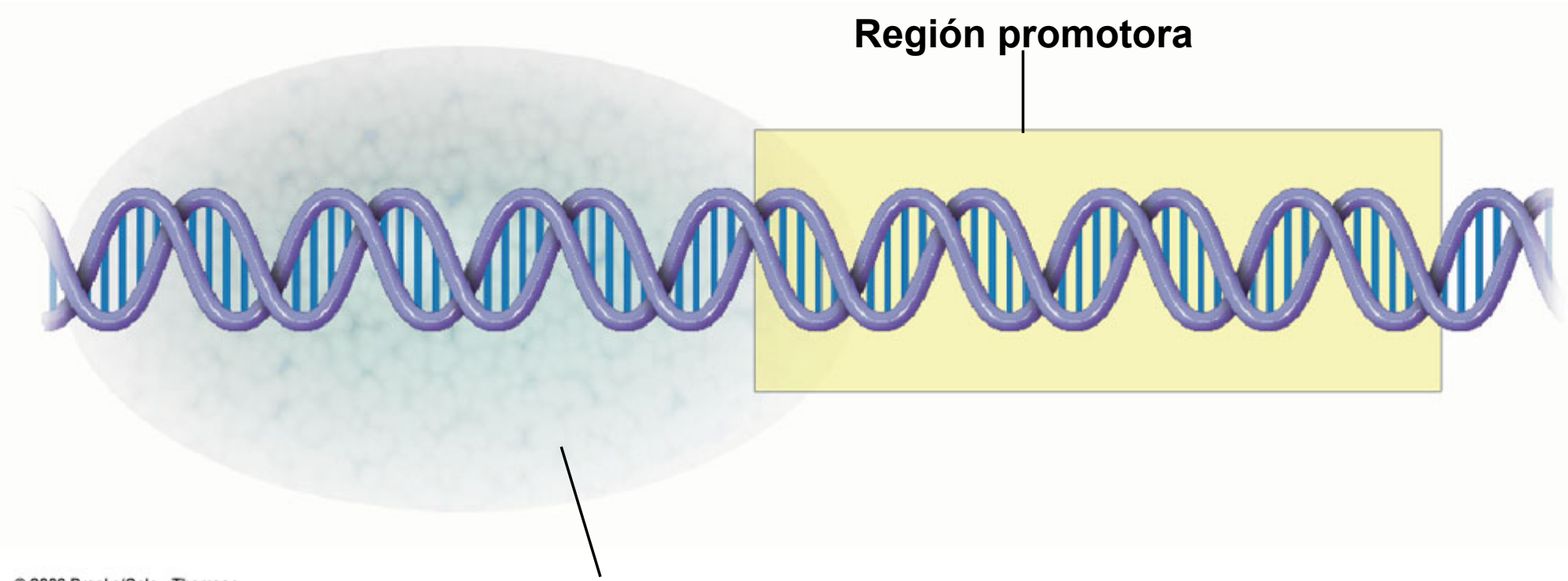


© 2006 Brooks/Cole - Thomson

En un extremo de la región del gen, la última cadena del nuevo transcrito se desenrolla y se libera del ADN molde. Abajo se muestra un modelo para un filamento transcrito ARN

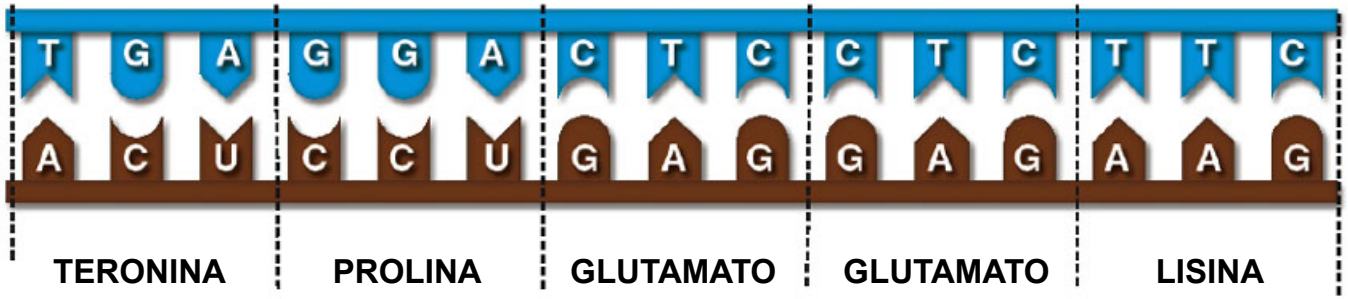

Transcripción
ARNm
ARNr
ARNt
ARNm maduro (procesado)
Subunidades ribosomales
ARNt maduro
Traducción
U G G U G U U A
met
gly
ile
val
glu
cys
gln
cys
© Brooks/Cole - Thomson Learning

Promotor



La ARN polimerasa inicia la transcripción en la región del promotor en el ADN. Esta reconoce una secuencia de bases localizada cerca de la región del promotor que sirve como molde. Este puede unirse a los nucleótidos de adenina, citosina, guanina y uracilo en la cadena del ARN, en el orden especificado por el ADN.

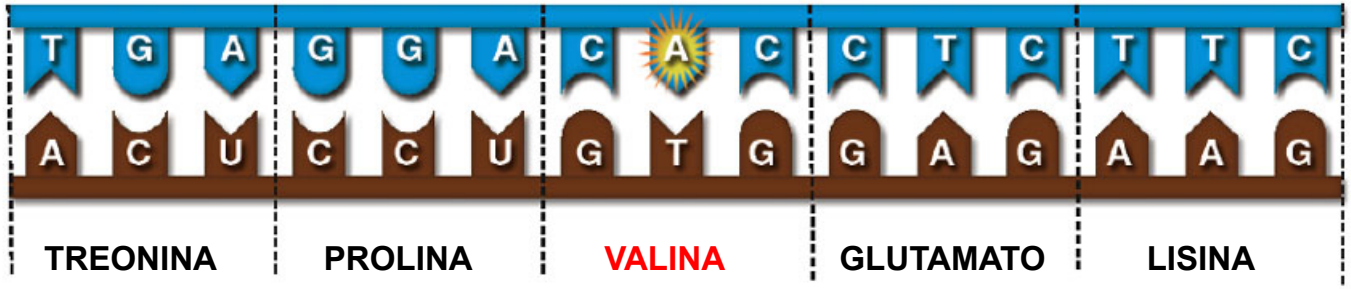
Mutaciones de cambio de encuadre



Parte del molde de ADN

ARNm transcrito a partir del ADN

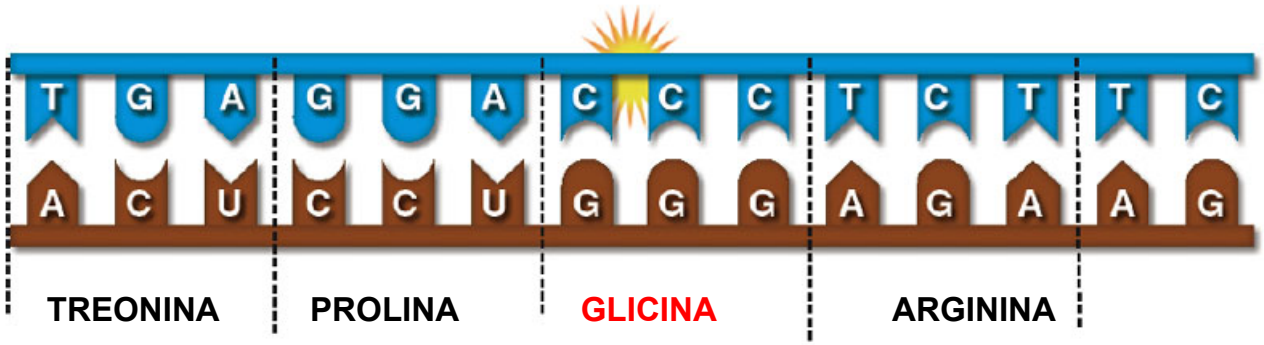
Sequencia de amino ácidos resultante



Base sustituida en el ADN

ARNm alterado

Secuencia de amino ácidos alterada



Deleción en el ADN

ARNm alterado

Sequencia de amino ácidos alterada

© 2006 Brooks/Cole - Thomson

© 2006 Brooks/Cole - Thomson

Neurofibromatosis (tumores blandos); enfermedad autosómica dominante

Gen *WNT4* (chr. 1p36)

- GWAS con asociación significativa con *locus* (Uno et al. 2010)
- Confirmado (Painter et al. 2012; Luong et al. 2013)
- Meta-análisis: $p=4,2x10^{-8}$, OR=1,19
- Desarrollo del tracto reproductivo femenino, folículos ováricos y esteroidogénesis

Variants	Location (Hg19)	Role	*P* value	OR
rs61768001	22465820	Intron 1-2	2.002×10^{-4}	1.38 (1.16-1.63)
rs12037376	22462111	Intron 1-2	2.735×10^{-4}	1.37 (1.15-1.61)
rs56318008	22470407	Promoter	3.860×10^{-4}	1.36 (1.15-1.62)
rs55938609	22470451	Promoter	4.730×10^{-4}	1.36 (1.14-1.61)
rs7412010	22436446	3' near gene	7.696×10^{-4}	1.33 (1.13-1.57)
rs7521902	22490724	Genomic	0.067	1.15 (0.99-1.33)

*MAF estimate from HapMap CEU population (HapMap data rele000 Genomes.

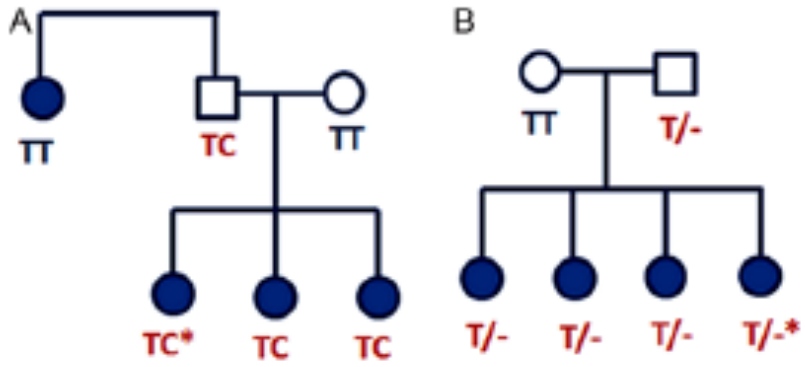
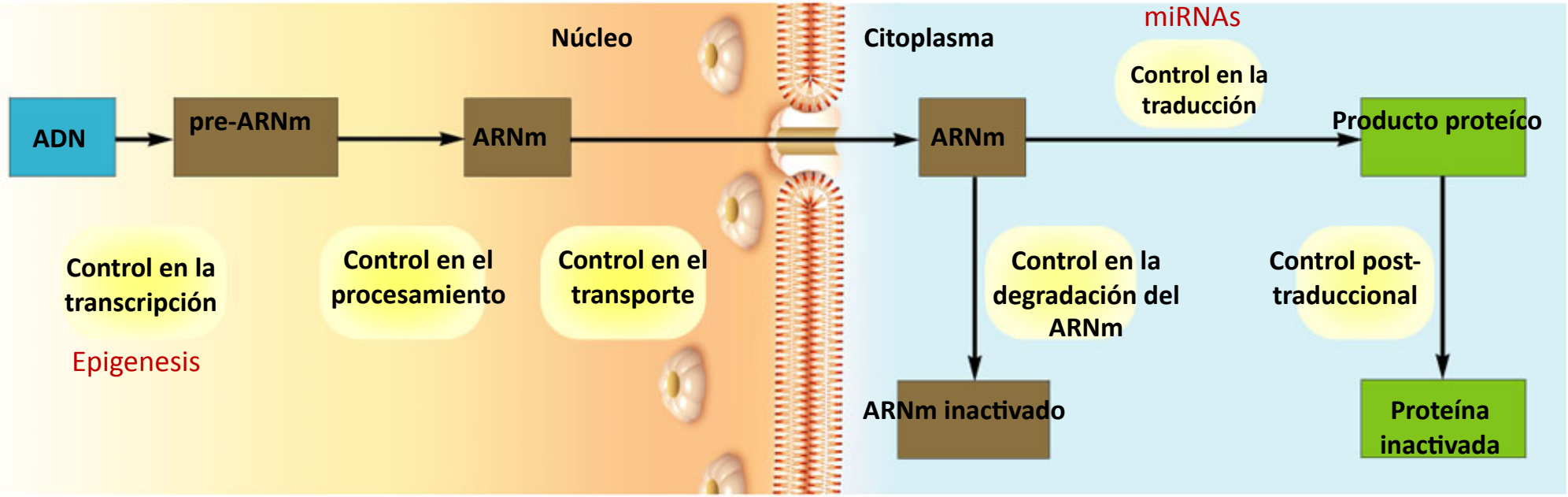


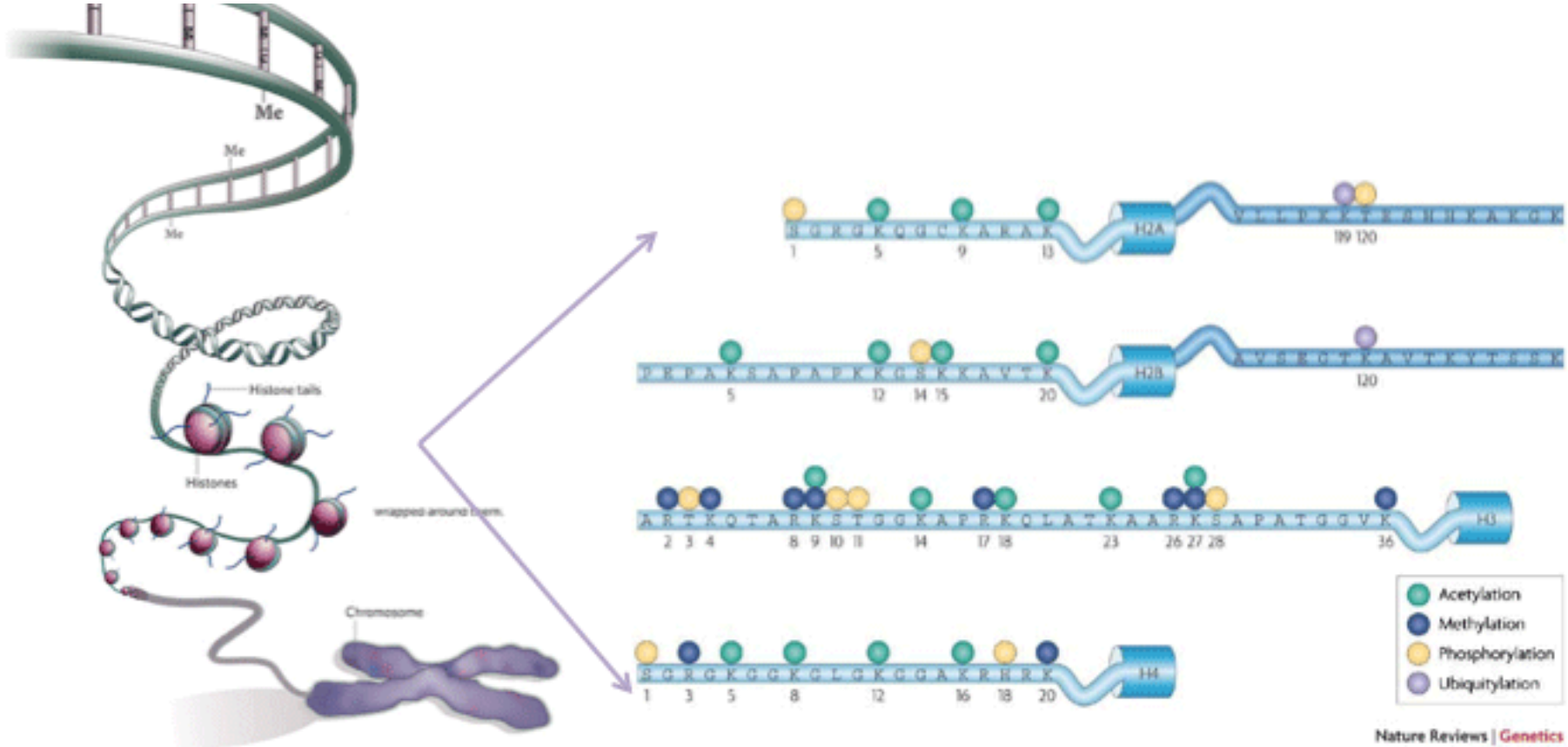
Figure 1. Pedigrees of endometriosis cases carrying novel variants in the *WNT4* gene: (A) Pedigree of the endometriosis family with a novel non-synonymous variant in exon 2 (p.Tyr80His) and (B) Pedigree of an endometriosis family with a novel insertion/deletion variant in 3'UTR (in-del T). The proband individual screened by HRM is marked with an asterisk.

Control de la expresión génica



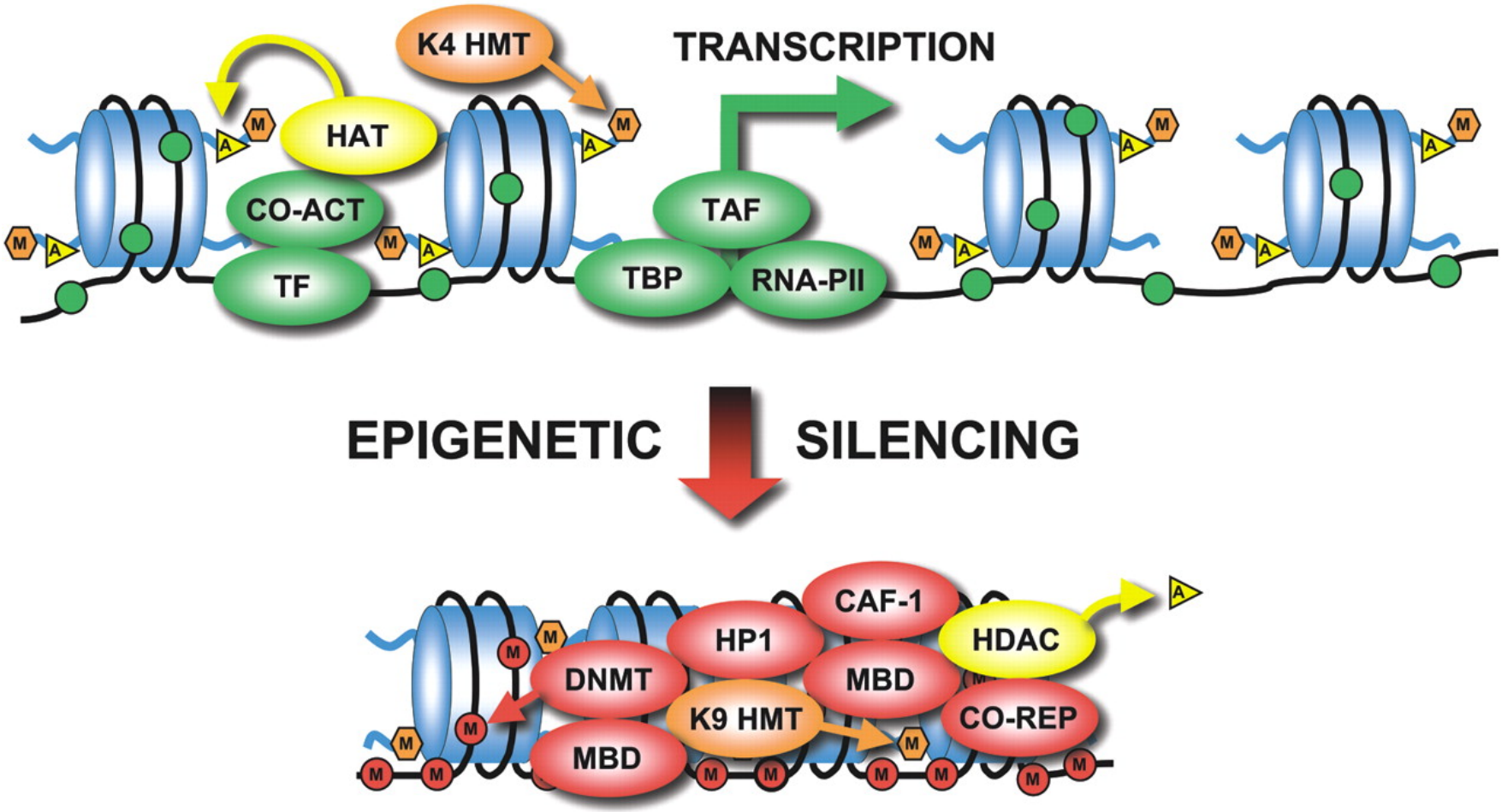
© 2006 Brooks/Cole - Thomson

Epigénesis

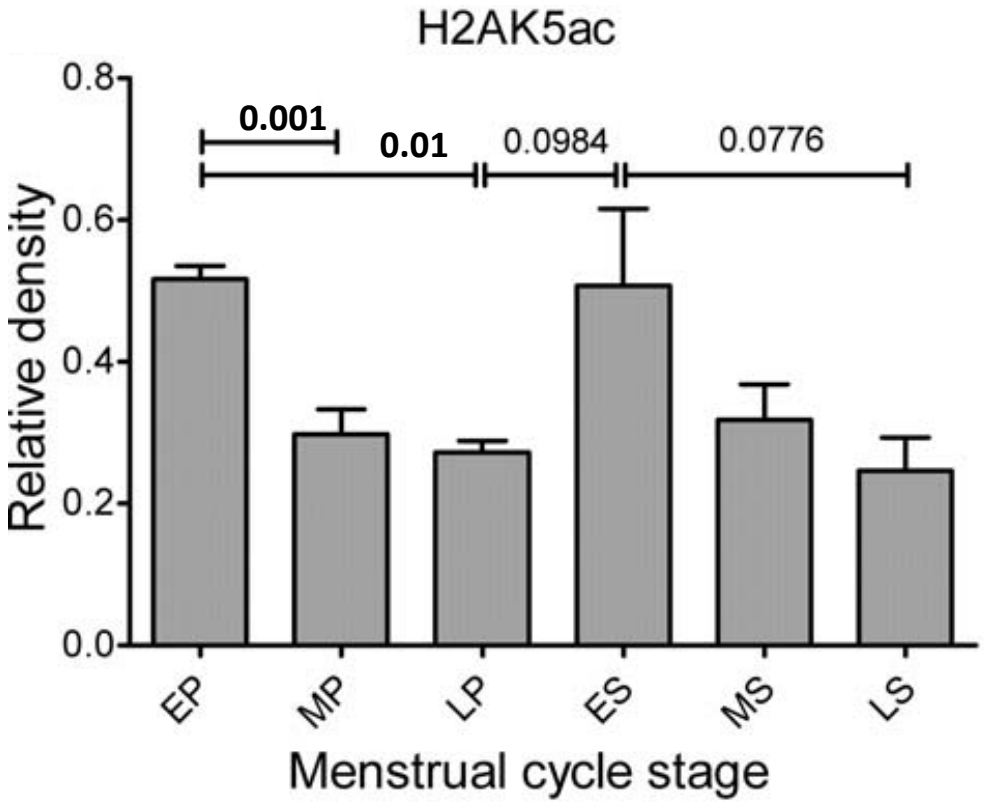


Look: http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/intro/

Epigénesis


K4 HMT
TRANSCRIPTION
HAT
CO-ACT
TF
TAF
TBP
RNA-PII
M
A
EPIGENETIC
SILENCING
CAF-1
HP1
HDAC
DNMT
MBD
K9 HMT
CO-REP
MBD

Acetilación de histonas H2A



Endometrial global histone acetylation, as determined by western blotting, changed throughout the menstrual cycle and correlated well with expected transcription activity during the different phases (Munro et al. 2010)

Dinámica de metilación

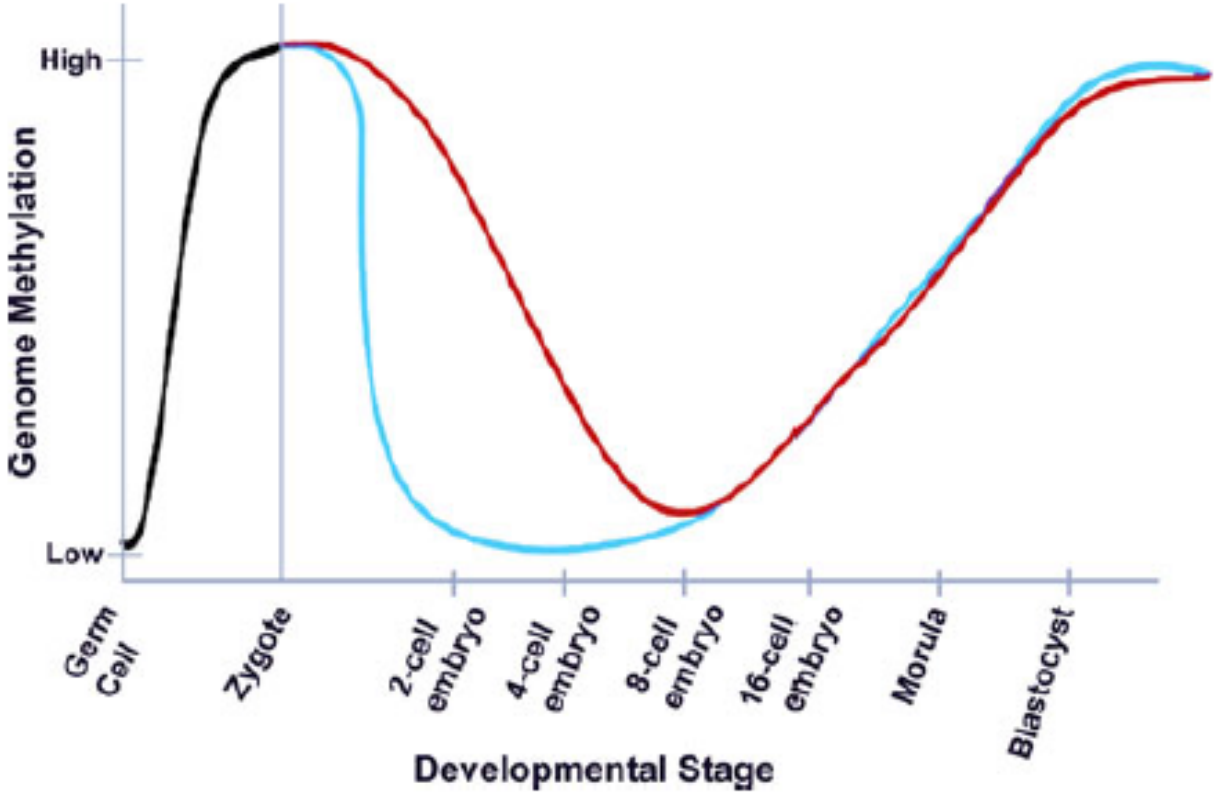


Fig. 4 Methylation dynamics during mammalian folliculogenesis and early mammalian embryo development (*blue* paternal genome, *red* maternal genome) adapted from Reik W. et al., 2001

Epigénesis de endometriosis

- Muchos genes alteran su expresión en endometriosis (Pelch et al. 2010)
- Una lesión endometriósica tiene origen monoclonal (Wu et al. 2003)
- De una sola célula madre hasta la lesión endometriósica y a la diversidad de síntomas de la enfermedad, se sugieren diversas elecciones celulares que se toman sin cambios en la secuencia de ADN (Guo 2012)
- Iniciación y progreso de la enfermedad ocurre por la acumulación de disregulaciones patológicas de genes

Efectos del ambiente en la herencia

Source: http://www.specialneedsdigest.com/2013/08/epigenetics-how-early-life-environment.html

Epigenesis on endometriosis

Ambiente

Patrón de metilación

Modo de herencia

Cambios de respuesta a las hormonas

Cambios de la respuesta inmune

La relativa permanencia de la metilación puede explicar los fallos de las terapias a la infertilidad relacionada con la endometriosis

Aberraciones epigenéticas en endometriosis

En mujeres afectadas:

- HOXA10: factor de transcripción involucrado en el desarrollo endometrial e implantación, promotor hipermetilado (Wu et al. 2005)
- PR-B: receptor de la progesterona, promotor hipermetilado (Wu et al. 2006)
- Metiltransferasas involucradas en metilación de DNA, sobreexpresadas (Wu et al. 2007)

Aberraciones epigenéticas en endometriosis

En mujeres afectadas:

- Steroidogenic factor-1: factor de transcripción de genes involucrados en la síntesis de estrógenos; promotor hipometilado en células endometrióticas (Xue et al. 2007)
- ERβ: promotor hipometilado en células endometrióticas (Xue et al. 2007)
- Aromatasa (síntesis de estrógenos): hipometilada en endometrio ectópico (Izawa et al. 2011)

Aberraciones epigenéticas en endometriosis

- Células endometriósicas carecen de la proteína E-cadherina, de adhesión intercelular, supresora de metástasis (hipermetilada en células endometriósicas) (Starzinski-Powitz et al. 2001)
- Tratamiento con TSA resultó en expresión y disminución de la invasión (Wu et al. 2007)
- Desacetilasas de histonas se sobre-expresan en tejido endometriósico (Colón-Díaz et al. 2012)

Estudios de epigenética de endometriosis

Gene	Muestra	Tejido en mujeres afectadas	Metilación (en afectadas)	Metilación (controles) en endometrio	p	Referencia
HOXA10	11/11	Endometrial (eutópico)	13,9% SD=2,5	9,7% SD=2,9	0,002	Fambrini et al, 2010
HOXA10	17/15	Endometrial (eutópico)	82%	27%	0,006	Szczepanska et al. 2010
ESR2	8/8	Endometrial (ectópico)	12,69%	54,25%	0,0001	Xue et al. 2013
PR-B	8/9	Endometrial (ectópico)	66% con hipermetilación	0% con hipermetilación	0,05	Nie et al. 2010
PR-B	12/4	Ectopico y eutópico	6/8 and 2/5	0/4	N.S.	Wu et al. 2006

Propuesta de investigación

- Cuáles de estos factores interaccionan para originar endometriosis?
- Metilación de los promotores de *PR-B*, *ER-β*, *HOXA10*, *IL1R2* and *NME1* genes
- Datos sociodemográficos, historia familiar de endometriosis, comportamiento sexual, anticonceptivos, ejercicio, factores nutricionales, medicamentos, otras enfermedades, etc.

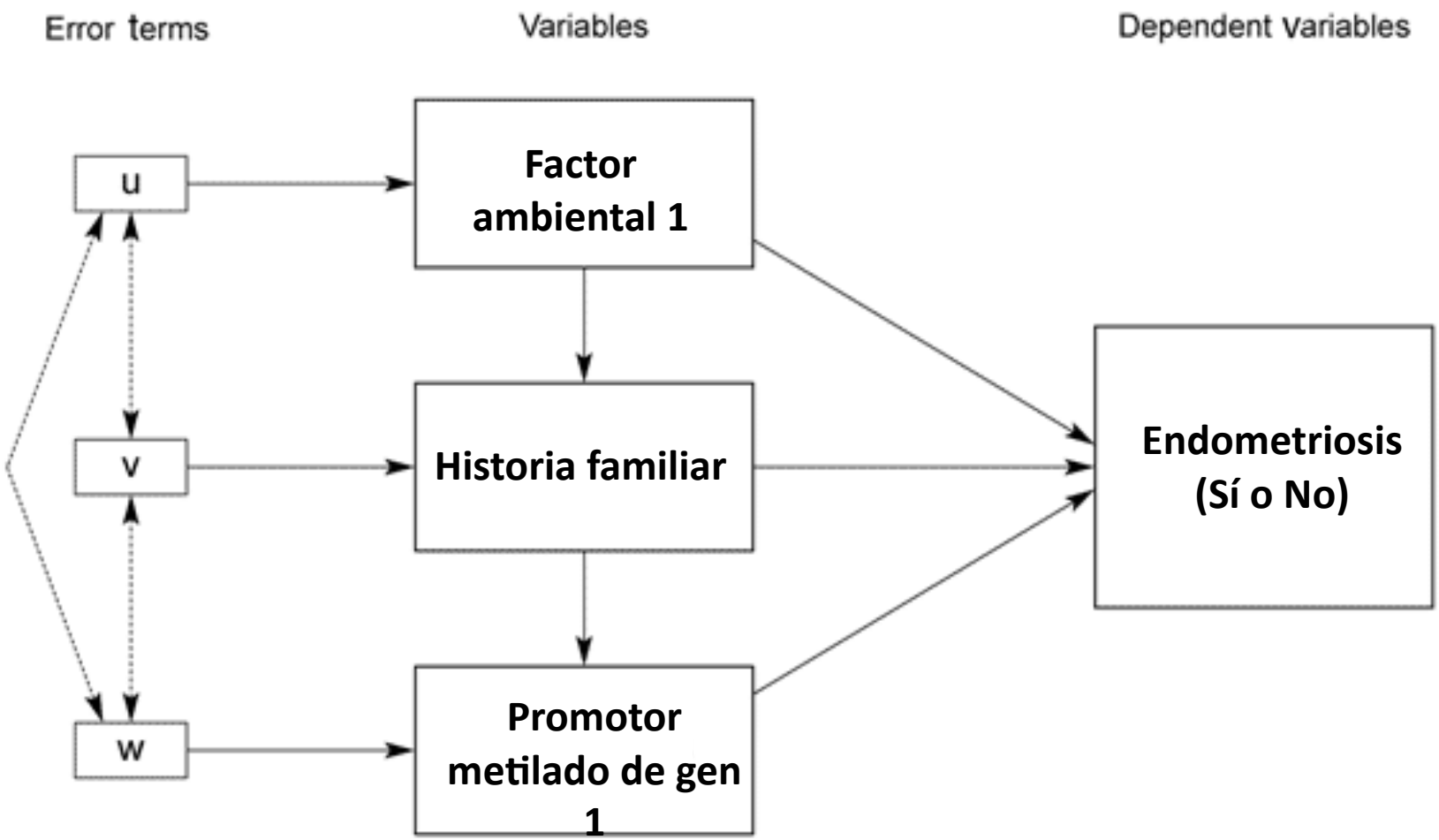
Metodología

1. Mujeres que van a tener una laparoscopía en P+4 a P+10
2. Consentimiento informado
3. Examen físico y ginecológico, US
4. Dx de endometriosis y clasificación
5. Biopsia de: tejido endometrial eutópico y ectópico en mujeres afectadas; endometrio en controles
6. Acceso a expediente médico. Cuestionario de factores familiares y ambientales

Metodología

7. Aislar ADN de biópsias
8. Determinación de grado de metilación de los genes a través de *Real Time PCR* y *High Resoultion Melting Sofware*
9. Análisis estadístico: regresión logística

Regresión logística con endogeneidad



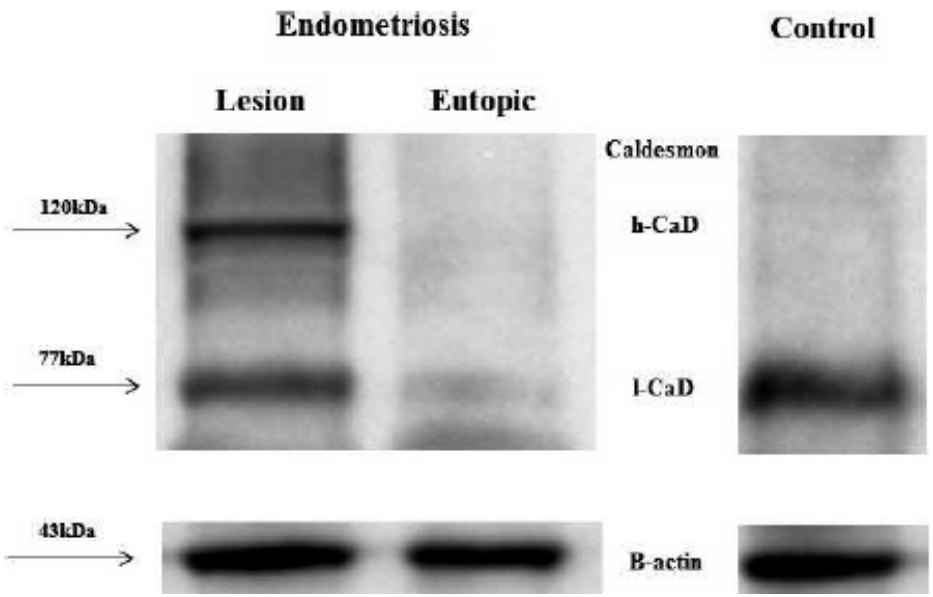
Futuro

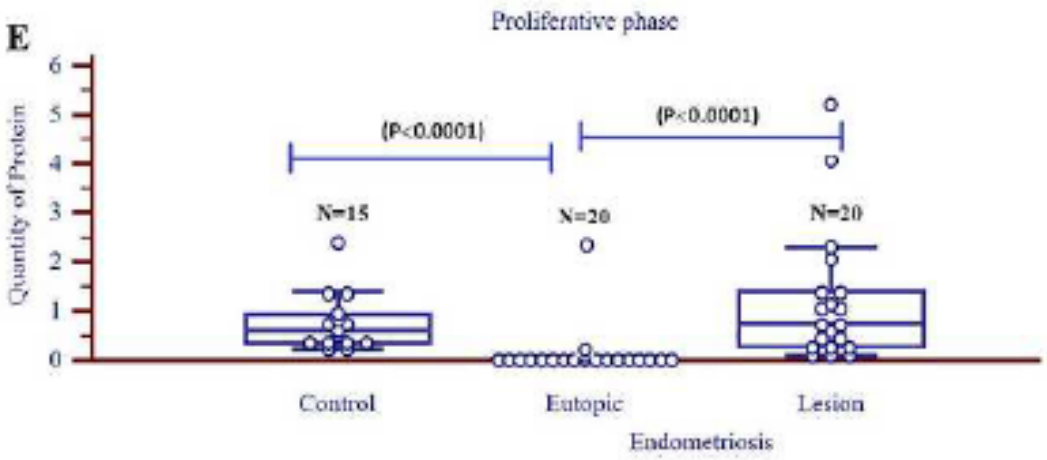
- Usar estos datos para estudios de prevención, diagnosis y tratamiento de endometriosis

Consecuencias en el Dx de endometriosis

- Sangre menstrual contiene ADN con el mismo perfil de metilación que las células endometriales
- Material útil, abundante y no invasivo para tests
- Hipermetilación de ERβ en mujeres con endometriosis es menor que en controles (Shen et al, unpublished data)

Proteína Caldesmon para el Dx de endometriosis





The presence of caldesmon in the endometrium of patients with and without endometriosis permitted diagnoses with 95% sensitivity (specificity 100%) and 100% sensitivity (specificity 100%) for the disease and for minimal to mild endometriosis in the proliferative phase of the menstrual cycle (Meola et al. 2013)

Consecuencias terapéuticas

- Metilación de ADN es reversible con HDACIs
- TSA en líneas celulares estromales endometriales disminuyen proliferación (Wu & Guo, 2006), reprimen implates ectópicos en modelos animales de endometriosis (Lebovic et al. 2007), disminuye invasión y reactiva expresión de E-cadherina (Wu et al. 2007)
- TSA y ADC suprime progresión de células estromales endometriales ectópicas (Nie et al. 2010)
- VPA fue probado en 3 pacientes los síntomas de dolor se redujeron (Liu & Guo, 2008)

Efectos de la nutrición en metilación

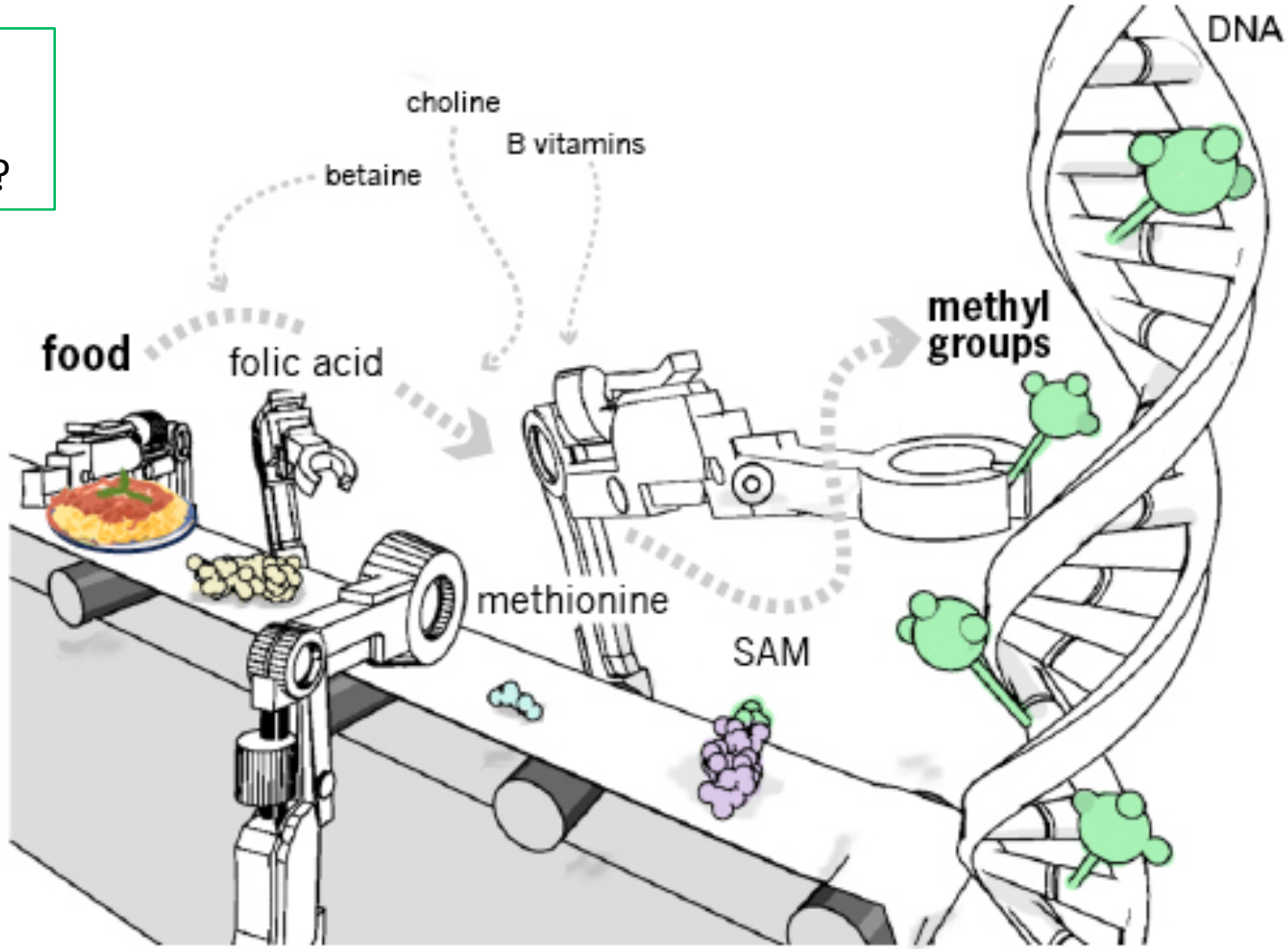
Prevención y Tratamiento de Endometriosis ?

Omega 3 ↑

A. Grasos insaturados↑

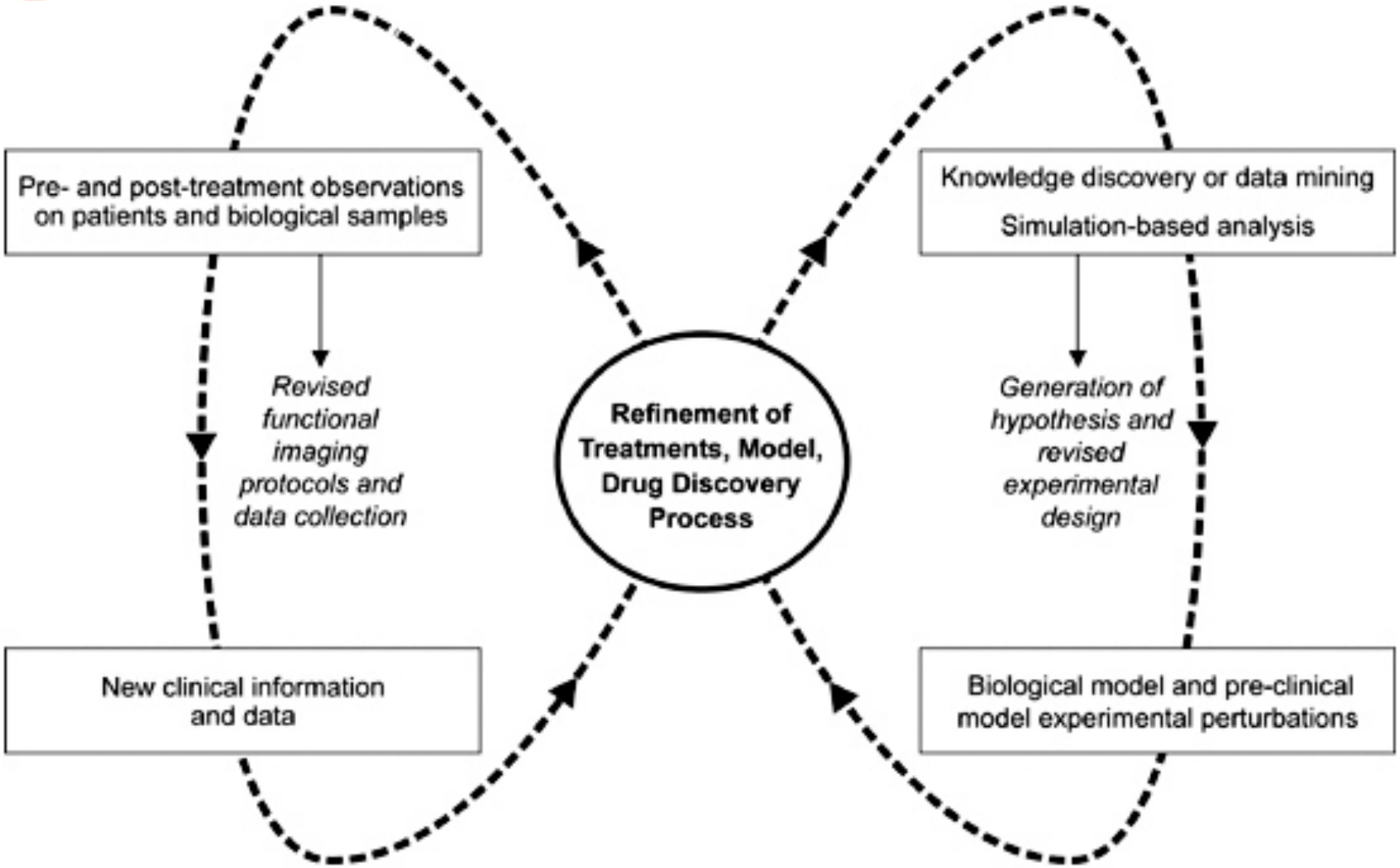
A. Grasos trans ↓

A. Graso palmítico ↓



Source: http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/

Medicina translacional



Medicina personalizada

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

תודה
Dankie
Gracias
Спасибо
شكراً
Merci
Takk
Köszönjük
Terima kasih
Grazie
Dziękujemy
Dėkojame
Ďakujeme
Vielen Dank
Paldies
Kiitos
Täname teid
谢谢
Thank You
Tak
感謝您
Obrigado
Teşekkür Ederiz
감사합니다
Σας ευχαριστούμε
ขอบคุณ
Bedankt
Děkujeme vám
ありがとうございます
Tack