El epigenoma circulante

[The circulating epigenome]

José Darío Martínez-Ezquerro §

§ Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud, Área Envejecimiento (UIESS-AE), Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Ciudad de México, Distrito Federal, México

Av. Cuauhtémoc 330, Col Doctores, Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México, Distrito Federal, México, CP 06720

jdme@ciencias.unam.mx

Resumen

Desde el descubrimiento de los ácidos nucleicos en circulación sanguínea humana por Mandel y Métais en 1948, se ha demostrado la presencia del ADN y ARN circulantes (ANcir) en los distintos fluidos corporales tanto de plantas como animales. En humanos, esta presencia extracelular de ácidos nucleicos ocurre en personas sanas o con distintas condiciones clínicas.

Por otro lado, la epigenética hace referencia tanto a los cambios heredables en la actividad y expresión génica (en la progenie de células o individuos), así como a las alteraciones estables de largo plazo en el potencial transcripcional de una célula que no necesariamente son heredables. Mientras tanto, el estudio del epigenoma implica la descripción completa de las modificaciones químicas tanto del DNA como de las histonas a lo largo del genoma, así como a los transcritos no codificantes (ncRNA), los cuales conforman una red de regulación que modula la estructura de la cromatina y la función del genoma, generando patrones de expresión particulares a cada tipo celular, mecanismo mediante el cual los genes establecen sus efectos fenotípicos involucrando interacciones adaptativas con el ambiente. El epigenoma circulante se observa mediante el análisis en los fluidos corporales de las modificaciones al DNA e histonas, así como de los ncRNA, que de manera individual o conjunta participan en la regulación de la expresión de transcritos, tanto codificantes como no codificantes.

En este capítulo se sintetiza el conocimiento de los ANcir en distintas condiciones clínicas y del epigenoma circulante, incluyendo diversos abordajes de su investigación en condiciones complejas: cáncer, embarazo, trasplante de órganos, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas, entre otras.

Además, se presenta por primera vez el concepto del exoepigenoma: el estudio del efecto regulatorio de los ácidos nucleicos y proteínas exógenas sobre la expresión de genes blancos ajenos, como un mecanismo de comunicación celular sistémico e inter-organísmico. La función y biología de este mecanismo de regulación exoepigenómico requieren de mayor estudio, en particular, para el abordaje de condiciones normales y patológicas desde una perspectiva ecológico-evolutiva compleja.

Palabras clave

Ácidos nucleicos circulantes; ADN; ARN; epigenética; epigenoma; exoepigenoma

Abstract

Since the discovery of nucleic acids in human blood circulation by Mandel and Métais in 1948, the presence of circulating DNA and RNA (CNAs) in body fluids of both plants and animals has been demonstrated. In humans, this extracellular presence of nucleic acids occurs in healthy people and in those with clinical conditions.

On the other hand, epigenetics refers to both heritable changes in gene activity and expression (in the progeny of cells or individuals), as well as long-term stable alterations in the transcriptional potential of a cell that are not necessarily heritable. Meanwhile, the study of the epigenome involves the complete description of the chemical modifications of both DNA and histones throughout the genome, as well as non-coding transcripts (ncRNA), which form a regulatory network that modulates chromatin structure and genome function, generating expression patterns particular to each cell type, a mechanism by which genes establish their phenotypic effects involving adaptive

interactions with the environment. The circulating epigenome is observed through the analysis in body fluids of modifications to DNA and histones, as well as ncRNA, which individually or jointly participate in the regulation of transcriptional expression, both coding and non-coding.

This chapter synthesizes the knowledge of CNAs in different clinical conditions and of the circulating epigenome, including various research approaches in complex conditions: cancer, pregnancy, organ transplantation, neurodegenerative disorders, cardiovascular diseases, and metabolic diseases, among others.

In addition, the concept of the exoepigenome is presented for the first time, which refers to the study of the regulatory role of exogenous nucleic acids and proteins on the expression of foreign target genes, as a systemic and inter-organismic cellular communication mechanism. The function and biology of this exoepigenomic regulatory mechanism require further study, particularly, to address normal and pathological conditions from a complex ecological-evolutionary perspective.

Keywords

Circulating nucleic acids; DNA; RNA; epigenetics; epigenome; exoepigenome

Introducción

La epigenética es un término acuñado a principios de la década del cuarenta del siglo XX para describir el mecanismo por el cual los genes establecen sus efectos fenotípicos, involucrando interacciones adaptativas con el ambiente, en particular en organismos multicelulares que desarrollan distintos tejidos a partir de un mismo genoma. Actualmente y de manera general, se refiere a los cambios heredables en el ADN e histonas que modifican la estructura y condensación de la cromatina, afectando tanto a la expresión génica como al fenotipo, pero sin alterar la secuencia de nucleótidos. El epigenoma refiere al conjunto de cambios epigenéticos a lo largo de todo el genoma.

En este capítulo se abordará el tema del epigenoma circulante, un campo de estudio reciente cuyo potencial clínico es amplio y prometedor. Antes de entrar en el campo del epigenoma circulante, es necesario hablar del origen de esta línea de investigación. Los estudios tanto del genoma como del transcriptoma circulantes anteceden la investigación sobre el epigenoma circulante. Por ello, una parte sustancial de este capítulo tratará sobre los aspectos generales y algunas aplicaciones de los ácidos nucleicos circulantes. Posteriormente, se inicia con el epigenoma circulante, ejemplificando su potencial clínico en distintas patologías. Finalmente, se presenta una propuesta para integrar los estudios que involucran a los mecanismos de regulación epigenética incluyendo aquellos de origen endógeno, así como los provenientes de fuentes exógenas.

Los ácidos nucleicos circulantes (ANcir)

Diversos escenarios clínicos incluyendo el cáncer, enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico; infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales, como la tuberculosis, aspergilosis, tripanosomiasis y la hepatitis, respectivamente; el embolismo pulmonar, así como condiciones tan distintas como el infarto, el embarazo y los trasplantes, aparentemente no comparten ninguna característica. Sin embargo, una manifestación común que comparten quienes presentan estas condiciones junto con las personas sin enfermedad aparente, es la presencia de

ácidos nucleicos circulantes (ANcir), tanto de ácido desoxirribonucleico (ADN) como ribonucleico (ARN) fuera de sus células, circulando libremente en su sangre.

La existencia tanto del ADN como ARN libres en la circulación sanguínea tanto de personas sanas como de personas con distintas enfermedades fue reportada por primera vez por Mandel y Métais en 1948, sólo cuatro años después de la demostración de que el ADN es el material de la herencia por parte de Avery, MacLeod y McCarty y cinco años antes de que Rosalind Franklin publicara la estructura del ADN mediante fotografías de difracción de rayos X a partir de la cual Watson y Crick modelaron la estructura de doble hélice del ADN. Sin embargo, no es sino hasta finales de 1960 cuando tras haber sido relegados, los ácidos nucleicos circulantes (ANcir) son redescubiertos en suero y plasma al estudiar pacientes con lupus eritematoso sistémico y personas sin la enfermedad.

A partir de ese momento, se ha demostrado la presencia del ADN y ARN circulantes (ANcir) tanto en plantas como en animales. En las plantas, los ácidos nucleicos extracelulares se movilizan tanto en el xilema y floema como en plasmodesmos. En animales, los ANcir pueden detectarse en distintos fluidos corporales como sangre (suero y plasma), saliva, orina, leche materna, fluido amniótico, pleural, sinovial, broncoalveolar, cerebroespinal, entre otros. Esta presencia extracelular de ácidos nucleicos ocurre en personas sanas, mujeres embarazadas, personas con trauma o que han recibido trasplantes de órganos, así como en personas con distintas enfermedades: inflamación, infección, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria severa, embolismo pulmonar, enfermedades autoinmunes, cáncer, por mencionar algunas.

Actualmente, existe un interés global para desarrollar la tecnología de los ANcir como método de detección, diagnóstico, pronóstico y monitoreo de una gran diversidad de condiciones de importancia clínica, principalmente a partir de plasma y suero sanguíneos, gracias a que son líquidos fácilmente accesibles que pueden obtenerse mediante un método poco invasivo y de forma recurrente.

El genoma circulante

El genoma circulante se refiere al conjunto de secuencias de ADN extracelular que pueden detectarse en distintos fluidos corporales. Por lo general, la longitud de los fragmentos de ADN circulante varía de 500 a 21 mil pares de bases, propagándose por todo el organismo en distintas conformaciones: (1) en la forma de mono y oligonucleosomas, asociado a histonas; (2) como ADN de cadena sencilla y ADN de doble cadena; (3) dentro de vesículas con membrana: exosomas, i-somas, cuerpos apoptóticos; (4) asociado a distintas partículas: glicoproteínas, ARN, liposomas, proteínas como la polimerasa del ADN y p53, entre otras.

El origen del genoma circulante corresponde principalmente a células normales con núcleo, bacterias y virus, mitocondrias, ingesta alimentaria, así como células tumorales. Otras fuentes humanas como la terapia génica y la vacunación con ADN también pueden producir ADN circulante.

Dentro de los mecanismos conocidos para la liberación del ADN circulante se encuentran: la muerte celular (apoptosis y necrosis), lisis de células circulantes, liberación activa y espontánea —observada en distintos tejidos en cultivo y dependiente de un mecanismo homeostático—, así como la liberación por estimulación con mitógenos o antígenos y la enucleación de eritrocitos.

El transcriptoma circulante

El transcriptoma circulante se refiere al conjunto de transcritos extracelulares, tanto codificantes (ARNm) como no codificantes (ncRNA, por sus siglas en inglés), que circula libremente en la sangre y otros fluidos corporales de personas sanas o con distintas condiciones clínicas. La longitud dominante del ARN circulante detectable en exosomas —vesículas de membrana de 30–100 nm secretadas por la mayoría de los tipos celulares— es de 18–28 nucleótidos, mientras que el ARN liberado por las células al medio de cultivo en su mayoría es de ~70 nucleótidos. Una gran cantidad del ARN circulante proviene de fuentes endógenas; sin embargo, también existen aportaciones de diversas fuentes exógenas, incluyendo bacterias, hongos, insectos y alimentos. A

pesar de que se encuentra altamente fragmentado, el ARN endógeno puede mantenerse estable en la circulación sanguínea al menos por 3 horas, a diferencia del ARN exógeno que al ser agregado al suero/plasma sanguíneo es inmediatamente degradado. Parte de la estabilidad del ARN endógeno en la circulación sanguínea, a pesar de ubicarse en un ambiente con altas concentraciones de ribonucleasa (RNasa) —un tipo de nucleasas que catalizan la despolimerización del ARN—, es atribuible a distintas conformaciones: (1) su hibridación con ADN (complejos ADN-ARN), (2) formación de complejos lipídicos o lipoproteicos, y (3) su retención dentro de vesículas lipoproteicas como cuerpos apoptóticos —que pueden ser secretados o liberados durante la muerte celular. Aparentemente, más del 95% del ARN en suero se encuentra en la forma de complejo proteico o lipídico mayor a 0.2 μm , probablemente retenido dentro de vesículas y cuerpos apoptóticos. En estos casos, el ARN estaría protegido de la degradación enzimática, permitiendo su estabilidad e integridad, facilitando así su posible detección diferencial que podría ser utilizada como biomarcador sistémico en el abordaje clínico de diversas condiciones de salud.

La caracterización por secuenciación profunda (*deep sequencing*) o RNA-Seq de transcritos de ARN circulantes en plasma sanguíneo, en particular de aquellos retenidos dentro de exosomas, corresponde en su mayoría a fragmentos de ARNm, ARNr, ARNt, snRNA, snoRNA, lncRNA, miRNA, piRNA, 5'- y 3'-UTRs. Se ha observado que los transcritos más abundantes con poco más del 40% de representación son los micro ARNs (miRNAs, por sus siglas en inglés), de los cuales miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p y miR-99b-5p representan casi la mitad de miRNAs circulando en exosomas. La predicción de 1,205 genes blanco para estos miRNAs —abundantes en exosomas— y su significativo enriquecimiento en los términos de ontología de genes (*GO terms*) indican su posible participación en la regulación de diversos procesos: fosforilación de proteínas, corte y empalme del ARN, reordenamiento cromosómico, desarrollo de la vasculatura (angiogénesis), así como en la vía de señalización de neurotrofinas.

Aspectos generales de los ácidos nucleicos circulantes

Respecto al origen de los ácidos nucleicos circulantes (ANcir), diversas investigaciones sugieren la existencia de un mecanismo de regulación en el que las células pueden detectar ANcir del microambiente y, de requerirlo, expulsar ANcir de forma independiente de los efectos mecánicos o la muerte celular. El papel biológico de la detección y liberación de los ANcir bajo una regulación homeostática aún se desconoce.

Con respecto a la estabilidad y permanencia de los ANcir en fluidos corporales ante los sistemas de depuración corporal en condiciones normales, se ha observado que el resguardo generado por las distintas conformaciones en las que transitan los ANcir, probablemente contribuye a protegerlos de la acción de las nucleasas y de su fagocitosis por macrófagos, células vecinas y eritrocitos. En condiciones patológicas como lupus eritematoso sistémico y cáncer, se ha reportado que tanto la actividad de las nucleasas como la capacidad fagocítica de macrófagos y eritrocitos se encuentra disminuida. Esto explicaría, junto con la saturación del sistema de depuración, parte del incremento de ANcir en distintas enfermedades.

Otro elemento relacionado con el aumento de ANcir en circulación es el incremento de la reproducción celular como ocurre en el embarazo, lesiones, inflamación y cáncer. Se han reportado aumentos significativos de ANcir en personas con distintas condiciones patológicas: inflamación, infección, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria severa, embolismo pulmonar, enfermedades autoinmunes y cáncer, en comparación con los niveles que presentan las personas sanas. En particular, en pacientes con cáncer se han observado aumentos considerables de ácidos nucleicos circulantes en comparación con los niveles observados en las personas sanas. A su vez, estos incrementos son mayores cuando la persona presenta metástasis. Además, los ANcir también permiten determinar su procedencia como en el caso de los ANcir fetales en la sangre materna, al igual que del órgano trasplantado en la sangre de personas que han recibido un trasplante. Por lo tanto, las diferencias o alteraciones en la concentración de ANcir pueden utilizarse clínicamente ya que proveen información de diferencias o alteraciones en su concentración en fluidos corporales, por lo que podrían servir como biomarcador de alerta ante una posible condición patológica que involucre proliferación o muerte

celular endógena o exógena. Otras fuentes exógenas de ANcir detectables en fluidos corporales son las infecciones bacterianas, fúngicas y virales, así como la ingesta alimentaria.

Independientemente de la condición clínica, diversas alteraciones moleculares pueden ser detectadas en los ANcir: mutaciones en oncogenes, mutaciones en genes supresores de tumores, reordenamientos cromosómicos, alteraciones de microsatélites, mutaciones de ADN mitocondrial (ADNmt), hipermetilación de promotores, entre otras. Utilizando este tipo de marcadores se puede determinar la procedencia de los ANcir, por ejemplo, de tejido propio o trasplantado, ANcir fetales, virales, bacterianos, fúngicos y alimenticios.

Existen diferencias importantes entre el ADN y ARN circulantes. Se ha observado que, durante la apoptosis, la célula expulsa al menos dos subtipos de cuerpos apoptóticos, unos conteniendo ADN y otros ARN. La función biológica de la distribución diferencial de ANcir en cuerpos apoptóticos distintos aún se desconoce. Sin embargo, al ser moléculas informativas que pueden transitar por el organismo, esta separación diferencial de biomoléculas se ha propuesto como un mecanismo de comunicación intercelular sistémico. Incluso se ha acuñado el término de ADN mensajero, para referirse al ADN extracelular que es capaz de resistir la degradación y trasladarse a distintas células y tejidos del organismo, internalizarse dentro de células blanco o receptoras, portando y comunicando información genómica específica. En algunos casos, el ADN extracelular, después de ser internalizado por una célula blanco, puede incorporarse al genoma ajeno y propagarse a su descendencia. De hecho, existe evidencia de la transferencia horizontal de genes (THG) tanto de genes mutantes y su efecto oncogénico en la célula hospedera como de genes normales y su efecto como mecanismo homeostático para regular la integridad genómica. Anteriormente, hemos evidenciado que la transferencia horizontal de genes (THG) es un fenómeno ecológico y evolutivo, natural y global, que involucra a todos los reservorios de ácidos nucleicos. Además, propusimos una clasificación ecológica para estos eventos, la cual incluye la THG circulantes e involucra al material extracelular (propio o ajeno), normal y mutado, que circula en distintos fluidos dentro de los eucariontes multicelulares y se transmite entre sus propias células, somáticas y germinales; así como la THG alimenticios, que se refiere a la transmisión de

ANcir provenientes de la dieta del organismo. En ambos casos, las transferencias de material genético pueden afectar genómica y epigenómicamente una o varias células del organismo hospedero.

Otra diferencia clínicamente importante entre el ADN y ARN circulantes es que el primero nos provee de información relativamente estática que permite analizar cambios en la secuencia del ADN. En el caso particular del cáncer, esto es una ventaja ya que la detección anticipada de alteraciones en la secuencia de genes clave podría tener un impacto determinante tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, y posiblemente, en las estrategias para su prevención. Por otra parte, la información que se puede obtener del ARN circulante es dinámica: las secuencias de ARN, así como sus niveles, cambian drásticamente con el tiempo, entre tejidos y etapas de desarrollo, por lo que su análisis proporciona información en cualquier punto en el tiempo. Otra ventaja del ARN circulante es que los transcritos de ARN pueden ser tanto específicos del tumor como de un tejido particular, lo que potencialmente podría indicar tanto la presencia de un tumor como su localización.

Aplicaciones clínicas de los ácidos nucleicos circulantes

Por lo anterior, distintos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de los ácidos nucleicos circulantes para desarrollar pruebas sanguíneas poco invasivas, suficientemente sensibles y específicas para aplicarse en la evaluación clínica de diversas condiciones asociadas a la detección diferencial de ANcir.

Cáncer y ANcir

En personas sanas o con enfermedades distintas al cáncer, la fuente principal de ácidos nucleicos circulantes son las células nucleadas normales, principalmente las células hematopoyéticas. Distintos estudios reportan que las concentraciones de ADN y ARN circulantes son mayores en personas con cáncer que en personas sanas, y significativamente mayores en personas con metástasis. En muchos casos, estos niveles

disminuyen en respuesta a una terapia anti-cáncer exitosa. Cuando las concentraciones de ANcir no disminuyen después de la terapia, se ha asociado con una pobre respuesta del tumor a la terapia. Por lo tanto, su medición cuantitativa tiene el potencial para ser utilizada como biomarcador que permitiría detectar tumores y su respuesta al tratamiento.

Además, en personas con cáncer la mayor parte de los ácidos nucleicos en circulación sanguínea proviene de células tumorales. Por ello, el desarrollo de pruebas sanguíneas poco invasivas, suficientemente sensibles y específicas para aplicarse en la evaluación clínica de personas con cáncer se ha concentrado en la detección de alteraciones moleculares características del cáncer en los ANcir y no tanto en su cuantificación. Estos rasgos pueden detectarse en los ácidos nucleicos de los fluidos corporales de personas con cáncer mediante el empleo de tecnologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y pueden reflejar el tamaño del tumor —a mayor masa tumoral, mayor cantidad de ANcir tumorales—, el grado histológico —los cambios en la diferenciación celular asociados a los cambios en la actividad de genes: activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores—, la eficacia del tratamiento y el riesgo de recurrencia del cáncer.

Estas pruebas tienen gran especificidad para detectar tanto el gen mutado como el cáncer, debido a que en la sangre de individuos sanos no se encuentran mutaciones de estos oncogenes, por lo que podrían utilizarse en el pronóstico y monitoreo de la enfermedad. Por ejemplo, se han encontrado mutaciones de genes *Ras* en sangre que no corresponden con las mutaciones detectadas en biopsias del tumor de la misma persona y, en ciertos casos, las alteraciones de este gen se encuentran en la sangre de personas a las que no se les ha detectado ningún tumor. Esto significa que el análisis de ANcir podría tener potencial para detectar variaciones genómicas de subclonas tumorales que han adquirido mutaciones adicionales durante el proceso de metástasis, así como mutaciones tempranas en personas con riesgo de padecer cáncer. De hecho, tomando en consideración los resultados obtenidos en un estudio en el que se encontraron en la sangre de distintas personas mutaciones en un oncogen en etapas tempranas del desarrollo del cáncer —hasta catorce meses antes del diagnóstico clínico

de la enfermedad—, la aplicación clínica de ANcir para detectar el cáncer resulta prometedora.

Embarazo y ANcir

El embarazo es una condición que presenta similitudes con el cáncer, ya que la placenta es muy invasiva, altamente anaplásica, presenta un alto índice mitótico y produce antígenos oncofetales que evitan el ataque del sistema inmune. El estudio de ANcir en mujeres embarazadas ha demostrado la presencia de ácidos nucleicos fetales en su sangre, procedentes principalmente de la placenta y probablemente, mediante transferencia directa, de las células del mismo feto incluyendo las hematopoyéticas fetales.

Una de las estrategias para la detección de ADN fetal en la sangre materna es la búsqueda de secuencias diferentes entre la madre y el feto; por ello, en su mayoría, se han detectado genes o mutaciones heredadas del padre, las cuales son genéticamente distintas de las secuencias de origen materno. Por ejemplo, utilizando secuencias del cromosoma Y como marcador de ADN fetal masculino, además de cuantificar el ADN fetal, también puede utilizarse para determinar el género del feto.

Actualmente, la investigación se ha extendido a marcadores epigenéticos fetales y polimorfismos del ADN de los autosomas. Esto permite la detección de ANcir fetales heredados tanto del padre como de la madre.

El análisis cuantitativo de ANcir fetales tiene el potencial clínico para diagnosticar desórdenes genéticos prenatales como el síndrome de Down. En concentraciones elevadas, se ha asociado con ciertas complicaciones asociadas al embarazo como hipertensión, náuseas y vómitos excesivos, placenta invasiva y parto prematuro, al compararlos con los niveles encontrados en la sangre de mujeres con embarazos normales en las mismas etapas de gestación.

Trasplante de órganos y ANcir

Se ha demostrado la presencia de ADN del donante en la sangre de mujeres que recibieron un trasplante renal o de hígado por parte de donantes masculinos. Para detectarlo se usaron secuencias del cromosoma Y como marcador del ADN del donante.

Un posible origen del ADN circulante derivado del donador en la sangre de la persona que recibió el trasplante son las células del órgano trasplantado que han muerto por necrosis o apoptosis. Esto concuerda con la asociación que existe entre la liberación del ADN y la muerte celular que, como se ha observado, sería el resultado tanto de procesos normales como del rechazo al trasplante, además de infecciones por citomegalovirus, de complicaciones vasculares o biliares —en el caso de trasplantes de hígado— y del desarrollo neoplásico del órgano trasplantado. Así, es posible utilizar las concentraciones de ADN del donante en la sangre de las personas trasplantadas como marcador de rechazo o de daños en el tejido del órgano trasplantado, lo que podría ser utilizado para monitorear a las personas que han recibido un trasplante.

Trauma y ANcir

En vista del posible uso de los ácidos nucleicos circulantes como marcador de muerte celular, existe la posibilidad de usar las altas concentraciones de ADN, ARN y ADN mitocondrial extracelular que teóricamente resultan de las lesiones y muerte celular ocasionadas por algún trauma. Por ejemplo, se han estudiado las concentraciones de ADN en la sangre de personas a las que se les diagnosticó infarto al miocardio —que inicia con falta de oxígeno y que, al prolongarse, resulta en necrosis; en ellos se observaron niveles más altos de los que presentaron personas sanas, incluso, su patrón de ADN circulante resultó distinto del que presentaron personas sanas y personas con cáncer. Inclusive, las concentraciones elevadas de ADN circulante pudieran correlacionarse con la severidad de la lesión y el desarrollo de complicaciones post-traumáticas, al servir de reflejo de la extensión del trauma. Por lo tanto, el ADN circulante tiene el potencial clínico para ser utilizado en el pronóstico y monitoreo de personas que han padecido algún tipo de lesión física.

Otras aplicaciones de los ANcir

En un estudio se trató de investigar los efectos que tiene la actividad física sobre el daño muscular y el estrés oxidativo. Para ello, se cuantificaron los niveles de ADN circulante de la sangre de personas que participaron en una carrera de medio maratón y se observó que inmediatamente después de la carrera el nivel de ADN circulante aumentaba significativamente en comparación con los detectados previamente a la carrera y su nivel basal se recuperó dos horas después de finalizar la carrera. Con estos resultados, se sugiere que el ADN circulante tiene potencial en el monitoreo y cuantificación de daño celular, en este caso, provocado por ejercicio exhaustivo.

En resumen, los ANcir son moléculas informativas que pueden detectarse en distintos fluidos corporales. Se originan endógenamente a partir de células del cuerpo, tanto de forma pasiva (muerte celular) como activa (homeostáticamente). De manera exógena, provienen de organismos benéficos o infecciosos, así como de la ingesta alimentaria. En condiciones patológicas, se pueden detectar tanto las alteraciones genéticas como el tejido afectado. El procedimiento para la obtención de una muestra de ANcir —también llamada biopsia líquida— es poco invasivo y permite su repetición, en contraste con las biopsias de tejido. Lo anterior hace del análisis de los ANcir una herramienta útil para el análisis de distintas condiciones clínicas con el potencial para la detección, diagnóstico y monitoreo de diversas enfermedades.

El epigenoma circulante

El epigenoma y la regulación epigenética

El epigenoma se refiere, en general, a la descripción completa de las modificaciones químicas tanto del ADN como de las histonas a lo largo del genoma, las cuales conforman una red de regulación que modula la estructura de la cromatina y la función del genoma, generando patrones de expresión particulares a cada tipo celular. Aunque no son las únicas, las principales modificaciones de la cromatina incluyen la metilación

del ADN y las modificaciones de histonas. Estos cambios potencialmente heredables a lo largo del genoma dependen de determinantes genéticos, estirpe celular y el ambiente. Lo anterior resulta en un sistema dinámico durante el desarrollo y la diferenciación para establecer y mantener la expresión de genes específicos al tipo celular. Además, es un sistema lábil que le permite a las células responder y adaptarse a diversas señales ambientales. De esta forma, este sistema de regulación contribuye a la variabilidad fenotípica, incluida la susceptibilidad para desarrollar enfermedades que no podrían explicarse sólo mediante la secuencia del ADN.

Por otro lado, desde hace poco más de diez años se sabe que los genomas eucariontes transcriben el ~70-90% de su genoma —dependiendo de los criterios utilizados—, entre los que se encuentran los transcritos que codifican para proteínas con el 1–2%; el resto de los transcritos corresponde a los ARNs no codificantes (ncRNAs, por sus siglas en inglés). Aquello que por mucho tiempo fue considerado como sobrantes evolutivos desde que se acuñó el término ocioso de "*junk DNA*" o ADN inservible o basura para referirse al 98% de nuestro genoma, ahora es investigado profusamente por su papel fundamental en la regulación epigenética de la expresión génica. Actualmente se sabe que una gran cantidad de los transcritos no codificantes (ncRNA) participan en una amplia gama de funciones biológicas mediante la regulación de la expresión genética: silenciamiento de genes dirigido por ARN, modificaciones de la cromatina, cambios estructurales a la cromatina, regulación de promotores de genes, por mencionar algunas. Por ejemplo, el ARN largo no codificante (lncRNA, por sus siglas en inglés) denominado ecCEBP, regula la actividad enzimática de la proteína DNMT1, la metiltransferasa más abundante en mamíferos que entre otras funciones mantiene las marcas de metilación del ADN durante la replicación. Otros lncRNAs como HOTAIR, participan en la regulación de las modificaciones de histonas.

La regulación de marcas epigenéticas por ncRNAs es otro de los mecanismos para la regulación de la expresión génica. Incluso se ha reconocido un mecanismo de metilación de ADN dependiente de ncRNA, en particular del ARN asociado a promotor (pRNA, por sus siglas en inglés), en el que dichos ncRNA de ~90-100 nucleótidos forman una triple hélice ADN:ARN con la secuencia blanco y ésta es reconocida por una metiltransferasa

de ADN, en particular DNMT3b, reclutándola hacia un sitio genómico específico, induciendo su metilación y silenciamiento transcripcional.

Por lo anterior, una versión extendida o actualizada de la definición de epigenoma debe incluir el análisis de los ncRNAs, e incluso, a los priones, formas proteicas generalmente asociadas a enfermedades capaces de modificar el estado de las versiones nativas de una misma proteína hacia un estado conformacional distinto (plegamiento), alterando su función hacia un estado auto-perpetuante, y capaces de regular la expresión génica a través de interacciones proteicas.

Una aproximación actual para referirse al epigenoma es la definición del proyecto "*Roadmap Epigenomics Project*" del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés), quienes consideran que la epigenética hace referencia tanto a los cambios heredables en la actividad y expresión génica —en la progenie de células o individuos—, así como a las alteraciones estables de largo plazo en el potencial transcripcional de una célula que no necesariamente son heredables.

La caracterización de patrones de modificación de la cromatina a lo largo del genoma —mapeo epigenético— puede ayudar en el entendimiento del desarrollo y diferenciación celular, así como al descubrimiento de genes involucrados en condiciones clínicas que no son detectados por los estudios basados sólo en la secuencia del ADN. A diferencia del análisis del genoma —el cual proporciona información sobre la secuencia y estructura genómica—, el epigenoma aporta información funcional del genoma. Sin embargo, el genoma, transcriptoma y epigenoma están estrechamente relacionados y, junto con otros conjuntos de elementos moleculares, conforman una red regulatoria que resulta en los fenotipos observados en condiciones de salud y enfermedad.

Algunas estrategias para estudiar este complejo sistema son la reacción en cadena de la polimerasa —PCR— específica de metilación (MSP, por sus siglas en inglés), los estudios de asociación del epigenoma completo (EWAS, por sus siglas en inglés) y la secuenciación mediante tecnologías de alto rendimiento, también llamadas de nueva generación o NGS por sus siglas en inglés. Su aplicación se ha utilizado no sólo para el estudio de distintos tipos celulares y etapas del desarrollo de individuos con o sin enfermedad, sino también para el análisis de moléculas de regulación epigenética en

muestras de fluidos corporales provenientes de personas con distintas condiciones clínicas.

El epigenoma circulante

El epigenoma circulante se refiere a la detección y análisis en los fluidos corporales de las modificaciones al ADN e histonas, así como a los ncRNAs, que de manera individual o conjunta participan en la regulación de la expresión de transcritos, tanto codificantes como no codificantes. Los cambios en las moléculas de regulación epigenética han sido utilizados en la investigación de condiciones normales y patológicas; sin embargo, aún son pocos los estudios que han buscado diferencias o alteraciones en los mecanismos de regulación epigenéticos y su efecto en la expresión diferencial de genes de manera global, en su mayoría involucrando el análisis de micro ARNs (miRNAs) en fluidos corporales. A continuación, se mencionarán algunos estudios del epigenoma global llevados a cabo en fluidos corporales de paciente con patologías como cáncer, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, para ejemplificar el potencial clínico del estudio del epigenoma circulante. En todas estas condiciones, se ha evidenciado la participación de alteraciones en los patrones tanto de metilación como de transcripción de ncRNAs, particularmente miRNAs. Sin embargo, existen aún muy pocos estudios en los que se haya analizado el metiloma circulante —análisis global de islas y costas CpG extracelulares metiladas—, por lo que la mayoría de los ejemplos involucran el estudio global de miRNAs en donde transcritos específicos están asociados a procesos correspondientes a la enfermedad particular.

Epigenoma circulante en cáncer

Desde hace más de 30 años se ha sabido sobre la ocurrencia de alteraciones en la metilación del ADN en cáncer, incluyendo la hipometilación de oncogenes y la metilación de genes supresores de tumores. Actualmente se sabe que estas alteraciones, además de localizarse en promotores e islas CpGs, también pueden localizarse en las costas de islas CpG (CpG *island shores*) —localizadas a ~2kb de distancia de islas CpG—,

secuencias de ADN repetidas, retrotransposones, elementos retrovirales endógenos, secuencias reguladoras distales (*super-enhancers*), así como en regiones intra e inter-génicas. En el cáncer, los cambios globales en la metilación se relacionan con patrones de expresión alterados e inestabilidad genómica. La hipermetilación de promotores está asociada con la disminución de la transcripción de genes supresores de tumores, mientras que la hipometilación con el incremento en transcritos de oncogenes.

Uno de los objetivos clínicos en el tratamiento del cáncer es la búsqueda de biomarcadores moleculares para la detección temprana, la evaluación de la respuesta al tratamiento y predicción de la recaída. El metiloma circulante —análisis global de islas y costas CpG extracelulares metiladas— ha sido estudiado en distintos tipos de cáncer.

En cáncer hepático, se han reportado niveles significativos de metilación de ANcir al analizar siete sitios de islas CpG del promotor de INK4A por pirosecuenciación. Además, utilizando un método reciente de amplificación y secuenciación en tándem de CpGs metiladas (MCTA-Seq, por sus siglas en inglés) se pueden detectar miles de islas CpGs metiladas en el genoma circulante. El MCTA-Seq es un método eficiente para amplificar fragmentos cortos de ADN, tiene un límite de detección de 2.5 equivalentes de genoma haploide —cerca del límite de los ensayos basados en PCR—, y puede utilizarse para analizar miles de islas CpG hipermetiladas en el genoma extracelular sanguíneo. Por ejemplo, utilizando muestras de tejido y plasma de pacientes con cáncer hepatocelular —el tipo más común de cáncer de hígado— y compararlas con las de sujetos control (incluyendo pacientes con cirrosis e individuos normales), se han identificado marcadores específicos para la detección de carcinoma hepatocelular pequeño (≤ 3 cm), con los que se lograron establecer dos clasificadores para distinguir entre personas con o sin cáncer. En este caso, un clasificador incluye a los genes RGS10, ST8SIA6, RUNX2 y VIM, cuya hipermetilación resulta específica para la detección del cáncer, mientras que el otro clasificador involucra a 15 genes que se encuentran hipermetilados en tejido hepático normal, pero cuya detección serviría para indicar la muerte excesiva de células de hígado sanas.

El estudio de perfiles de metilación diferencial entre el cáncer de esófago, tejido adyacente y mucosa normal en pacientes con carcinoma de células escamosas, en

combinación con datos de la expresión de genes de la base de datos GEO —*Gene Expression Omnibus*—, permitió la identificación de 186 genes con metilación diferencial en las islas CpG de sus promotores; mediante PCR específica de metilación (MSP), se encontraron metilados los genes EPB41L3, GPX3 y COL14A1 en el plasma de los pacientes, pero no en los individuos sanos.

El tumor de Wilms es la neoplasia renal pediátrica más común, presenta una baja frecuencia de mutación (<20%) en los genes recurrentemente alterados (WTX, CTNNB1 y WT1, con 18%, 15% y 12%, respectivamente), mientras que la metilación aberrante en la región cromosómica 11p15 es la alteración más común (69%). Mediante estudios epigenómicos, particularmente del metiloma, se han descubierto regiones diferencialmente metiladas en los tumores de Wilms en comparación con el tejido adyacente normal de riñón. Estas regiones diferencialmente hiper e hipo-metiladas, además de servir como biomarcadores específicos del tumor, proporcionan información para dirigir la búsqueda de biomarcadores hacia genes específicos con alteraciones epigenéticas como es el caso de los genes DMR-1, -2 y -3, cuyos niveles de metilación corresponden con el nivel de riesgo entre subtipos tumorales, donde el incremento secuencial en sus niveles de metilación se asocia con la transformación hacia un fenotipo maligno. Además, al analizar estos genes como posibles biomarcadores circulantes, se observó el incremento en los niveles de DMR-2 metilado en la sangre de los pacientes tras la quimioterapia pre-operatoria y se mantuvieron elevados en el periodo post-operatorio inmediato, dicho incremento fue mayor para el subtipo regresivo (> 2/3 de necrosis post-quimioterapia) del tumor de Wilms. El gen DMR-2 es el primer biomarcador epigenético identificado para el análisis del ADN circulante metilado en pacientes con tumor de Wilms, con la posibilidad de utilizarse para determinar la respuesta tumoral y predecir el grupo histológico de riesgo.

En cáncer de mama, el tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial, se realizó un ensayo múltiple cuantitativo de PCR específico para metilación para un panel de 10 genes que se encuentran hipermetilados en este tipo de cáncer: AKR1B1, COL6A2, GPX7, HIST1H3C, HOXB4, RASGRF2, TM6SF1, ARHGEF7, TMEFF2 y RASSF1. Utilizando suero de pacientes con cáncer metastásico recurrente, se logró la detección

de ADN circulante metilado del tumor con una sensibilidad de 91% y especificidad de 96%. Después de la quimioterapia, las pacientes con enfermedad estable o con respuesta al tratamiento mostraron disminución en los niveles de metilación del ADN en suero, mientras que en las pacientes con enfermedad progresiva no se observó disminución. Además, en este estudio se encontró que los perfiles de metilación son similares entre el tumor primario, metástasis y suero de la misma paciente, por lo que parte del perfil de metilación es retenido, incluso por muchos años. Resultados semejantes se han obtenido al estudiar el carcinoma renal primario, altamente heterogéneo, en comparación con el carcinoma renal metastásico, en los que se observa un bajo nivel de heterogeneidad. Estos resultados demuestran el potencial del análisis del epigenoma circulante en la detección temprana, respuesta al tratamiento y como apoyo para futuros tratamientos.

Epigenoma circulante en trastornos neurodegenerativos

La prevalencia de enfermedades neurodegenerativas se ha ido incrementando conforme aumenta la esperanza de vida. Enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, demencias vasculares y frontotemporales, así como otras patologías neurológicas, se caracterizan por un desarrollo lento con un periodo asintomático largo, seguido por una etapa de síntomas clínicos leves; por ello, en la mayoría de los casos son diagnosticadas en etapas avanzadas de la enfermedad, después de 10–20 años del inicio de la enfermedad.

La mayoría de la investigación epigenómica involucrando condiciones patológicas se ha centrado en enfermedades que afectan tejidos periféricos específicos, incluyendo al cáncer. Debido a la invasividad y riesgos sustanciales asociados a las biopsias de tejido cerebral, se han realizado pocos estudios del epigenoma cerebral, incluyendo al metiloma y el análisis de ncRNAs en condiciones neurodegenerativas y psiquiátricas, a excepción de los tumores cerebrales y, en muchas ocasiones, a partir de tejidos *post-mortem*. Distintas enfermedades neurodegenerativas, a pesar de que las formas heredadas genéticamente son raras, generalmente presentan lesiones similares: presencia de placas amiloides, ovillos neurofibrilares TAU e inclusiones de sinucleína.

Recientemente, se observó que las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en humanos presentan perfiles similares de metilación aberrante, es decir, regiones diferencialmente metiladas (DMRs, por sus siglas en inglés) en genes blanco. Al analizar la materia gris y blanca de muestras *post-mortem* provenientes de la corteza dorsolateral prefrontal de pacientes con Alzheimer —tradicional y asociado a síndrome de Down—, demencia con cuerpos de Lewy o Parkinson, se encontraron 709 o 1,545 DMRs —dependiendo si la secuencia metilada en el promotor coincide o no, respectivamente— compartidas en estas cuatro enfermedades, incluyendo 257 promotores de genes diferencialmente metilados.

Por lo tanto, el desarrollo de pruebas de detección temprana analizando los ANcir, así como el epigenoma circulante en enfermedades del sistema nervioso central, podría proporcionar información valiosa respecto a los cambios que ocurren en el cerebro tanto en condiciones normales como patológicas y resultar en intervenciones terapéuticas desde etapas tempranas, preferiblemente asintomáticas.

El defecto cognitivo leve es un síndrome característico de etapas tempranas de diversas enfermedades neurodegenerativas. La identificación de dos grupos de miRNAs del cerebro en la circulación sanguínea involucrando a la familia miR-132 (miR-128, miR-132, miR-874) y la familia miR-134 (miR-134, miR-323-3p, miR-382), capaces de identificar el defecto cognitivo leve con respecto a sujetos control pareados por edad, con alta sensibilidad (96%) y especificidad (87%), representa un paso importante para la generación de pruebas de detección temprana de distintas patologías neurodegenerativas que comparten este síndrome. Incluso, la utilización pareada de estos marcadores ha permitido la identificación del defecto cognitivo leve en la mayoría de los pacientes en etapas asintomáticas de 1-5 años antes del diagnóstico clínico.

Por su contacto directo con el cerebro y médula espinal, su ambiente libre de células y un proceso de colecta con daño mínimo al tejido —punción lumbar—, el fluido cerebroespinal es un blanco para el estudio de ANcir del sistema nervioso central. En este fluido corporal se han detectado cambios en los niveles de miRNAs en pacientes con tumores y lesiones cerebrales, esclerosis múltiple, infarto cerebral, Parkinson y Alzheimer.

En esclerosis múltiple se ha observado mediante perfil global de miRNAs y validación cuantitativa por PCR, la presencia diferencial de miR-922, miR-181c y miR-633 entre individuos con esclerosis múltiple e individuos con otras enfermedades neurológicas. Además, mediante análisis de microarreglos con más de 900 miRNAs conocidos se identificó la sobre-expresión de seis de ellos, miR-614, miR-572, miR-648, miR-1826, miR-422a y miR-22, y la sub-expresión de miR-1979, en pacientes con esclerosis múltiple en comparación con individuos sanos.

La comparación del perfil de miRNAs en fluido cerebroespinal de pacientes con o sin esclerosis amiotrófica lateral, detectó 14 miRNAs sub-expresados. La mayor precisión diagnóstica para detectar la esclerosis amiotrófica lateral se obtuvo al comparar el miRNA sobre-expresado, miR181a-5p, con los miRNAs sub-expresados miR21-5p o miR15b-5p, con una sensibilidad de 90 y 85% y especificidad de 87 y 91%, respectivamente.

En muestras de pacientes con Alzheimer se evaluaron 327 secuencias de miRNAs conocidos. En el fluido cerebroespinal se detectaron 52 de ellos con sobre-expresión de los miRNAs let-7i-5p y miR-15a-5p y la sub-expresión de miR-29c-3p; por otro lado, en sangre se detectaron 168 miRNAs con sobre-expresión tanto de miR-590-5p como miR-142-5p y la sub-expresión de miR-194-5p, en comparación con los individuos control.

El análisis de miRNAs en exosomas obtenidos del fluido cerebroespinal de pacientes con Parkinson detectó la sub-expresión de miR-1 y miR-19b-3p, así como la sobre-expresión de miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p y let-7g-3p —miRNAs involucrados en la señalización de neurotrofina y mTOR, proteólisis mediada por ubiquitina y, sinapsis dopaminérgica y glutamatérgica. La comparación del perfil de transcritos en exosomas cerebroespinales entre pacientes con Parkinson o Alzheimer resultó en la detección de la expresión diferencial tanto de los ARNm de la proteína precursora amiloide (APP), sinucleína alfa (alpha-syn), Tau, gen de neurofilamento ligero (NF-L), DJ-1/PARK7, fractalquina y neuropsina, junto con los ncRNA largos RP11-462G22.1 y PCA3. Estos perfiles de transcritos en exosomas pueden servir como biomarcadores para distinguir entre personas con Parkinson, Alzheimer e individuos sanos.

Por otra parte, se ha observado que los priones —partículas infecciosas responsables de la transmisión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob—, pueden transmitirse dentro de vesículas extracelulares, alterar la función celular y propagar la enfermedad. En el caso de Alzheimer y Parkinson, se ha propuesto su propagación mediada por exosomas. De hecho, diversos estudios han reportado que las proteínas beta-amiloide en Alzheimer y alfa-sinucleína en Parkinson forman agregados proteicos específicos de la enfermedad, mostrando características de propagación semejantes a los priones, agregándose y formando ensamblajes hasta formar placas grandes o inclusiones que sirven como patrón para una subsecuente propagación en el cerebro. También, se ha reportado que los exosomas derivados de células neuronales infectadas por priones presentan contenido diferencial de miRNAs, en particular los miRNAs let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-342-3p y miR-424 sobre-expresados, y el miR-146a sub-expresado, en comparación con exosomas provenientes de células no infectadas. Lo anterior sugiere la posibilidad de mejorar el diagnóstico en Alzheimer y Parkinson mediante la incorporación del análisis de estas proteínas tipo prion junto con el estudio de miRNAs contenidos en las vesículas extracelulares e invita a investigar su posible efecto sinérgico en la propagación de estas enfermedades neurodegenerativas.

Otro apartado del epigenoma que se ha comenzado a estudiar es el metiloma mitocondrial. Recientemente se reportó la metilación diferencial en el análisis de 39 tejidos y líneas celulares, particularmente involucrando células con distintas características temporales y funcionales como el cerebro y la sangre. Una de estas regiones del genoma mitocondrial diferencialmente metilada incluye a la deshidrogenasa NADH (dinucleótido de nicotinamida y adedina) mitocondrial MT-ND6, cuyas variantes han sido asociadas con trastornos neurológicos. Probablemente, estudios del epigenoma mitocondrial circulante en enfermedades neurodegenerativas, así como otras patologías, aportarán nuevo conocimiento de las bases moleculares de diversas enfermedades, impulsando el desarrollo de pruebas de diagnóstico basadas en el análisis de los ácidos nucleicos circulantes.

Epigenoma circulante en enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares agrupan a los trastornos del corazón y vasos sanguíneos, representando la principal causa de muerte en todo el mundo. Dos de los factores más importantes para el desarrollo de enfermedad cardiovascular son los niveles sanguíneos tanto de la lipoproteína de baja densidad como de alta densidad (LDL y HDL, por sus siglas en inglés, respectivamente). En el sistema cardiovascular, distintos miRNAs participan en condiciones como la disfunción endotelial, inflamación, apoptosis, angiogénesis, entre otras.

En pacientes con enfermedad arterial coronaria, se analizaron 754 miRNAs circulantes en plasma y se observó la sobre-expresión de los grupos miR-106b/25, miR-17/92a, miR-21/590-5p, miR-126 y miR-451 en pacientes con angina inestable. Además, en las micropartículas del plasma de estos pacientes se encontró la sobre-expresión de miR-106b, miR-25, miR-92a, miR-21, miR-590-5p, miR-126 y miR-451. Estos grupos de miRNAs pueden utilizarse como biomarcadores de la enfermedad arterial coronaria y ejemplifican la utilidad del análisis del epigenoma circulante para el abordaje clínico de las enfermedades cardiovasculares.

Además, otro estudio demostró la utilidad de los miRNAs miR423-5p, miR10b, miR30d y miR126 para discriminar de manera individual la capacidad colateral baja, por lo que podrían fungir como biomarcadores para discriminar entre pacientes con colateralización suficiente o insuficiente.

Con respecto al tromboembolismo venoso, mediante el análisis de 742 miRNAs en vesículas extracelulares obtenidas del plasma, se encontraron diferencias que podrían ayudar a distinguir pacientes susceptibles de tromboembolismo venoso no provocado, en particular la sobre-expresión de miR-10b-5p, -320a, -320b, -424-5p, y -423-5p junto con la sub-expresión de miR-103a-3p, -191-5p, -301a-3p y 199b-3p.

Los biomarcadores miR-30d y miR-1246 (sobre y sub-expresados, respectivamente) para el diagnóstico y pronóstico de la lesión de bifurcación coronaria también fueron validados de entre 150 y 47 miRNAs sobre y sub-expresados, respectivamente, al analizar miRNAs circulantes.

Además de estos ejemplos, continuamente se siguen incorporando miRNAs circulantes con el potencial para participar como biomarcadores de distinción, diagnóstico y monitoreo de distintas condiciones cardiovasculares. La identificación de estas redes de regulación complejas permitirá el reconocimiento de miRNAs circulantes que participan en distintos procesos comunes a varias condiciones clínicas, permitiendo el desarrollo de moléculas dirigidas a los miRNAs regulatorios clave en el desarrollo de diversas patologías aparentemente no relacionadas entre sí.

Epigenoma circulante en enfermedades metabólicas

Las enfermedades metabólicas son condiciones en las que se altera el metabolismo normal por la afectación de la capacidad de la célula para realizar las reacciones bioquímicas que involucran el procesamiento y transporte de proteínas, carbohidratos o lípidos. En general, las enfermedades metabólicas como la diabetes son diagnosticadas tardíamente, cuando el desarrollo de complicaciones es casi inevitable, impactando la calidad de vida de los pacientes. Diversos miRNAs participan en la regulación de procesos cuyas alteraciones están asociadas a este grupo de enfermedades como la regulación las lipoproteínas de baja y alta densidad. El estudio del epigenoma circulante podría permitir identificar la muerte celular de tejidos específicos para dirigir la búsqueda hacia el tejido alterado, lo que permitiría implementar terapias efectivas en etapas tempranas de la enfermedad.

La prueba de este concepto se consiguió recientemente basándose en los patrones de metilación específicos de diversos tejidos humanos reportados en distintas bases de datos con registros del metiloma humano y analizando los patrones de metilación en el ADN circulante de pacientes con distintas condiciones clínicas. La metodología incluyó el aislamiento de ADNcir de plasma o suero de pacientes, su tratamiento con bisulfito, amplificación por PCR y secuenciación para cuantificar el ADNcir con las marcas epigenéticas correspondientes al tipo celular de origen. Como resultado, se logró la detección de ADN circulante de células beta pancreáticas en pacientes recientemente diagnosticados con diabetes tipo I, de oligodendrocitos en esclerosis múltiple, ADN neuronal/glial en muestras sanguíneas provenientes de personas después de sufrir una

lesión cerebral traumática o paro cardíaco, así como de células exócrinas de páncreas en pacientes con pancreatitis o cáncer pancreático.

La diabetes tipo I resulta de la eliminación de células beta productoras de insulina por células del sistema inmune, generando una pérdida progresiva e irreversible en la producción de insulina y, por lo tanto, el requerimiento de suministro exógeno de insulina. En el caso particular de los niños, se estima que al momento de ser diagnosticados con diabetes tipo I ya han perdido entre el 80–90% de la función de las células productoras de insulina. Al respecto, la secuenciación global de micro ARNs circulantes ha permitido la identificación inicial de 47 miRNAs con expresión diferencial entre diabetes pediátrica tipo I y niños sanos. Después de validarlos por PCR cuantitativo (qPCR, por sus siglas en inglés) y analizarlos mediante regresión ajustada por edad, sexo y pruebas múltiples, doce miRNAs resultaron con expresión diferencial estadísticamente significativa entre los niños con o sin diabetes tipo I: miR-181a, miR-24, miR-25, miR-210, y miR-26a, involucrados en la regulación de la apoptosis; miR-148a, miR-200a y miR-29a, involucrados en las redes de regulación de células beta (junto con miR-24), los miR-152, miR-30a-5p, miR-27a (involucrado en la homeostasis del colesterol y metabolismo de ácidos grasos) y miR-27b. En particular, los resultados indican que el miR-25 podría ser utilizado como miRNA específico de tejido para el control glicémico de niños, tres meses después del diagnóstico de diabetes tipo I.

También, el análisis de 179 miRNAs circulantes altamente expresados en sangre se realizó en 12 niños obesos (6 resistente a la insulina y 6 controles) de 6–12 años, pareados por edad, sexo e índice de masa corporal. Esto permitió la identificación de miR-200c-3p, miR-190a y miR-95 como biomarcadores de resistencia a la insulina en niños en edad preescolar. En otro estudio del perfil de miRNAs circulantes en niños obesos entre 7–10 años, se encontraron 15 miRNAs sub-expresados asociados al índice de masa corporal, otras medidas de obesidad y parámetros de laboratorio. La detección temprana de perfiles alterados de miRNAs circulantes podría utilizarse para la identificación de niños obesos susceptibles de padecer trastornos metabólicos.

Utilizando muestras de suero de pacientes pre-diabéticos, se investigó el perfil de 176 miRNAs circulantes mediante RT-PCR en tiempo real. Los micro ARNs, miR-192 y miR-

193b, se encontraron sobre-expresados en paciente pre-diabéticos, pero no en los diabéticos, y su expresión disminuyó después de una intervención terapéutica basada en ejercicio crónico, normalizando los parámetros metabólicos.

El análisis de miRNAs en pacientes diabéticos no tratados previamente y sujetos a control glicémico resultó en la detección de la sobre y sub-expresión de 4 y 21 miRNAs, respectivamente. Los miRNAs sobre-expresados, miR-326, y sub-expresados, let-7a y let-7f, fueron validados por RT-PCR. Se encontró una correlación negativa inversa para miR-326 y su blanco adiponectina, indicando una desregulación significativa en la regulación de la vía de adiponectina en pacientes diabéticos no tratados previamente. Además, los niveles de let-7a y let-7f se incrementaron significativamente después de 12 meses de tratamiento anti-diabético, por lo que dicha desregulación puede ser en parte reversible mediante estrategias de control glicémico.

Por otra parte, al evaluar 739 miRNAs en suero de pacientes con diabetes tipo 2, obesidad e individuos sanos, se encontró que miR-138, miR-15b y miR-376a tienen potencial predictivo en obesidad; miR-138 o miR-376a permiten distinguir entre pacientes obesos, individuos sanos, diabéticos, así como pacientes con diabetes y obesidad; además, la combinación de miR-503 y miR-138 permite distinguir entre diabéticos y diabéticos con obesidad.

Estos casos ejemplifican la utilidad del análisis del epigenoma circulante tanto para el diagnóstico como el monitoreo de la respuesta ante intervenciones terapéuticas en pacientes con enfermedades metabólicas.

Otras aplicaciones del epigenoma circulante

El análisis del epigenoma circulante, al igual que del genoma y transcriptoma circulantes, tiene el potencial de ser utilizado para diversas condiciones clínicas como la evaluación prenatal, enfermedades mediadas por el sistema inmune, entre otras.

La presencia de patrones de metilación específicos del feto ha sido identificada por las diferencias en los patrones de metilación entre ANcir fetales y maternos. Mediante la

secuenciación por bisulfito del genoma completo, se ha logrado determinar la densidad de metilación de ANcir fetales con 1Mb de resolución a lo largo del genoma, con lo que se han podido determinar regiones diferencialmente metiladas del metiloma fetal, en comparación con el metiloma materno. El perfil del metiloma circulante fetal se asemeja al de la placenta, mientras que el metiloma circulante materno se asemeja al de las células sanguíneas maternas. Además, los patrones de metilación específicos del feto en cromosomas aneuploides permiten la identificación de aneuploidías cromosómicas. Por lo anterior, el análisis del metiloma fetal podría utilizarse para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades asociadas al embarazo como la preeclampsia, utilizando métodos poco invasivos como la toma de muestras sanguíneas. También, con la aplicación de herramientas de alto rendimiento como la RNA-Seq para analizar el transcriptoma circulante, se han logrado identificar 131 transcritos asociados al embarazo. Incrementos progresivos de ARN circulante fetal, así como la variación en la presencia de transcritos asociados al embarazo, también se han observado entre etapas tempranas y tardías del embarazo.

Incluso, se han identificado regiones diferencialmente metiladas específicas tanto del sistema inmune como del sexo. En células del sistema inmune, la mayoría de estas regiones diferencialmente metiladas se localizan en los genes, mientras que las específicas del sexo se ubican mayoritariamente en islas CpG.

En un futuro, los análisis del metiloma y transcriptoma fetal en circulación sanguínea, serán utilizados como herramientas poco invasivas en la atención prenatal para monitorear la salud placentaria y fetal, así como para predecir condiciones riesgosas como la preeclampsia, antes de que se manifiesten en las mujeres embarazadas. Además, las regiones diferencialmente metiladas podrían servir como marcadores para el estudio de enfermedades con dimorfismo sexual como ocurre con las enfermedades autoinmunes.

En relación con el ejercicio, se han observado modificaciones epigenéticas globales después de entrenamientos de carrera por intervalos. Muchas islas CpG y regiones promotoras de genes se encuentran desmetiladas después del ejercicio. Uno de los genes en los que se observan cambios en la metilación y disminución de su ARNm

después de realizar ejercicio es el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), que está involucrado en enfermedades cardiovasculares. También se observaron modificaciones de los ARN no codificantes miR-21 y miR210, micro ARNs involucrados en la función cardiovascular. Por lo tanto, el ejercicio modifica los perfiles de metilación de secuencias asociadas a la fisiología cardiovascular, por lo que además de aportar posibles secuencias blanco para el estudio de condiciones cardiovasculares, también pueden servir para el monitoreo de personas que se ejercitan rutinariamente, así como deportistas profesionales y de alto rendimiento.

Aunque aún no se han publicado estudios sobre el epigenoma mitocondrial circulante, las alteraciones en la metilación del ADN mitocondrial, además de haber sido descritas para diversas condiciones como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, también se han observado en el envejecimiento y en la exposición a contaminación ambiental. Por lo tanto, el estudio del epigenoma mitocondrial circulante puede expandirse a una diversidad de patologías y condiciones clínicas para aportar mayor conocimiento, susceptible de ser utilizado en el abordaje de distintas condiciones clínicas.

El Exoepigenoma

Recientemente, se reportó la primera evidencia de miRNAs exógenos provenientes de plantas que pueden detectarse en suero, plasma y tejidos de distintos animales. Estos transcritos no codificantes son adquiridos principalmente mediante la ingesta de alimentos. Diversos estudios han demostrado que al menos una parte de los transcritos alimentarios provenientes de plantas y animales son capaces de resistir el proceso tanto de cocción como de digestión. Uno de los miRNAs exógenos (exomiRNAs) más abundantes en circulación sanguínea de sujetos chinos es el MIR168a, un ncRNA abundante en el arroz. Sorprendentemente, estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* demostraron que el MIR168a puede unirse al ARNm del gen LDLRAP1 tanto humano como de ratón, inhibiendo su expresión en hígado de ratón y disminuyendo la eliminación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) del plasma. Ésta es la primera evidencia de regulación epigenética inter-organísmica en donde miRNAs

exógenos provenientes de plantas pueden regular la expresión de genes blanco de mamíferos.

A partir de ese momento se han detectado transcritos alimentarios provenientes de plantas y animales en sangre humana. Por ejemplo, se ha reportado que uno de los principales ncRNAs exógenos detectados en exosomas humanos es el micro ARN bovino bta-miR-6529. Además, la presencia de más de la mitad de los precursores de miRNAs relacionados al sistema inmune en exosomas de leche materna humana invita a pensar en la posibilidad de que éstos sean transferidos hacia el infante al alimentarlo con leche materna y participen en el desarrollo de su sistema inmune.

La detección de estos transcritos exógenos provenientes de la dieta es un tema controversial, con resultados opuestos e incluso se ha especulado que la mayoría de ARNs no humanos detectados en fluidos corporales puede ser un artefacto resultante de las tecnologías de análisis utilizadas. Habrá que seguir investigando; sin embargo, en opinión personal, no debemos caer en errores previos como en el caso del "*junk DNA*" que por no conocer su funcionalidad se asume la ausencia de función. En el caso de la regulación alimentaria inter-organísmica, no debemos asumir la inexistencia de este mecanismo sin aportar la evidencia pertinente. De hecho, biológicamente no existe una imposibilidad para ello y, por el contrario, existe un paralelismo entre las bases moleculares de la biogénesis y mecanismos de acción entre miRNAs en plantas y animales.

Afortunadamente, más evidencia sigue siendo reportada referente al potencial regulatorio de los exomiRNAs. Este año se reportó otra evidencia sorprendente sobre la regulación inter-organísmica. La secuenciación de transcritos en muestras sanguíneas provenientes de sujetos occidentales con cáncer de mama demostró la presencia de ARNs de plantas, principalmente *Arabidopsis thaliana* y soya (*Glycine max*). Los exomiRNAs más abundantes encontrados fueron ath-miR159a de *Arabidopsis*, así como gma-miR159a-ep y gma-miR159e-39 de soya. La secuencia de miR159 fue confirmada mediante qPCR, localizado en su mayoría en vesículas extracelulares. Los miRNAs vegetales portan una modificación de los nucleósidos en el ARN, la metilación al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa del nucleósido (2'-O-metilación). Esta modificación protege al

ARN vegetal de la oxidación con peryodato de sodio, por lo que el origen vegetal del exomiRNA, miR159, fue confirmado mediante la oxidación con peryodato de sodio y su subsecuente reverso transcripción. La presencia del exo-miR159, enriquecida en vesículas extracelulares, fue significativamente más abundante en el suero de donadores sanos en comparación con pacientes de cáncer de mama y significativamente menos abundante en pacientes de cáncer de mama que tuvieron recaída con metástasis dentro de los 3.5 años después de la colecta del suero, en comparación con los pacientes que no tuvieron progresión de la enfermedad en los 2–6 años de seguimiento. Además, niveles significativamente menores del miR159 se asociaron negativamente con la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona (ER y PR, por sus siglas en inglés, respectivamente). Esto indica que el exo-miR159 se encuentra inversamente correlacionado con la incidencia y progresión del cáncer de mama. Además, su presencia fue detectada en los tumores mamarios y su abundancia tumoral se correlacionó positivamente con la abundancia del exo-miR159 en el suero, por lo que además de resistir los procesos de cocción y digestión, resiste la degradación enzimática dentro del organismo llegando hasta el tejido mamario. Posteriormente, confirmaron tanto *in vitro* como *in vivo* que el miR159 2'-O-metilado sintético reduce tanto la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCFDCIS) pero no la de líneas no cancerosas (MCF-10A) ni de células epiteliales mamarias (HuMEC), como el crecimiento tumoral de ratones xenotransplantados con la línea celular MDA-MB-231 alimentados con el miR159 2'-O-metilado sintético. En ambos casos, el efecto de la inhibición tumoral fue el resultado de la disminución de la expresión de TCF7 —factor de transcripción involucrado en la vía de señalización de Wnt y sobre-expresado en cáncer de mama— por su unión directa con el miR159 2'-O-metilado sintético y de MYC (oncogen blanco de TCF7). El crecimiento de las células de cáncer de mama también resultó inhibido al ser tratadas con vesículas extracelulares aisladas del suero de personas sanas, las cuales contienen cantidades abundantes de la forma natural del exo-miR159. Este es el primer reporte que demuestra la inhibición del crecimiento tumoral en mamíferos como resultado del consumo de exomiRNAs de plantas.

Por las evidencias anteriores, consideramos que la capacidad regulatoria de exomiRNAs de plantas sobre genes blanco de mamíferos, sumada a la regulación epigenética de priones exógenos, sienta las bases para una nueva línea de investigación: el Exoepigenoma, es decir, el estudio de ácidos nucleicos y proteínas exógenas y su efecto regulatorio sobre la expresión de genes blancos ajenos. El exoepigenoma combina aspectos del epigenoma, la nutrigenómica y el microbioma (incluso otras ciencias ómicas), en donde fuentes exógenas como los alimentos y organismos presentes constante o temporalmente, además de proporcionar nutrientes o enzimas digestivas (por mencionar algunos beneficios), portan información regulatoria inter-organísmica capaz de regular la expresión de genes ajenos (Figura 1). Además del impacto potencial a nivel molecular de los ácidos nucleicos exógenos alimenticios en la fisiología animal y sus comunidades microbianas, también pueden estar participando en la prevalencia de distintas condiciones de salud como en el caso del cáncer de mama. Cabe resaltar el caso particular de los organismos genéticamente modificados (OGM), particularmente de los alimentos genéticamente modificados (AGM), cuyas modificaciones genómicas son asumidas como inocuas. La evidencia descrita anteriormente demuestra la importancia de incluir evaluaciones estrictas de los posibles efectos regulatorios de los AGM en la expresión de los organismos que los consuman antes de asumir su inocuidad.

Tanto el genoma como el epigenoma circulantes están conformados por ADN y ARN extracelular, es decir, por moléculas informativas que pueden detectarse en distintos fluidos corporales. Su análisis en suero y plasma sanguíneo hacen de su muestreo un procedimiento sencillo y poco invasivo que, a diferencia de las biopsias de tejido, puede repetirse en varias ocasiones.

Por otro lado, la posibilidad de detectar cambios en sus niveles, estructura o conformación epigenética hacen de su análisis una posible herramienta para la evaluación clínica tanto en condiciones normales como de enfermedad (Figura 1). Además, son potencialmente regulatorias, tanto mediante su inserción en otro genoma celular (ADN circulante) como al asociarse a moléculas regulatorias (ARN y proteínas) en células distantes, lo que permitiría la comunicación intercelular a larga distancia,

fungiendo como otro mecanismo de comunicación celular tanto sistémico como inter-organísmico, cuya función y biología requieren de mayor estudio.

Figura 1. El modelo del exoepigenoma. La ilustración muestra una visión simplificada de los posibles orígenes y conformaciones de los ácidos nucleicos circulares (ANCir) presentes en el torrente sanguíneo, incluyendo sus marcas epigenéticas: el epigenoma circulante. Del lado izquierdo se observa un sujeto cuyo hígado, ya sea propio o trasplantado, normal o tumoral, aporta moléculas informativas al torrente sanguíneo, tanto de las células nucleadas como de mitocondrias. A la derecha (arriba) se observa que el microbioma presente –constante o temporalmente– en su intestino, está compuesto por bacterias, hongos y virus, los cuales contribuyen con sus propios ácidos nucleicos a la circulación sanguínea. En la parte de abajo (derecha), se observan los ANCir –tanto ADN como ARN, endógenos y exógenos– en distintas conformaciones y con distintas marcas epigenéticas como metilación o acetilación, presentes en los vasos sanguíneos del sujeto. Al centro se observan distintas fuentes de ANCir procedentes de la alimentación.

Las biopsias líquidas, como también se le conoce al análisis de plasma y suero sanguíneos, presentan varias ventajas sobre las biopsias de tejidos: (1) son de fácil acceso, (2) no están sujetas al sesgo de la biopsia, y (3) se pueden extraer varias veces del mismo paciente.

El análisis del epigenoma circulante, en particular de los perfiles de metilación y de expresión de ncRNAs específicos de una enfermedad, permite la detección y distinción entre etapas de diversas enfermedades multifactoriales, por lo que actualmente se considera como posible biomarcador.

Los retos para la aplicación clínica rutinaria de este tipo de análisis continúan siendo las variaciones técnicas, biológicas y metodológicas —resultante de las réplicas técnicas, el manejo de las muestras y los protocolos de preparación.

El desarrollo, aplicación y perfeccionamiento de tecnologías novedosas como el MCTA-Seq, que permiten el análisis de la información del epigenoma circulante, posibilitará la determinación sanguínea del tejido de origen alterado, lo que permitiría la detección temprana de patologías como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas.

De hecho, el desarrollo de una prueba universal y poco invasiva para la detección a nivel poblacional de enfermedades, en individuos pre-sintomáticos, basada en el análisis de miRNAs de distintos tejidos en circulación sanguínea se ha propuesto recientemente. Dicha prueba, aunque no distinguiría la enfermedad particular, evidenciaría la presencia de una patología en un órgano, tejido o tipo celular particular. Con ello se podrían realizar pruebas específicas para determinar con precisión la naturaleza de la enfermedad.

Finalmente, estas estrategias incluirán el análisis de ANcir exógenos provenientes de los alimentos y del microbioma con capacidad regulatoria sobre la expresión génica de los organismos blanco, generando nuevas líneas de investigación que aborden las condiciones normales y patológicas desde una perspectiva compleja, ecológico-evolutiva, integrada en el estudio y análisis del exoepigenoma.

Referencias

Agliullina DG, Estulina LA, Vinter VG. [Secondary structure of RNA secreted by Ehrlich ascites carcinoma cells]. *Biokhimiia* 1979 Aug;44(8):1409-15.

Agliullina DG, Lapina LA, Vinter VG. [Changes in the RNA content of the blood plasma in rats with Ehrlich ascitic cancer]. *Eksp Onkol* 1988;10(4):49-51, 62.

Agliullina DG, Vegner EO, Lapina LA, Vinter VG. [Characteristics of nucleic acid secreted by Ehrlich ascites carcinoma cells]. *Eksp Onkol* 1984;6(2):29-32.

Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin Chim Acta* 2001 Nov;313(1-2):143-6.

Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? *Int J Cancer* 2003 Jan 10;103(2):149-52.

Anker P, Stroun M. Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test? *Clin Chem* 2002 Aug;48(8):1210-1.

Antony H, Wiegmans AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2012 Jun;31(1-2):1-19.

Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 1944 Feb 1;79(2):137-58.

Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2012 Nov;40(21):10937-49.

Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med* 2016 Apr 27.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007 Feb 23;128(4):669-81.

Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 2004 Apr;25 Suppl A:S93-S101.

Botta-Orfila T, Morato X, Compta Y, Lozano JJ, Falgas N, Valldeoriola F, et al. Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2014 Aug;92(8):1071-7.

Burgos K, Malenica I, Metpally R, Courtright A, Rakela B, Beach T, et al. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS One* 2014;9(5):e94839.

Chakrabortee S, Kayatekin C, Newby GA, Mendillo ML, Lancaster A, Lindquist S. Luminidependens (LD) is an Arabidopsis protein with prion behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 May 24;113(21):6065-70.

Charlton J, Williams RD, Weeks M, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, et al. Methylome analysis identifies a Wilms tumor epigenetic biomarker detectable in blood. *Genome Biol* 2014;15(8):434.

Chin AR, Fong MY, Somlo G, Wu J, Swiderski P, Wu X, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Res* 2016 Feb;26(2):217-28.

Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem* 2003 May;49(5):719-26.

Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015 Apr;40:89-96.

Crowell J, Hughson A, Caughey B, Bessen RA. Host Determinants of Prion Strain Diversity Independent of Prion Protein Genotype. *J Virol* 2015 Oct;89(20):10427-41.

Denham J, O'Brien BJ, Marques FZ, Charchar FJ. Changes in the leukocyte methylome and its effect on cardiovascular-related genes after exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2015 Feb 15;118(4):475-88.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002 Aug 12;21(35):5400-13.

El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2004 Mar;50(3):564-73.

Fackler MJ, Lopez BZ, Umbricht C, Teo WW, Cho S, Zhang Z, et al. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2014 Apr 15;74(8):2160-70.

Franklin RE, Gosling RG. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 1953 Jul 25;172(4369):156-7.

Furuta K, Lichtenberger R, Helariutta Y. The role of mobile small RNA species during root growth and development. *Curr Opin Cell Biol* 2012 Apr;24(2):211-6.

Ghosh S, Sengupta S, Scaria V. Comparative analysis of human mitochondrial methylomes shows distinct patterns of epigenetic regulation in mitochondria. *Mitochondrion* 2014 Sep;18:58-62.

Ghosh S, Sengupta S, Scaria V. Hydroxymethyl cytosine marks in the human mitochondrial genome are dynamic in nature. *Mitochondrion* 2016 Mar;27:25-31.

Ghosh S, Singh KK, Sengupta S, Scaria V. Mitoepigenetics: The different shades of grey. *Mitochondrion* 2015 Nov;25:60-6.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvao LM, Chiari E. Trypanosoma cruzi: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998 Jan;88(1):28-33.

Guerrero-Preston R, Hadar T, Ostrow KL, Soudry E, Echenique M, Ili-Gangas C, et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep* 2014 Aug;32(2):505-12.

Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget* 2015 Nov 10;6(35):37043-53.

Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Decard BF, et al. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology* 2012 Nov 27;79(22):2166-70.

Hakimzadeh N, Nossent AY, van der Laan AM, Schirmer SH, de Ronde MW, Pinto-Sietsma SJ, et al. Circulating MicroRNAs Characterizing Patients with Insufficient Coronary Collateral Artery Function. *PLoS One* 2015;10(9):e0137035.

Halfmann R, Jarosz DF, Jones SK, Chang A, Lancaster AK, Lindquist S. Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* 2012 Feb 16;482(7385):363-8.

Halfmann R, Jarosz DF, Jones SK, Chang A, Lancaster AK, Lindquist S. Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* 2012 Feb 16;482(7385):363-8.

Halfmann R, Lindquist S. Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* 2010 Oct 29;330(6004):629-32.

Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000 Nov 1;260(2):248-56.

Heyn H, Vidal E, Ferreira HJ, Vizoso M, Sayols S, Gomez A, et al. Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. *Genome Biol* 2016;17:11.

Huang G, Krock JD, Kirk JL, Merwat SN, Ju H, Soloway RD, et al. Evaluation of INK4A promoter methylation using pyrosequencing and circulating cell-free DNA from patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2014 Jun;52(6):899-909.

Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013;14:319.

Huang Y, Gao S, Wu S, Song P, Sun X, Hu X, et al. Multilayered molecular profiling supported the monoclonal origin of metastatic renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2014 Jul 1;135(1):78-87.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 2009 Feb;41(2):178-86.

Jang G, Lee JY. Intercellular trafficking of transcription factors in the vascular tissue patterning. *Physiol Plant* 2014 Jun;151(2):184-91.

Jenjaroenpun P, Kremenska Y, Nair VM, Kremenskoy M, Joseph B, Kurochkin IV. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ* 2013;1:e201.

Jensen TJ, Kim SK, Zhu Z, Chin C, Gebhard C, Lu T, et al. Whole genome bisulfite sequencing of cell-free DNA and its cellular contributors uncovers placenta hypomethylated domains. *Genome Biol* 2015;16:78.

Jiang M, Sang X, Hong Z. Beyond nutrients: food-derived microRNAs provide cross-kingdom regulation. *Bioessays* 2012 Apr;34(4):280-4.

Johnson PJ, Lo YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002 Aug;48(8):1186-93.

Kabani M, Melki R. More than just trash bins? Potential roles for extracellular vesicles in the vertical and horizontal transmission of yeast prions. *Curr Genet* 2016 May;62(2):265-70.

Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* 2011;9:86.

Khoo SK, Petillo D, Kang UJ, Resau JH, Berryhill B, Linder J, et al. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2012;2(4):321-31.

Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Sep;945:172-8.

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999 Aug;5(8):1961-5.

- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997;76(10):1293-9.
- Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013;8(7):e69807.
- Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 Mar 29;113(13):E1826-E1834.
- Li X, Zhou F, Jiang C, Wang Y, Lu Y, Yang F, et al. Identification of a DNA methylome profile of esophageal squamous cell carcinoma and potential plasma epigenetic biomarkers for early diagnosis. *PLoS One* 2014;9(7):e103162.
- Liu Y, Chen S, Zhang J, Shan S, Chen L, Wang R, et al. Analysis of Serum MicroRNAs as Potential Biomarker in Coronary Bifurcation Lesion. *Dis Markers* 2015;2015:351015.
- Lo KW, Lo YM, Leung SF, Tsang YS, Chan LY, Johnson PJ, et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chem* 1999 Aug;45(8 Pt 1):1292-4.
- Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 2000 Oct;38(10):3830-3.
- Lui YY, Dennis YM. Circulating DNA in plasma and serum: biology, preanalytical issues and diagnostic applications. *Clin Chem Lab Med* 2002 Oct;40(10):962-8.
- Lui YY, Woo KS, Wang AY, Yeung CK, Li PK, Chau E, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem* 2003 Mar;49(3):495-6.
- Mamrut S, Avidan N, Staun-Ram E, Ginzburg E, Truffault F, Berrih-Aknin S, et al. Integrative analysis of methylome and transcriptome in human blood identifies extensive sex- and immune cell-specific differentially methylated regions. *Epigenetics* 2015;10(10):943-57.
- March ZM, King OD, Shorter J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res* 2016 Mar 18.
- Martínez-Ezquerro JD. Consecuencias de la transferencia horizontal de genes en la evolución genómica eucarionte. UNAM. Facultad de Ciencias; 2010.
- Martínez-Ezquerro JD, Trejo-Becerril C, Dueñas-González A. El ADN circulante y su potencial clínico. *Ciencia* 2007;59(1):64-73.

Masotti A, Baldassarre A, Fabrizi M, Olivero G, Loreti MC, Giammaria P, et al. Oral glucose tolerance test unravels circulating miRNAs associated with insulin resistance in obese preschoolers. *Pediatr Obes* 2016 Apr 5.

Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K. Epigenome mapping in normal and disease States. *Circ Res* 2010 Aug 6;107(3):327-39.

Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R. Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell* 2006 May 5;22(3):351-61.

Mezitt LA, Lucas WJ. Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol Biol* 1996 Oct;32(1-2):251-73.

Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 2010 May 14;328(5980):872-5.

Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002 Aug;48(8):1212-7.

Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, Bang-Berthelsen CH, Hansen L, Andersen ML, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:896362.

Nussbaum-Krammer CI, Park KW, Li L, Melki R, Morimoto RI. Spreading of a prion domain from cell-to-cell by vesicular transport in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2013 Mar;9(3):e1003351.

Ogoshi K, Hashimoto S, Nakatani Y, Qu W, Oshima K, Tokunaga K, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics* 2011 Oct;98(4):280-7.

Pacifici M, Delbue S, Kadri F, Peruzzi F. Cerebrospinal fluid MicroRNA profiling using quantitative real time PCR. *J Vis Exp* 2014;(83):e51172.

Parrizas M, Brugnara L, Esteban Y, Gonzalez-Franquesa A, Canivell S, Murillo S, et al. Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 Mar;100(3):E407-E415.

Pescador N, Perez-Barba M, Ibarra JM, Corbaton A, Martinez-Larrad MT, Serrano-Rios M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One* 2013;8(10):e77251.

Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 2014 Jan;9(1):3-12.

Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Oct;98(10):E1655-E1660.

Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* 2011 Aug;12(8):529-41.

Rao P, Benito E, Fischer A. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. *Front Mol Neurosci* 2013;6:39.

Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, et al. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One* 2013;8(12):e80738.

Rodrigues Filho EM, Ikuta N, Simon D, Regner AP. Prognostic value of circulating DNA levels in critically ill and trauma patients. *Rev Bras Ter Intensiva* 2014 Jul;26(3):305-12.

Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990 Jul;86(1):69-74.

Sanchez-Mut JV, Heyn H, Vidal E, Moran S, Sayols S, Delgado-Morales R, et al. Human DNA methylomes of neurodegenerative diseases show common epigenomic patterns. *Transl Psychiatry* 2016;6:e718.

Santovito D, De N, V, Marcantonio P, Mandolini C, Paganelli C, Vitale E, et al. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 Sep;99(9):E1681-E1685.

Saplaoura E, Kragler F. Mobile Transcripts and Intercellular Communication in Plants. *Enzymes* 2016;40:1-29.

Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, Grummt I. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev* 2010 Oct 15;24(20):2264-9.

Scott KA, Hoban AE, Clarke G, Moloney GM, Dinan TG, Cryan JF. Thinking small: towards microRNA-based therapeutics for anxiety disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2015 Apr;24(4):529-42.

Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Abdullah L, Crawford F, Umansky SR. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study. *Aging (Albany NY)* 2013 Dec;5(12):925-38.

Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Crawford F, Mullan MJ, Abdullah L, Umansky SR. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)* 2012 Sep;4(9):590-605.

Sheinerman KS, Umansky S. Universal screening test based on analysis of circulating organ-enriched microRNAs: a novel approach to diagnostic screening. *Expert Rev Mol Diagn* 2015 Mar;15(3):329-38.

Sheinerman KS, Umansky SR. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci* 2013;7:150.

Sheinerman KS, Umansky SR. Early detection of neurodegenerative diseases: circulating brain-enriched microRNA. *Cell Cycle* 2013 Jan 1;12(1):1-2.

Si K, Lindquist S, Kandel ER. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* 2003 Dec 26;115(7):879-91.

Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep* 2012 May;39(5):6219-25.

Sorensen SS, Nygaard AB, Christensen T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia - an exploratory study. *Transl Neurodegener* 2016;5:6.

Sorensen SS, Nygaard AB, Nielsen MY, Jensen K, Christensen T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 2014 Dec;5(6):711-8.

Starikova I, Jamaly S, Sorrentino A, Blondal T, Latysheva N, Sovershaev M, et al. Differential expression of plasma miRNAs in patients with unprovoked venous thromboembolism and healthy control individuals. *Thromb Res* 2015 Sep;136(3):566-72.

Stoicea N, Du A, Lakis DC, Tipton C, Arias-Morales CE, Bergese SD. The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker. *Front Genet* 2016;7:11.

Sun K, Jiang P, Chan KC, Wong J, Cheng YK, Liang RH, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 Oct 6;112(40):E5503-E5512.

Sun R, Ku J, Jayakar H, Kuo JC, Brambilla D, Herman S, et al. Ultrasensitive reverse transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998 Oct;36(10):2964-9.

Sun R, Schilling W, Jayakar H, Ku J, Wang J, Rosenstraus M, et al. Simultaneous extraction of hepatitis C virus (HCV), hepatitis B virus, and HIV-1 from plasma and detection of HCV RNA by a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay designed for screening pooled units of donated blood. *Transfusion* 1999 Oct;39(10):1111-9.

Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966 Nov;45(11):1732-40.

Tuite MF. Yeast prions: Paramutation at the protein level? *Semin Cell Dev Biol* 2015 Aug;44:51-61.

Tuite MF, Serio TR. The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Dec;11(12):823-33.

Wang K, Li H, Yuan Y, Etheridge A, Zhou Y, Huang D, et al. The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota? *PLoS One* 2012;7(12):e51009.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953 Apr 25;171(4356):737-8.

Wen L, Li J, Guo H, Liu X, Zheng S, Zhang D, et al. Genome-scale detection of hypermethylated CpG islands in circulating cell-free DNA of hepatocellular carcinoma patients. *Cell Res* 2015 Nov;25(11):1250-64.

Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH. Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 May;82(10):3455-9.

Wieczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, Rhyner K, Perruchoud AP, Block LH. Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer Res* 1987 Dec 1;47(23):6407-12.

Wielscher M, Vierlinger K, Kegler U, Ziesche R, Gsur A, Weinhausel A. Diagnostic Performance of Plasma DNA Methylation Profiles in Lung Cancer, Pulmonary Fibrosis and COPD. *EBioMedicine* 2015 Aug;2(8):927-34.

Wong FC, Lo YM. Prenatal Diagnosis Innovation: Genome Sequencing of Maternal Plasma. *Annu Rev Med* 2016;67:419-32.

Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 2012 Jan;22(1):107-26.

Zhang Y, Wiggins BE, Lawrence C, Petrick J, Ivashuta S, Heck G. Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics* 2012;13:381.

Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci* 2012;8(1):118-23.

Zhou Y, Schmitz KM, Mayer C, Yuan X, Akhtar A, Grummt I. Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nat Cell Biol* 2009 Aug;11(8):1010-6.

Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002 Oct;28(5):255-71.