

Papel de la epigenética en la epidemiología ambiental de las enfermedades crónicas

Arce Domingo Relloso

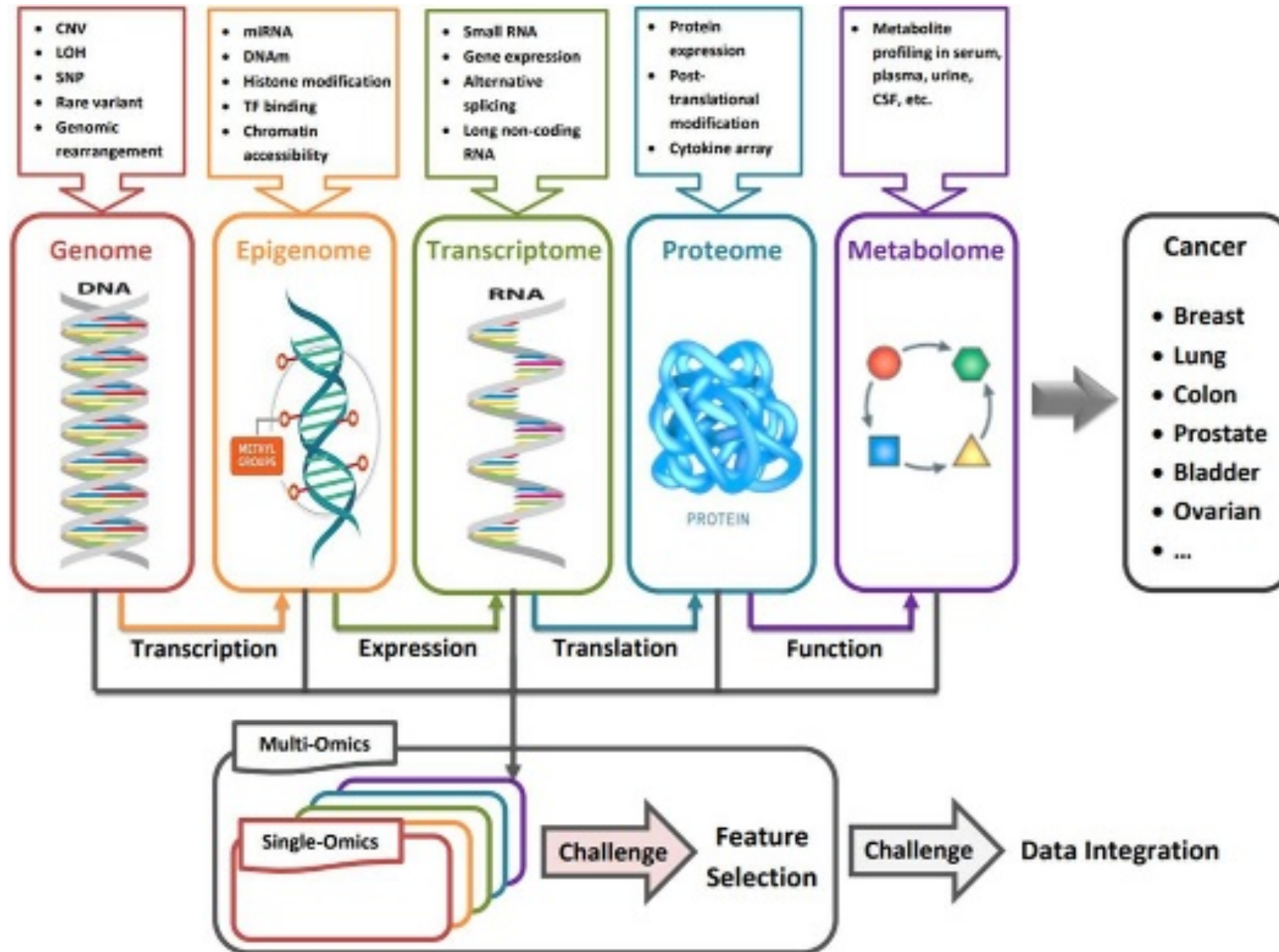
Seminario Centro Nacional de Epidemiología

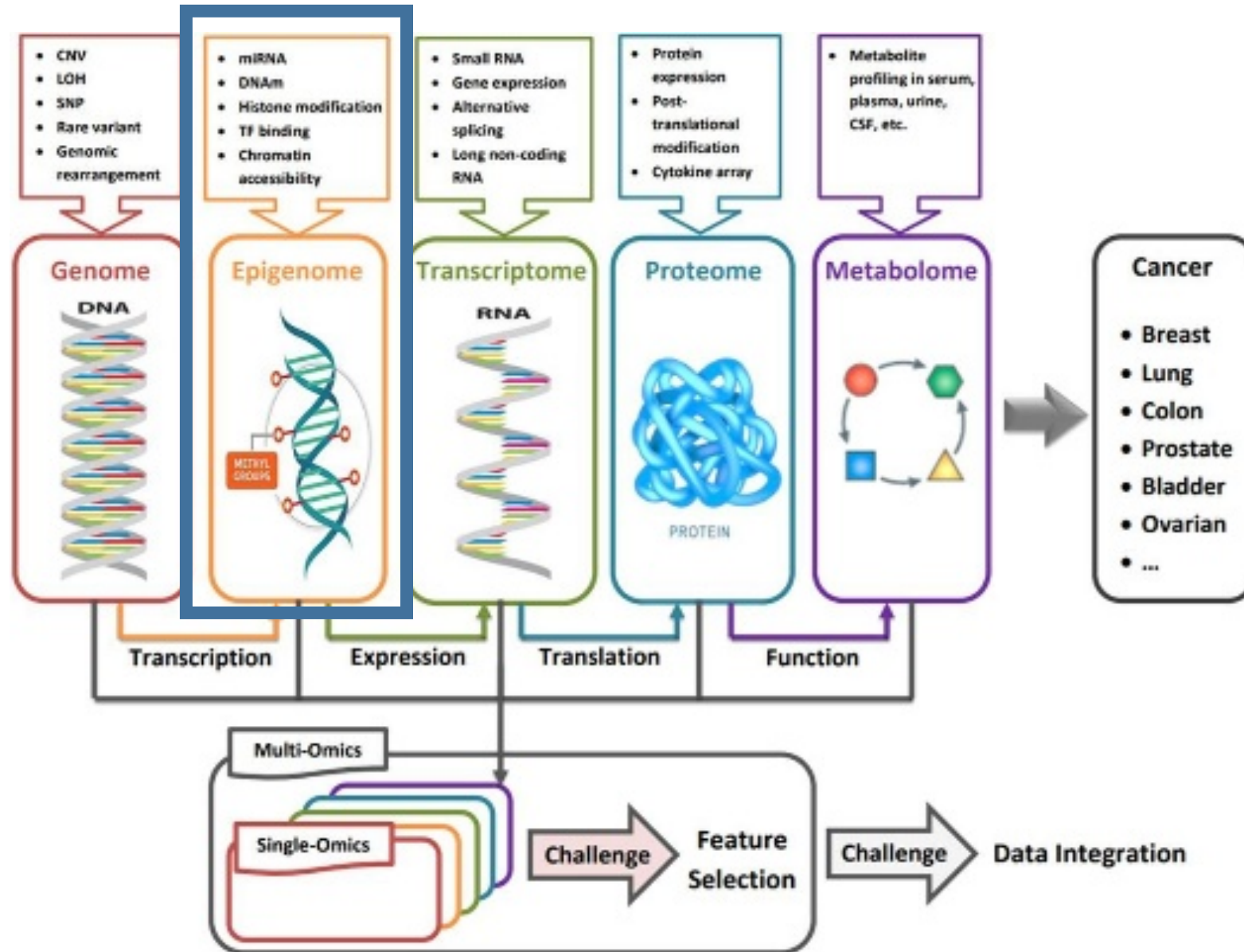
17 de marzo de 2022

Esquema general

- ❖ **INTRODUCCIÓN:** Datos ómicos, epigenética, retos y dificultades
- ❖ **POBLACIÓN DE ESTUDIO:** Strong Heart Study
- ❖ **PROYECTO 1:** Selección de variables en el contexto de datos ómicos
 - ❖ Aplicación: Arsénico, metilación del ADN y enfermedad cardiovascular
- ❖ **PROYECTO 2:** Modelo multimediador para mediadores correlacionados en el contexto de análisis de supervivencia
 - ❖ Aplicación: Tabaco, metilación del ADN y cancer de pulmón

INTRODUCCIÓN





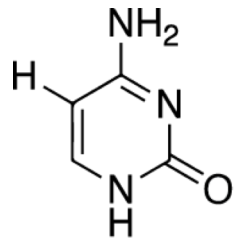
Epigenética y Metilación del ADN

- ❖ Cambios en la actividad de un segmento del ADN sin cambiar la secuencia genética
- ❖ Heredables, influyen en expresión génica, desregulan procesos biológicos
- ❖ Grandes determinantes: **factores ambientales**

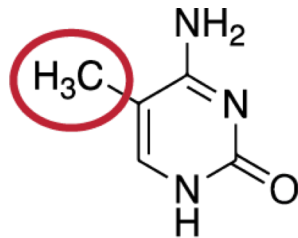


Epigenética y Metilación del ADN

- ❖ Cambios en la actividad de un segmento del ADN sin cambiar la secuencia genética
- ❖ Heredables, influyen en expresión génica, desregulan procesos biológicos
- ❖ Grandes determinantes: **factores ambientales**



Cytosine



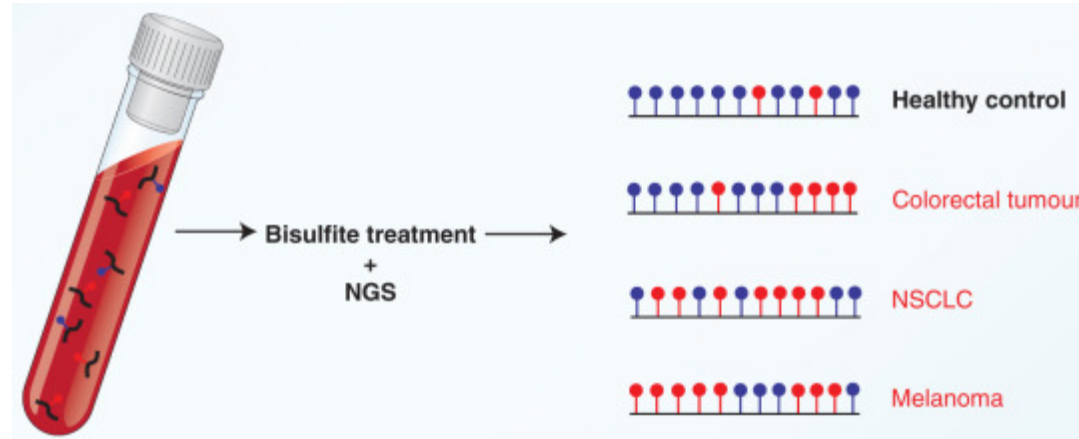
methylyated Cytosine

- ❖ **METILACIÓN DEL ADN:** Grupos metilos (CH₃) se adhieren a la molécula del ADN

Metilación del ADN en Investigación Clínica

1. Detección temprana de enfermedades: Biomarcadores basados en metilación

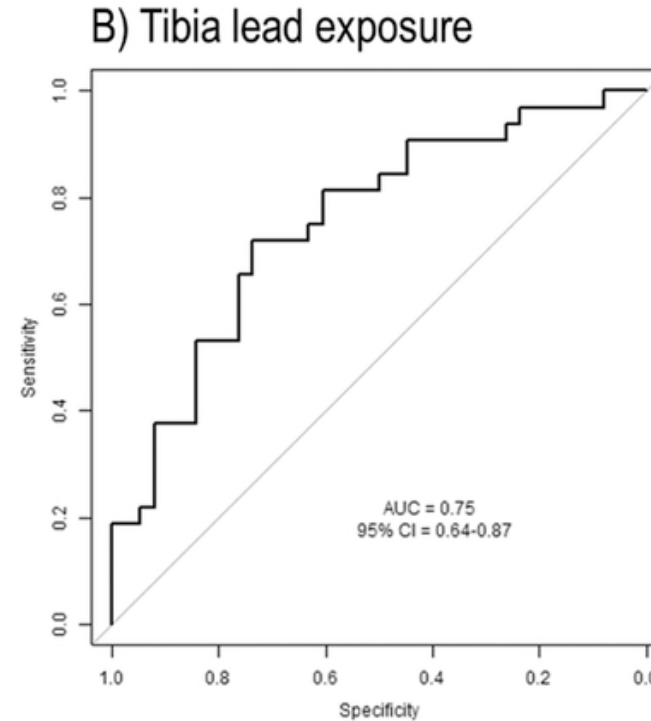
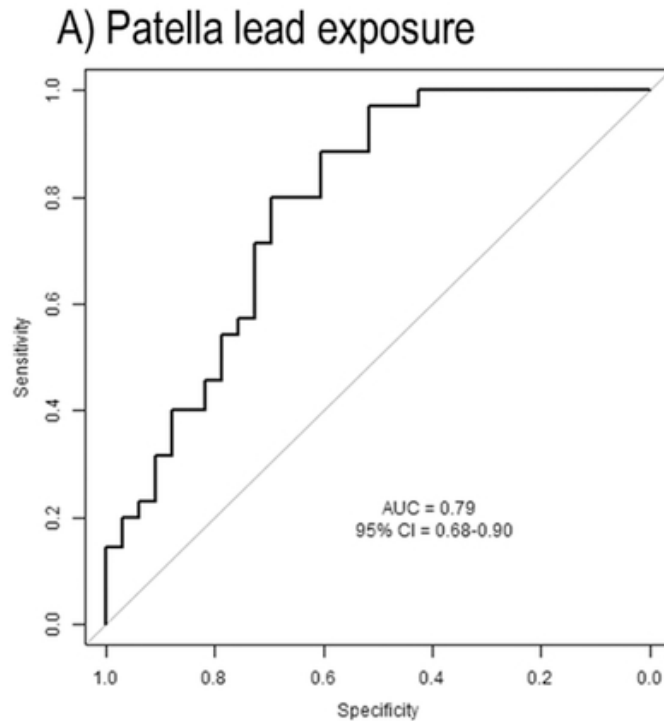
E.g: Epi proColon, detección temprana de cancer colorrectal



De la Cruz et al. 2018

Metilación del ADN en Investigación Clínica

2. Biomarcadores de exposición:

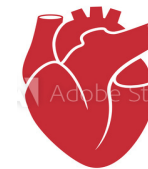
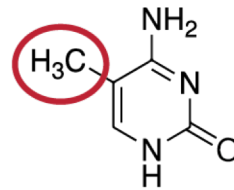
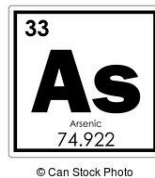


Colicino et al. 2021

Metilación del ADN en Investigación Clínica

3. Procesos biológicos involucrados en enfermedades

Propuesto como mecanismo intermedio en la asociación entre factores ambientales y diversas patologías



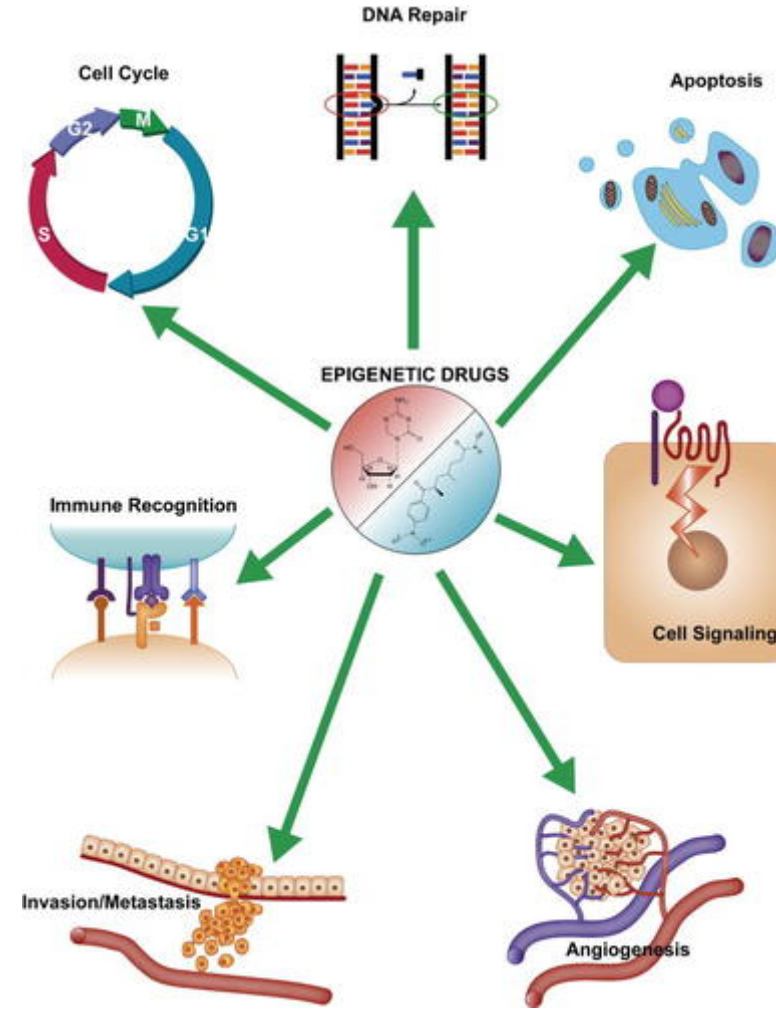
4. Farmacología epigenética:

Desarrollo de fármacos.

Reversibilidad de las marcas epigenéticas.

E.g.: Inhibidores de metiltransferasas de ADN

- “Epigene editing”



Fuente: Sigalotti et al. 2007

Retos de los Datos de Metilación del ADN

- ❖ **Preprocesamiento:** individuos informativos podrían ser eliminados en control de calidad
- ❖ **Especificidad de célula y tejido:** conteos celulares estimados
- ❖ **Datos de ultra-altas dimensiones:** cientos de miles de marcadores
- ❖ **Altas correlaciones**

Retos de los Datos de Metilación del ADN

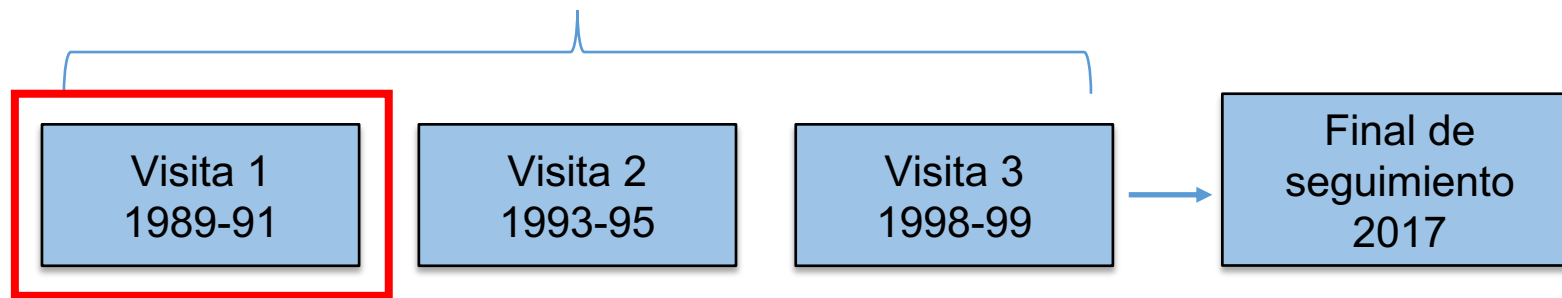
- ❖ **Preprocesamiento:** individuos informativos podrían ser eliminados en control de calidad
- ❖ **Especificidad de célula y tejido:** conteos celulares estimados
- ❖ **Datos de ultra-altas dimensiones:** cientos de miles de marcadores
- ❖ **Altas correlaciones**

POBLACIÓN DE ESTUDIO: THE STRONG HEART STUDY

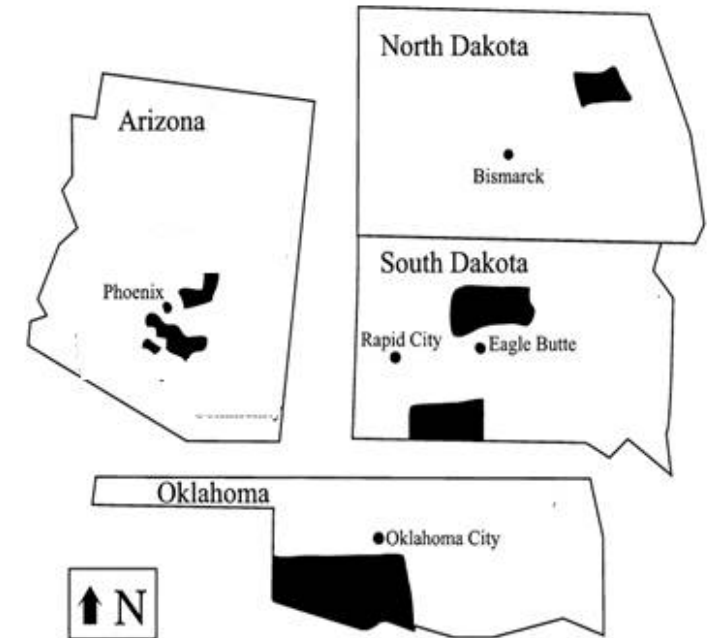
The Strong Heart Study



- ❖ Indios americanos de 12 tribus y > 4500 participants
- ❖ Seguimiento de CVD y cancer de al menos 30 años



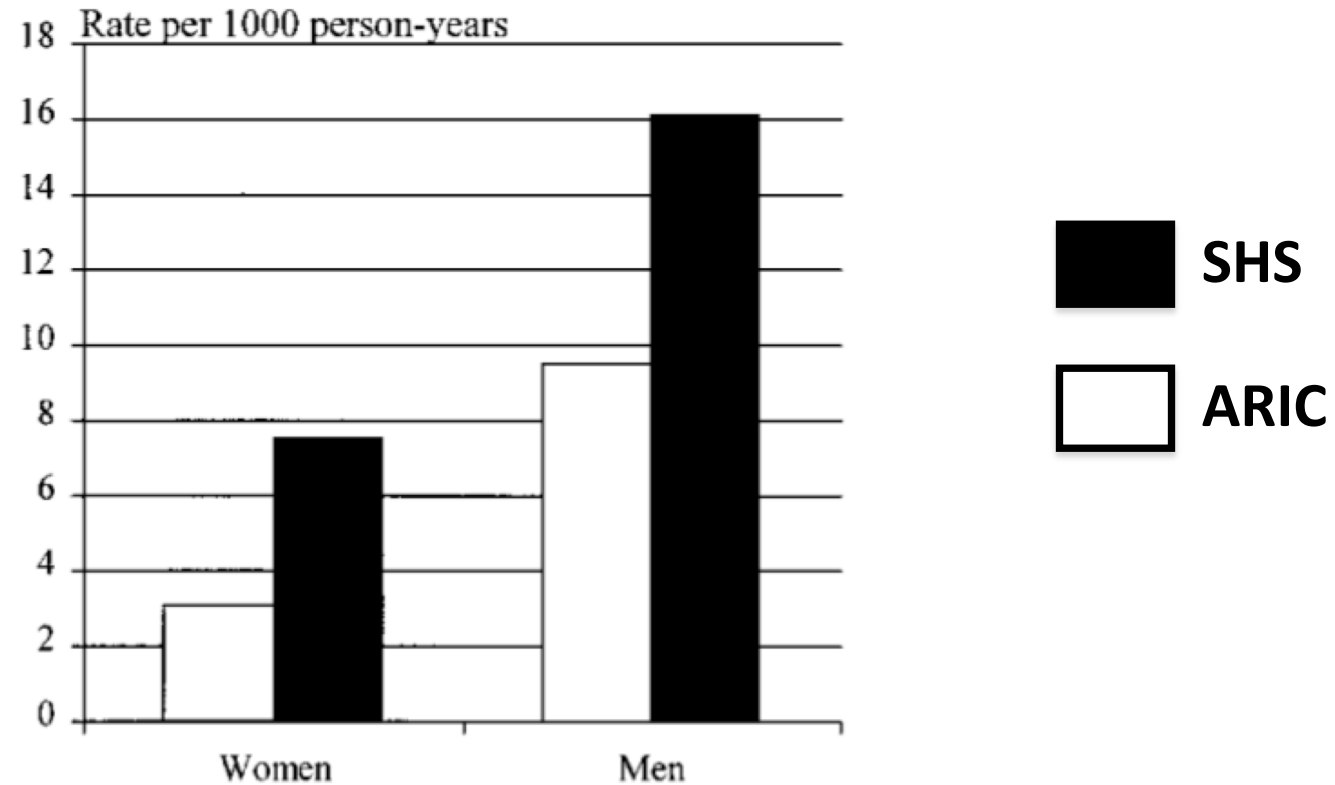
Arsénico en orina y metilación del ADN en sangre medidos en 2324 participantes y 788368 CpGs



Rising Tide of Cardiovascular Disease in American Indians : The Strong Heart Study

Barbara V. Howard, Elisa T. Lee, Linda D. Cowan, Richard B. Devereux, James M. Galloway, Oscar T. Go, William James Howard, Everett R. Rhoades, David C. Robbins, Maurice L. Sievers and Thomas K. Welty
Circulation 1999;99;2389-2395

- **Coronary Heart Disease (45-64 y)**

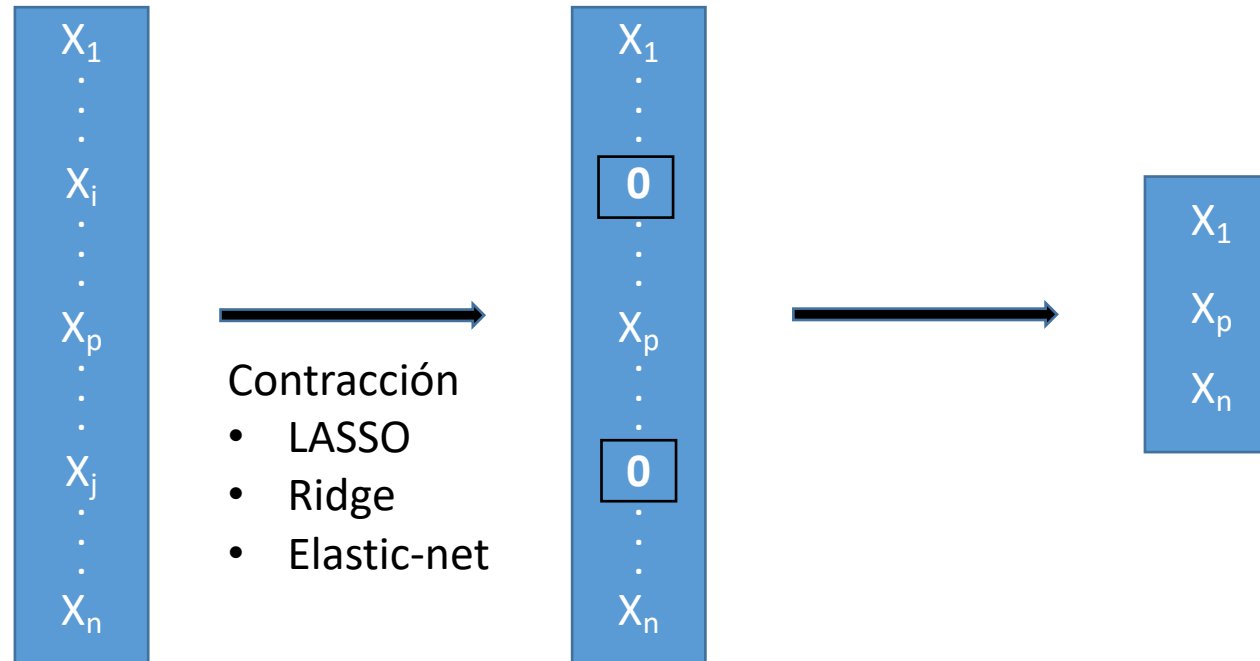


PROYECTO 1: SELECCIÓN DE VARIABLES EN EL CONTEXTO DE DATOS ÓMICOS

Selección de Variables en el Contexto de Datos Ómicos

OBJETIVO: Seleccionar variables conjuntamente relacionadas con la variable respuesta

Métodos de Regularización



$$\hat{\beta} = \arg \min_{\beta} (\|y - X\beta\|^2 + P(\beta))$$

Sure Independence Screening



Dr. Yang Feng

- ❖ **Propiedad “Sure Screening”**: alta probabilidad de que todas las variables importantes “sobrevivan” tras la selección
- ❖ Paquete *SIS* disponible en CRAN

APLICACIÓN: ARSÉNICO, METILACIÓN DEL
ADN Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN
EL STRONG HEART STUDY

Arsénico y CVD



→ **As** →

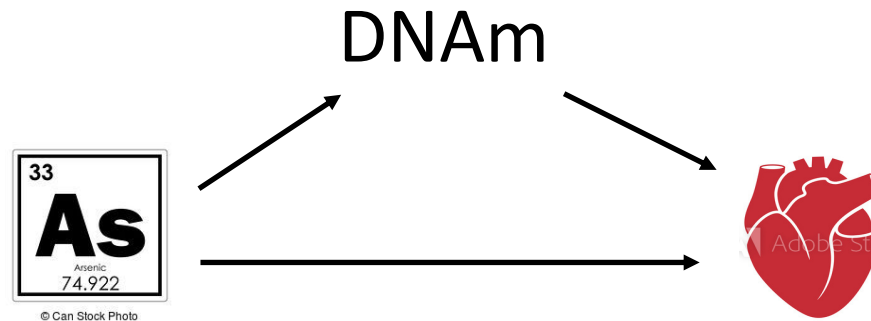


- **Alta exposición crónica:** Taiwan, Chile, Bangladesh
- **Exposición baja-moderada:** Strong Heart Study

- ❖ Evidencia en estudios experimentales en ratones
- ❖ Mecanismos: inflamación, estrés oxidativo, factores de riesgo CVD, **mecanismos epigenéticos**

Papel Mediador de la Metilación del ADN

- ❖ Exposición a arsénico asociada con cambios en DNAm globales y específicos (**Bozack et al 2020**)
- ❖ Cambios en DNAm asociados con CVD y factores de riesgo
- ❖ **OBJETIVO:** estudiar el potencial papel mediador de DNAm en la asociación entre As y CVD



Métodos Estadísticos

1. SIS para seleccionar CpGs asociadas con CVD

DNAm
(788368 CpGs)



- Incidencia CVD: 61 CpGs seleccionadas
- Mortalidad CVD: 74 CpGs seleccionadas

Métodos Estadísticos

1. SIS para seleccionar CpGs asociadas con CVD

DNAm
(788368 CpGs)



- Incidencia CVD: 61 CpGs seleccionadas
- Mortalidad CVD: 74 CpGs seleccionadas

Métodos Estadísticos

1. SIS para seleccionar CpGs asociadas con CVD

DNAm
(788368 CpGs)



- Incidencia CVD: 61 CpGs seleccionadas
- Mortalidad CVD: 74 CpGs seleccionadas

2. Análisis de Mediación: CpGs seleccionadas por SIS + asociadas con As en SHS

Modelo de riesgos aditivos de Aalen: Cuantifican efectos indirectos como número de eventos atribuibles a la exposición a través del mediador

Resultados: Mediación

❖ Efectos mediados significativos para 21 CpGs

CpG	Gen	Función	Efecto mediado por DNAm (95 % CI)*	Efecto relativo mediado por DNAm (%) (95 % CI)
cg01270753	<i>TGFBR1</i>	Biomarcador de pronóstico tras infarto. Asociado con enfermedad aórtica	43.9 (13.6, 82.9)	18.0 (4.7, 70.6)
cg03362418	<i>TYMP</i>	Angiogénesis. Posible objetivo para terapia CVD	40.1 (9.1, 78.6)	17.4 (2.8, 78.0)
cg23027596	<i>UBAC1</i>	Síntesis y secreción de insulina	39.9 (11.1, 74.6)	17.6 (3.5, 80.4)
cg06970472	<i>APBB2</i>	Secreción de insulina, funciones de células beta	27.8 (7.7, 54.8)	11.9 (2.6, 52.3)
cg18618815	<i>COL1A1</i>	Componente de matriz extracelular	23.7 (4.8, 49.8)	10.7 (1.2, 54.9)

Modelos ajustados por edad, sexo, IMC, tabaco, colesterol LDL, centro de estudio, conteos celulares, PCs genéticas

*Número de casos de CVD atribuibles al doble de la dosis de As a través de DNAm por cada 100,000 personas-año

Resultados

REPLICACIÓN:

❖ **Poblaciones:**

- ❖ Framingham Heart Study
- ❖ Atherosclerosis Risk in Communities
- ❖ Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis

❖ **Modelo animal: ratones**

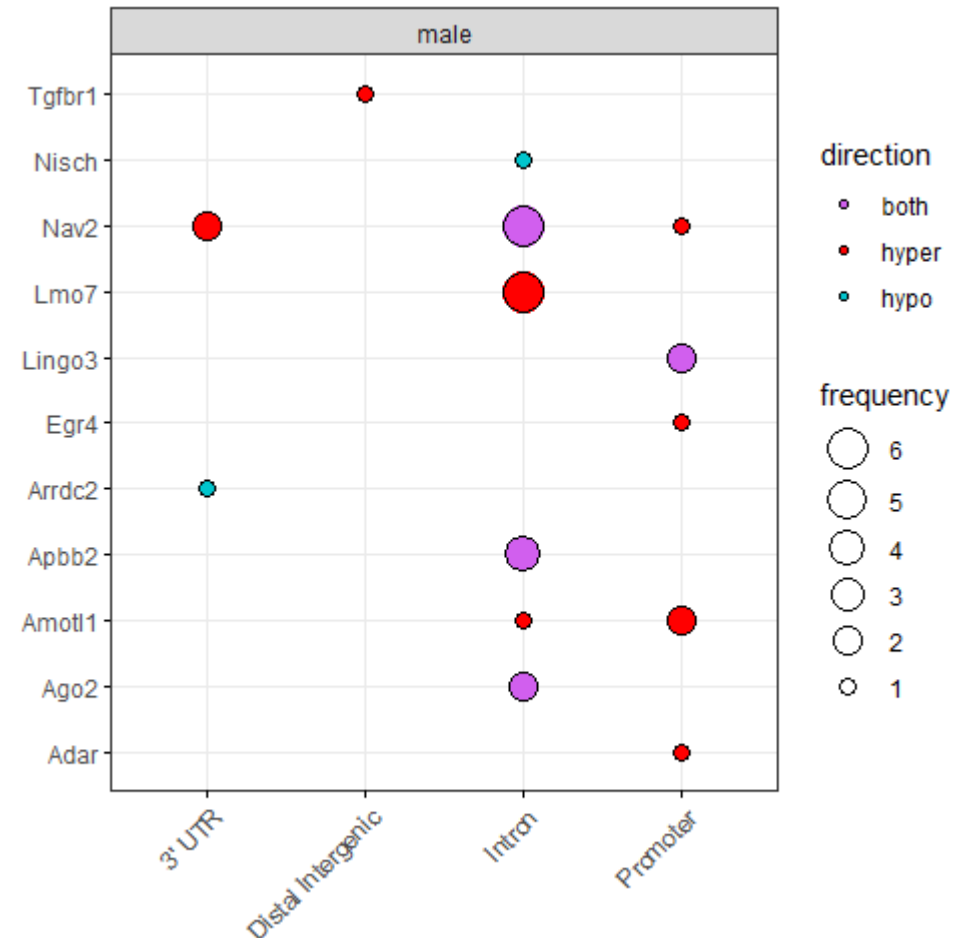
Replicación CVD

CpG	Gen	SHS	FHS	WHI	MESA
cg01542019	<i>TECR</i>	1.14 (0.96, 1.36)	1.06 (0.74, 1.52)	1.26 (1.03, 1.54)	1.59 (0.78, 3.25)
cg03497652	<i>ANKS3</i>	1.50 (1.24, 1.82)	2.32 (1.58, 3.40)	1.15 (0.91, 1.44)	2.36 (1.10, 5.06)
cg14827056	<i>EIF2C2</i>	1.41 (1.17, 1.69)	1.47 (1.01, 2.13)	1.21 (0.95, 1.54)	1.41 (0.68, 2.89)
cg17608381	<i>HLA-A</i>	0.77 (0.64, 0.92)	0.62 (0.45, 0.87)	0.88 (0.72, 1.07)	0.93 (0.50, 1.73)
cg19693031	<i>TXNIP</i>	0.51 (0.43, 0.59)	0.72 (0.50, 1.02)	0.76 (0.62, 0.92)	0.93 (0.50, 1.70)
cg22294740	<i>LINGO3</i>	1.42 (1.19, 1.69)	1.84 (1.31, 2.59)	1.21 (0.97, 1.50)	3.87 (2.03, 7.38)

Replicación: Modelo de Ratones

- ❖ Ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-})
- ❖ Modelo animal establecido para arterioesclerosis
- ❖ N=12 ratones (N=3 por sexo y grupo de tratamiento)
- ❖ Tejido hepático, Whole-Genome Bisulfite Sequencing

- ❖ *LMO7*: cardiomiopatías
- ❖ *NAV2*: presión arterial



Resultados: Funciones Biológicas de Genes

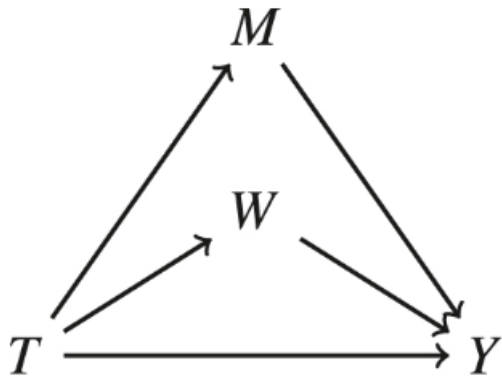
Diabetes	<i>UBAC1, APBB2, TXNIP, RELL1, EGR4, FGG, HLA-DQB1</i>
Objetivos terapéuticos para CVD	<i>TGFBR1, TYMP, ADAR, ADAR2</i>
Asociados con otros factores de riesgo de CVD	<i>C1RL, COL1A1, AMOTL1, LMO7</i>

Conclusiones

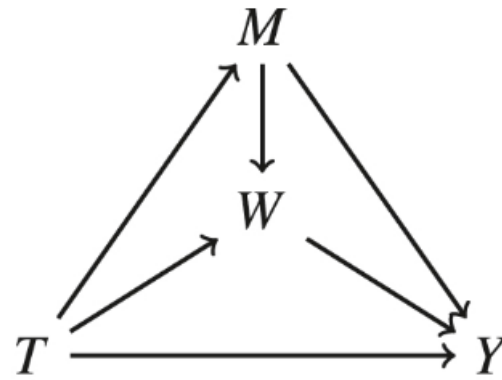
- ❖ La metilación diferencial podría ser parte de la conexión biológica entre arsénico y CVD
 - ❖ La **diabetes** podría ser un mecanismo importante para el riesgo de CVD asociado al arsénico
 - ❖ La exposición a arsénico modificó la metilación en los mismos genes identificados en sangre en los hígados de ratones con arterioesclerosis.
 - ❖ Las asociaciones de la metilación con CVD se replicaron en otras poblaciones
-

PROYECTO 2: MÚLTIPLES MEDIADORES
CORRELACIONADOS EN CONTEXTO DE
ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

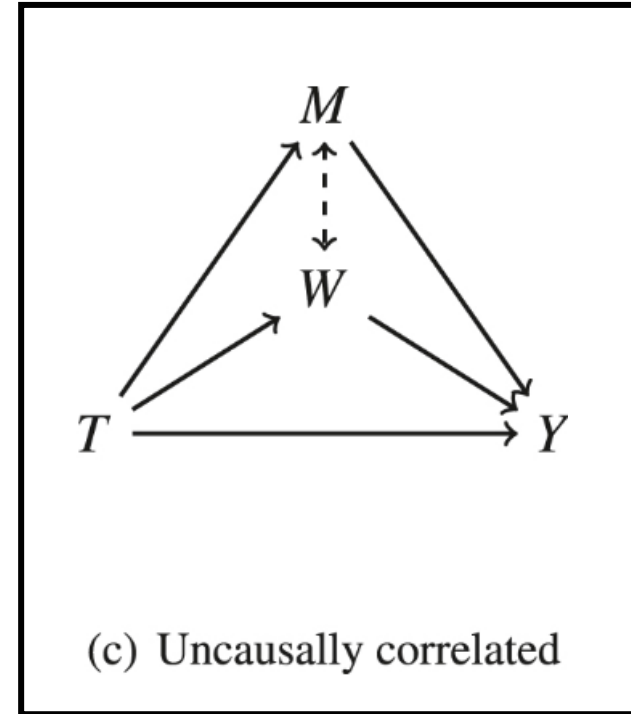
OBJETIVO: Evaluar múltiples mediadores altamente correlacionados en el contexto de análisis de supervivencia



(a) Independent



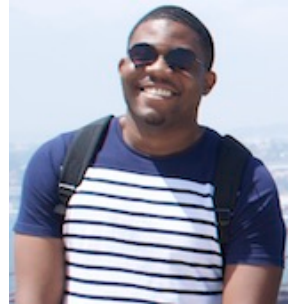
(b) Causally correlated



(c) Uncausally correlated

Jerolon et al. 2020

El algoritmo *multimediate*



Dr. Allan Jerolon

- ❖ Extensión de *multimediate* a datos de supervivencia: Modelos aditivos de Aalen

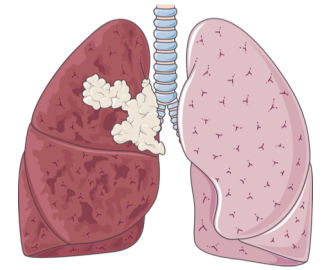
$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Modelo mediador: } M_i = \alpha_{1i} + \alpha_{2i} E + \alpha_{3i} X + \text{error}_i \\ \text{Modelo outcome: } Y = \lambda_0(t) + \lambda_1 E + \lambda_2 M + \lambda_3 X \end{array} \right.$$

- **Modelo outcome:** Modelo de riesgos aditivos de Aalen
- **Modelo mediador:** Modelo lineal

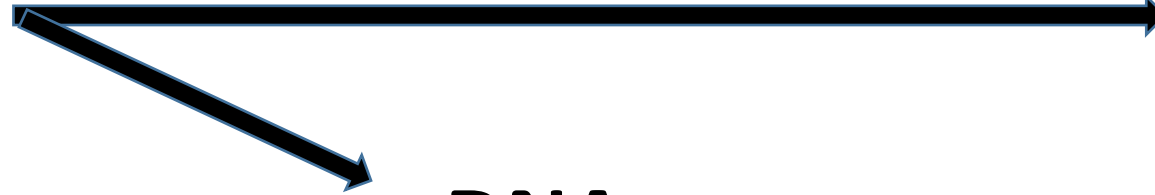
APLICACIÓN: TABACO, METILACIÓN DEL ADN Y CÁNCER



Cancer



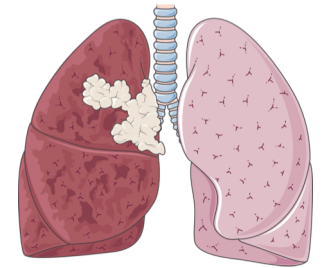
- ❖ Asociado con 14 tipos de cancer
- ❖ 36 % de las muertes por tabaco
- ❖ 80-90 % de las muertes por cancer de pulmón



DNAm

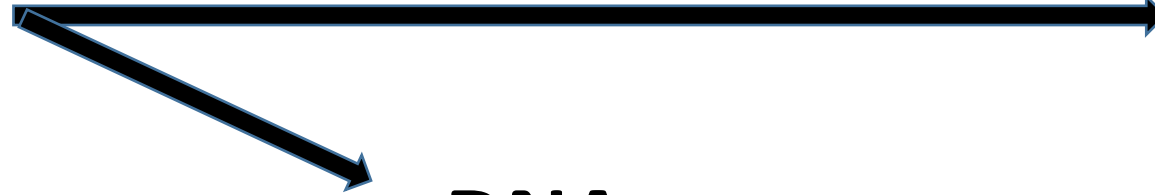


Cancer

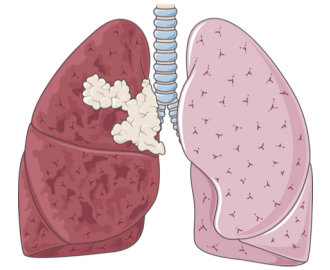


- ❖ Asociado con 14 tipos de cancer
- ❖ 36 % de las muertes por tabaco
- ❖ 80-90 % de las muertes por cancer de pulmón

- ❖ Cambia la regulación de la expresion génica a patrones patológicos
- ❖ Se desregula en fases tempranas de la oncogénesis



Cancer



DNAm



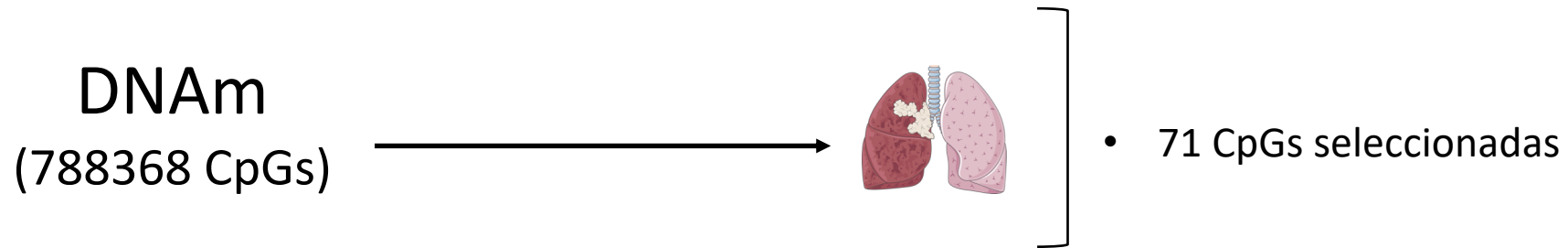
- ❖ Asociado con 14 tipos de cancer
- ❖ 36 % de las muertes por tabaco
- ❖ 80-90 % de las muertes por cancer de pulmón

- ❖ Cambia la regulación de la expresion génica a patrones patológicos
- ❖ Se desregula en fases tempranas de la oncogénesis

OBJETIVO: potencial papel mediador de la metilación en la asociación entre tabaco y cancer de pulmón

Métodos Estadísticos

1. SIS para seleccionar CpGs asociadas con cancer de pulmón

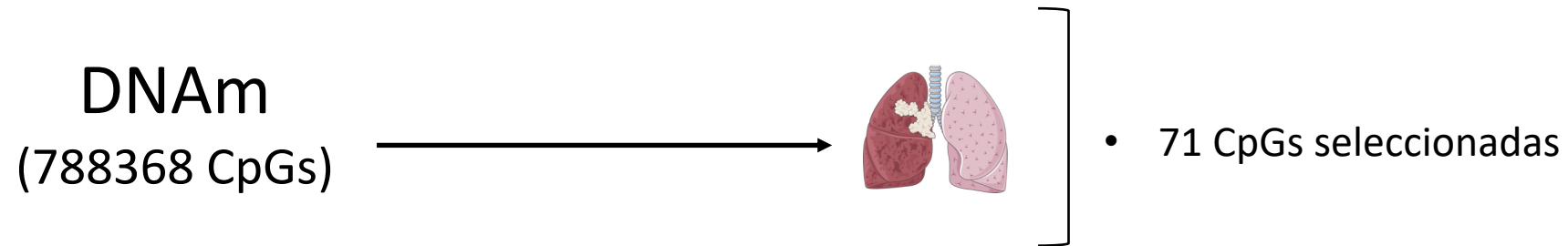


2. Análisis de mediación: CpGs seleccionadas por SIS + asociadas con tabaco en el SHS

- **Replicación** en Framingham Heart Study

Métodos Estadísticos

1. SIS para seleccionar CpGs asociadas con cancer de pulmón



2. Análisis de mediación: CpGs seleccionadas por SIS + asociadas con tabaco en el SHS

- **Replicación** en Framingham Heart Study

3. Modelo multimediador

Resultados: Mediación Simple

- ❖ Efecto mediado significativo en 28 CpGs en SHS, 14 replicadas en FHS

CpG	Gen	Strong Heart Study		Framingham Heart Study	
		Efecto mediado por DNAm (95 % CI)	Efecto relativo mediado por DNAm (95 % CI)	Efecto mediado por DNAm (95 % CI)	Efecto relativo mediado por DNAm (95 % CI)
cg05575921	<i>AHRR</i>	253.9 (167.3, 342.3)	76.5 (50.9, 113.6)	207.7 (65.7, 350.1)	68.8 (23.2, 172.8)
cg03636183	<i>F2RL3</i>	136.9 (79.9, 195.5)	41.0 (24.3, 63.9)	191.4 (57.5, 326.1)	63.9 (20.5, 162.1)
cg21566642	<i>ALPG</i>	152.9 (85.9, 221.3)	45.5 (25.3, 73.7)	172.2 (71.3, 273.7)	57.3 (24.2, 142.2)
cg24859433	<i>IER3</i>	91.4 (49.2, 136.4)	26.7 (14.7, 42.3)	95.3 (21.8, 169.6)	32.1 (7.9, 84.7)
cg01940273	<i>ALPG</i>	107.0 (47.9, 167.2)	31.9 (14.0, 56.2)	93.4 (12.5, 174.5)	31.7 (4.4, 89.4)

Modelos ajustados por edad, sexo, BMI, centro de estudio, conteos celulares y PCs genéticas

Resultados: Mediación Múltiple

	Gen	Efecto mediado por DNAm (95 % CI)	Efecto relativo mediado por DNAm (95 % CI)
Efecto mediado conjunto	-	291.8 (197.8, 386.9)	79.1 (53.4, 116.5)
cg05575921	<i>AHRR</i>	205.9 (116.3, 295.9)	55.7 (29.5, 94.6)
cg24859433	<i>IER3</i>	59.9 (17.2, 104.2)	16.2 (4.6, 31.9)
cg11902777	<i>AHRR</i>	25.9 (10.4, 42.8)	6.9 (2.8, 13.4)

Efecto directo del tabaco en cancer de pulmón: 77.7 (-45.8, 203.3)

Efecto total del tabaco en cancer de pulmón: 369.5 (250.2, 489.9)

Conclusiones

- ❖ Gran parte del efecto del tabáco en cáncer de pulmón podría estar mediado por cambios en metilación
 - ❖ Limitación: las transformaciones oncogénicas podrían empezar muchos años antes del diagnóstico
-

Comentarios Finales

- ❖ La metilación del ADN podría ser un mecanismo intermedio importante entre exposiciones ambientales y enfermedades

RETOS / DIFICULTADES

- ❖ Mecanismo causal o biomarcador?
- ❖ Poco consenso en diferentes poblaciones
- ❖ Confusores no medidos: asunciones de la inferencia causal

PROYECTOS EN PROGRESO

- ❖ Diabetes, función pulmonar, onco-cardiología
- ❖ Heredabilidad de la metilación del ADN

Agradecimientos

Centro Nacional de Epidemiología
Maria Tellez-Plaza

Columbia University Mailman School (NY, USA)
Ana Navas-Acien, Research group

Texas Biomedical Research Institute (TX, USA)
Karin Haack, Shelley Cole

Lady Davis Institute (Montreal, Canada)
Kiran Makhani, Koren K Mann

New York University (NY, USA)
Yang Feng

Universidad de Valencia
Jose Bermúdez

Financiación

La Caixa Foundation (ID 100010434)

INCLIVA Biomedical Research (Valencia, Spain)
Miguel Herreros

UC Berkeley (CA, USA)
Anne K Bozack

University of Paris Descartes
Allan Jerolon

Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (NC, USA)
Yongmei Liu, Kurt Lohman, Jerome Rotter

The Framingham Heart Study (MA, USA)
Roby Joehanes, Daniel Levy

CHARGE consortium



"la Caixa" Foundation

