

Epigenética, cáncer y farmacogenética
Jesús García-Foncillas
Departamento de Oncología.
Clínica Universidad de Navarra, Pamplona.

Epigenética

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000–1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN–metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN. En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (figura 1).

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes tumor supresor. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre–expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis.

Las estrategias metodológicas para el análisis del estado metilado de las islas CpG han estado en constante evolución y actualmente se cuenta con diversas técnicas que comparten estándares universales, óptima sensibilidad y reproducibilidad. El éxito de la mayoría de los métodos depende de la transformación química de las

citocinas no metiladas a uracilos, por el tratamiento con bisulfito de sodio, que no afecta las 5-metilcitocinas, y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación automatizada son las técnicas más usadas con este propósito.

En los últimos años la tecnología basada en el análisis del ADN metilado es considerada una poderosa herramienta para el diagnóstico, terapia y pronóstico de enfermedad, así como en el campo de la medicina forense, farmacogenética y en estudios epidemiológicos. La asociación entre el estado hipometilado del ADN y cáncer, y posteriormente su relación con la hipermetilación, se conocen desde 1983; sin embargo, en los últimos cinco años, por el impulso de las nuevas estrategias moleculares para el estudio de la metilación *de novo* de las islas CpG, el análisis del ADN metilado se ha convertido en un poderoso biomarcador para la detección temprana de cáncer; además, permite clasificar los cánceres considerando los subtipos histológicos, el grado de malignidad, diferencias en la respuesta al tratamiento y, los diversos pronósticos. Una importante y reciente aplicación es precisamente su uso como biomonitor de respuesta a la terapia y predictor del pronóstico del cáncer.

En la actualidad, los cánceres de próstata, hígado, estómago, colon y mama son detectados, con alta especificidad, utilizando ADN obtenido de fluidos corporales (orina, plasma, suero, saliva, entre otros), sangre o biopsias de tejidos, mediante el análisis de la hipermetilación de genes, cuyos productos tienen diversas funciones como: proteínas tumor supresor (*INK4A*, *INK4B*, *APC*), enzimas (*GSTP1*, *MGMT*, *DAPK1*), receptores (*RARB*), asociadas a muerte celular programada (*DAPK1*), adhesión celular (*CDH1*), y reguladoras de cinasas (*CCND2*).

La metilación del ADN es un marcador epigenético del silenciamiento de genes con aplicación en diversos campos de investigación de la genética y la biomedicina, que mediante la aplicación de procesos metodológicos moleculares permite la distinción fidedigna e individual de los patrones de metilación de las islas CpG. Es indiscutible el impacto del uso de biomarcadores de metilación en la detección oportuna de un gran número de cánceres humanos cuando se encuentran en estadios tempranos, lo cual incide en la planificación de una estrategia terapéutica

específica. Por otra parte, de acuerdo a las características de metilación de los genes involucrados en la neoplasia permite la clasificación y el pronóstico de los cánceres, y la monitorización del tratamiento.

1.1. Definición de epigenética

La epigenética se define clásicamente como la herencia de cambios en los patrones de expresión génica sin cambios en la secuencia del DNA. Hay dos procesos epigenéticos con una importancia clave en la regulación génica, el desarrollo y la carcinogénesis: la metilación del DNA y las modificaciones de histonas.

Así, la regulación epigenética es esencial para el desarrollo normal de los organismos pluricelulares, cuyas células son genéticamente idénticas pero estructural y funcionalmente heterogéneas. A modo de ejemplo, en mamíferos la regulación epigenética está implicada en el silenciamiento de los genes imprintados y en la inactivación del cromosoma X en las hembras. Además, la epigenética está implicada en el silenciamiento de secuencias endoparásitas como los elementos transponibles.

A pesar de ser potencialmente heredables, las modificaciones epigenéticas son reversibles y se ven afectadas por las condiciones ambientales y por el envejecimiento. La importancia de los factores ambientales y su influencia sobre la epigenética se observa claramente en los gemelos homocigóticos que, a pesar de ser genéticamente idénticos, presentan diferencias fenotípicas y diferente susceptibilidad al desarrollo de enfermedades en función de sus hábitos de vida.

Así, cuanto más difieren determinados factores como la dieta, el tabaquismo, el consumo de fármacos o el estrés, más divergen los niveles globales de metilación en parejas de gemelos homocigóticos. Recientemente, la importancia de la epigenética se ha visto realzada al comprobarse que los patrones epigenéticos van cambiando durante la diferenciación, desde las células madre hasta las células ya diferenciadas y que estos patrones se pueden revertir en lo que se conoce como reprogramación de las células iPSs. (induced pluripotent stem cells, células madre pluripotentes inducidas).

Este proceso, también conocido como reprogramación “à la Yamanaka”, ha abierto todo un abanico de posibilidades terapéuticas, que podrían ser muy útiles en un futuro próximo.

1.2. Metilación del DNA

La metilación del DNA ocurre generalmente en las citosinas que se encuentran en el contexto del dinucleótido CpG, mediante la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo de citosina, siendo la modificación epigenética más estudiada en humanos (figura 2 y 3).

Se sabe que entre el 3 y el 6% de todas las citosinas están metiladas en el DNA normal. Las citosinas potencialmente metilables no están distribuidas en el genoma al azar sino que se concentran en regiones de alta densidad denominadas islas CpG (CpG islands), que generalmente colocalizan con el extremo 5' de los genes (pudiendo incluir el promotor, la región 5' no traducida y el exón 1).

Estas islas CpG están presentes en la región promotora de la mitad de los genes codificantes y generalmente se encuentran en estado no metilado en células normales, lo que permite la actividad génica cuando los factores de transcripción correspondientes están disponibles. Por el contrario, los sitios CpG esporádicos del resto del genoma están principalmente metilados.

- La metilación del DNA en células normales

La metilación del DNA es un fenómeno que ocurre en tejidos normales, como en genes específicos de tejido, en la línea germinal, en la inactivación del cromosoma X en mujeres y en la impronta genética (imprinting).

Además, las secuencias repetitivas del genoma están altamente metiladas promoviendo la estabilidad cromosómica. De esta forma se previenen las translocaciones, la inestabilidad y la disrupción génica que pueden producirse debido a la reactivación de secuencias endoparasíticas.

La impronta es el mecanismo que determina la expresión o represión de determinados genes como IGF2 (insulin-like growth factor 2; somatomedin A) o H19 (imprinted maternally expressed transcript; non-protein coding) en función de su origen parental, materno o paterno, de forma que sólo uno de los alelos se

expresa mientras que el otro permanece silenciado por metilación densa del promotor.

La expresión de un único alelo garantiza la dosis exacta en la célula de los genes regulados a través de este mecanismo. En cuanto a la inactivación del cromosoma X, es el mecanismo de compensación de dosis génica en hembras respecto de los machos. Se produce la condensación e inactivación de uno de los cromosomas de forma aleatoria en cada célula durante las primeras fases del desarrollo. Se caracteriza por la heterocromatinización del cromosoma X a partir de un punto denominado XIC (XInactivation Centre, Centro de Inactivación del X), desde donde se expanden las marcas de heterocromatina a lo largo de todo el cromosoma.

Finalmente, la metilación del DNA es requerida para conseguir la expresión específica de tejido de algunos genes, como los genes de la familia MAGE (melanoma antigen family) o la maspina, que sólo se expresan en determinados tejidos.

Los patrones de metilación se establecen durante el desarrollo embrionario. En concreto, durante el desarrollo preimplantacional se produce una onda de desmetilación del DNA y una reorganización de las marcas de histonas, seguida de una metilación de novo del DNA que se produce después de la implantación del embrión, hecho que determina el patrón epigenético del nuevo individuo. Esta reprogramación epigenética parece ser necesaria para la totipotencia celular, para la expresión génica y para el desarrollo temprano de los linajes celulares en el embrión.

- Enzimas involucradas en el proceso de metilación del DNA

La metilación la llevan a cabo unas enzimas denominadas DNMTs (DNA methyltransferases o metiltransferasas del DNA) que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta la posición 5 del anillo de la citosina (Fig. 8). Se han identificado 4 enzimas con actividad metiltransferasa, DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b. Todas las DNMTs comparten un dominio DNA metiltransferasa compuesto por 10 motivos con una secuencia muy conservada (figura 4).

La DNMT1 se ha relacionado con la metilación de mantenimiento, que tiene lugar tras cada ronda de replicación, para asegurar un patrón de metilación idéntico en ambas células hijas. Las DNMT3a y DNMT3b están implicados en la metilación de novo, que tiene lugar durante el desarrollo embrionario.

Sin embargo, no se pueden descartar funciones redundantes ya que la sobreexpresión de DNMT1 da lugar a metilación de novo en líneas celulares. Estas tres son las DNMTs más importantes, en especial la DNMT1 y la DNMT3b. Por otro lado, la DNMT2 muestra una débil actividad DNA metiltransferasa in vitro y parece más involucrada en la metilación de tRNA (RNA transferente).

Por último, otro miembro de la familia, DNMT3L (DNMT3-like), carece de actividad metiltransferasa pero está directamente relacionada con la represión epigenética al reclutar actividad histona desacetilasa a promotores metilados. Además, DNMT3L induce la actividad metiltransferasa de DNMT3a y contiene un dominio rico en cisteína que reconoce el extremo Nterminal de la histona H3 cuando ésta carece de metilación en la lisina 4.

- Desmetilación del DNA

La metilación del DNA, a pesar de ser heredable, es un proceso que se puede revertir mediante el proceso de desmetilación del DNA, que podría ser activa o pasiva. En el mecanismo pasivo, la DNMT1 encargada de la metilación de mantenimiento no llevaría a cabo su función tras la replicación del DNA, ya sea por estar reclutada por algún cofactor o por la imposibilidad de unirse al DNA por la presencia de marcas en las histonas como la acetilación.

Curiosamente, el mecanismo activo de desmetilación del DNA no ha podido asociarse a ninguna actividad enzimática exclusiva, por el momento. Recientemente se ha publicado que GADD45A (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45 alpha), una proteína nuclear relacionada con la estabilidad genómica, reparación del DNA y supresión del crecimiento celular, desempeña un papel fundamental en el mecanismo activo de desmetilación y que éste depende del reclutamiento de la endonucleasa XPG (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5).

Por lo tanto, GADD45A promovería la reparación del DNA, dando lugar a la eliminación de las citosinas metiladas y su reemplazo por citosinas no metiladas al reclutar XPG. Aunque este trabajo ha sido criticado y ha suscitado cierta controversia, la reciente publicación de otro trabajo en el pez cebra corrobora el papel clave de GADD45A en la desmetilación activa del DNA.

Sin embargo, algunos de los datos más sorprendentes se publicaron recientemente, en el 2008, cuando dos trabajos independientes demostraron que el proceso de desmetilación activa es iniciado por las mismas enzimas que se encargan de establecer dicha marca: la DNMT3a y la DNMT3b. En cualquier caso, se requieren investigaciones que profundicen en este campo para arrojar luz sobre estas incógnitas.

1.3. Modificaciones de histonas

El material genético de la célula eucariota está organizado en una estructura compleja compuesta de ADN y proteínas localizada en un compartimento especializado, el núcleo. Esta estructura se ha denominado **cromatina** (de la palabra griega "khroma", que significa coloreado, y "soma", que significa cuerpo). En total, dentro de un pequeño núcleo de algunas mm de diámetro nos podemos encontrar con casi dos metros de ADN. A pesar de este enorme grado de compactación, el ADN debe ser accesible muy rápidamente para permitir su interacción con las maquinarias proteicas que regulan las funciones de la cromatina para la:

- replicación,
- reparación y
- recombinación.

Por lo tanto, la organización dinámica de la cromatina tiene influencia, de manera potencial, sobre todas las funciones del genoma.

La unidad fundamental de la cromatina, denominada **nucleosoma**, está compuesta de ADN e histonas. Esta estructura es la base del primer nivel de compactación del ADN en el núcleo. Los nucleosomas se encuentran separados de manera regular a

lo largo del genoma para formar un nucleofilamento que puede adoptar niveles superiores de compactación, resultando finalmente en el cromosoma metafásico, que representa el nivel máximo de esta compactación. Dentro del núcleo en interfase, la cromatina se organiza en territorios funcionales.

La cromatina se ha dividido en:

- **euromatina** y
- **heterocromatina**.

La heterocromatina ha sido definida como una estructura que no altera su nivel de condensación o compactación a lo largo del ciclo celular, mientras que, por el contrario, la euromatina se descondensa durante la interfase. La heterocromatina se localiza principalmente en la periferia del núcleo y la euromatina en el interior del nucleoplasma. Además podemos distinguir:

- **heterocromatina constitutiva**, que contiene pocos genes y está formada principalmente por secuencias repetitivas localizadas en grandes regiones coincidentes con centrómeros y telómeros, de la
- **heterocromatina facultativa** compuesta de regiones transcripcionalmente activas que pueden adoptar las características estructurales y funcionales de la heterocromatina, como el cromosoma X inactivo de mamíferos.

La digestión o fraccionamiento parcial del ADN que forma parte de la cromatina genera fragmentos de entre 180 y 200 pares de bases de longitud cuando se observan en una electroforesis. Esta regularidad en la estructura de la cromatina fue confirmada por microscopía electrónica, en la que se podía observar una serie de partículas separadas regularmente o estructura en "cuentas de collar". Los análisis de masas revelaron una estequiometría ADN-histonas en el nucleosoma de 1/1.

El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina . Está compuesto de:

- una parte central o núcleo (core) y
- una región de unión (o región internucleosomal) que une partículas core adyacentes.

El core es una estructura muy conservada entre distintas especies y está compuesto de un segmento de ADN de 146 pares de bases enrollado 1,7 veces alrededor de un octámero de proteínas formado por dos copias de cada una de las histonas H3, H4, H2A y H2B.

La longitud de la región de unión, sin embargo, varía entre las especies e incluso el tipo celular. En esta región también se unen diversas histonas de unión. Todo ello hace que la longitud total de ADN en el nucleosoma varíe entre 160 y 241 pares de bases.

Los distintos análisis han puesto de manifiesto, primero, la distorsión del ADN enrollado alrededor del octámero de histonas y, segundo, que las interacciones histona/ADN e histona/histona a través del "dominio de plegamiento de las histonas" forman una configuración similar al apretón de manos

Las histonas del core, H3, H4, H2A y H2B, son proteínas pequeñas y básicas muy conservadas en la evolución. La región más conservada de estas histonas es su dominio central, compuesto estructuralmente de un "dominio de plegamiento" formado por tres hélices alfa separadas por dos regiones lazo. Por el contrario, las colas aminoterminales de estas histonas son más variables y carentes de estructura común. Estas colas son particularmente ricas en lisina y arginina, haciéndolas extremadamente básicas. Esta región es el lugar de numerosas modificaciones post-traduccionales que, se ha propuesto, modificarían la carga de la histona, alterando la accesibilidad del ADN y las interacciones proteína/proteína con el nucleosoma.

Es interesante hacer notar que otras proteínas que interactúan con el ADN también presentan el "dominio de plegamiento" de las histonas.

A. Estructura de las histonas del nucleosoma.

B. Colas aminoterminales de las histonas del core.

Las histonas de unión se asocian con la región de unión del ADN existente entre dos nucleosomas. A diferencia de las histonas del core, estas histonas no están muy conservadas entre las distintas especies. En los eucariotas superiores están compuestas de tres dominios: uno central globular y no polar, esencial para establecer las interacciones con el ADN y dos colas amino y carboxilo terminales no estructuradas y altamente básicas, que se cree son el lugar para las distintas

modificaciones post-traduccionales. Las histonas de unión tienen un importante papel en el espaciado de los nucleosomas y pueden modular la compactación de orden superior suministrando una región de interacción entre los nucleosomas adyacentes.

- El ensamblaje del ADN en la cromatina requiere un gran número de acontecimientos, comenzando con la formación de la unidad básica, el nucleosoma, y formando finalmente una organización compleja de dominios específicos dentro del núcleo.
- El primer paso consiste en la unión del ADN a un tetrámero de nueva síntesis (H3-H4)₂ para formar una partícula sub-nucleosomal, esto es seguido por la adición de dos dímeros H2A-H2B.

Esto tiene como resultado la formación de una partícula core nucleosomal compuesta por 146 pares de bases de ADN enrollado alrededor del octámero de histonas.

Esta partícula core junto con el ADN forman el nucleosoma. Las histonas de nueva síntesis sufren una serie de modificaciones específicas (por ejemplo, la acetilación de la histona H4).

- El siguiente paso es la maduración, que requiere ATP para establecer el patrón regular de espaciado entre los distintos cores para dar lugar al nucleofilamento. Durante este paso, las histonas de nueva incorporación son desacetiladas.
- A continuación, la incorporación de las histonas de unión se acompaña del plegado del nucleofilamento para dar lugar a la fibra de 30 nm, estructura que permanece por caracterizar. Existen dos modelos principales: el modelo del solenoide y el zig-zag.
- Finalmente, los sucesivos plegamientos tienen como consecuencia un nivel de organización complejo y la formación de dominios específicos en el núcleo.

En cada uno de los pasos descritos anteriormente, la modificación de los componentes básicos y la actividad de diversos factores de estimulación implicados en los procesos de ensamblaje tiene como resultado la modificación en la composición y actividad de la cromatina.

El ensamblaje se puede resumir en cinco fases: comienza con la incorporación del tetrámero H3/H4 (1), seguido por la adición de dos dímeros H2A-H2B (2) para formar una partícula core. Las histonas recién sintetizadas son modificadas específicamente; por ejemplo, la histona H4 se acetila en la Lys5 y en la Lys12 (H3-H4*). La maduración requiere ATP y la desacetilación de histonas para establecer el espaciado regular (3). La incorporación de histonas de unión se acompaña de plegado del nucleofilamento. Aquí, el modelo muestra la estructura en solenoide en la que hay seis nucleosomas por vuelta (4). Los posteriores plegamientos conducen, en último término, a una organización muy definida en dominios dentro del núcleo (5).

La metilación del DNA no participa sola en el juego epigenético sino que está acompañada por otras modificaciones epigenéticas que se producen sobre las histonas.

Se ha comprobado que las histonas son reguladores dinámicos de la actividad génica al sufrir diferentes modificaciones químicas post-traduccionales como la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación, la ribosilación y la isomerización, entre otras.

Estas modificaciones se producen sobre los residuos de los extremos N-terminales de las histonas y sobre algunos aminoácidos presentes en su región globular e importantes en la interacción con el DNA. En general, algunas modificaciones como la acetilación de histonas, están asociadas con transcripción génica, mientras que otras, como la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (mK9H3), indican cromatina condensada e inactiva.

Sin embargo, la hipótesis del código de histonas postula que el estado de expresión de una región particular de cromatina depende de una combinación dada de modificaciones de histonas.

Por ello, parece que cualquier modificación tiene el potencial de activar o reprimir la transcripción en función del contexto en que se halle. Por ejemplo, la metilación de la lisina 36 de H3 (mK36H3) tiene un efecto positivo sobre la transcripción cuando se encuentra en regiones codificantes y un efecto negativo cuando se encuentra en regiones promotoras. Las marcas de histonas determinan, además de las funciones biológicas de la cromatina como la transcripción y la replicación, la localización y delimitación de los dominios estructurales de la cromatina en el núcleo interfásico.

Clásicamente, se distingue entre dominios de eucromatina y heterocromatina, pudiendo ser esta última facultativa o constitutiva. La eucromatina es la estructura que adopta la cromatina en regiones funcionalmente activas y accesibles a las enzimas que regulan procesos como la replicación, la transcripción y la reparación. Además, se asocia con marcas como la di- y trimetilación de la lisina 4 de H3, la mono-, di- y trimetilación de las lisinas 9 y 27 de H3 así como con la metilación de las lisinas 36 y 79 de la histona H3.

La heterocromatina facultativa se corresponde con genes transcripcionalmente inactivos en un determinado linaje celular y se caracteriza por la presencia de marcas como la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 y la trimetilación de las lisinas 27 de H3 y 20 de H4.

La heterocromatina constitutiva, que se encuentra en regiones con secuencias repetitivas como las presentes en telómeros, regiones centroméricas y subcentroméricas y en secuencias endoparásiticas, se caracteriza por la trimetilación de la lisina 9 de H3 y la monometilación de la lisina 27 de H3.

- Acetilación de histonas

La acetilación tiene lugar sobre residuos de lisina y se asocia con una mayor actividad transcripcional. El estado de acetilación de un residuo determinado depende del balance entre dos actividades enzimáticas contrapuestas, la de las histona acetiltransferasas (HATs) y la de las histona desacetilasas (HDACs).

Las acetilasas de histonas transfieren un grupo acetilo de la acetil-colina a la lisina y esta modificación se relaciona con la activación transcripcional.

Las HAT se clasifican en tres familias, GNAT, MYST y CBP/p300, en función de la homología de secuencia y de los motivos acetil-transferasa y todas ellas transfieren un grupo acetilo de la acetil-colina a la lisina. Por el contrario, la desacetilación de estos residuos llevada a cabo por las HDACs da lugar a un estado de represión transcripcional (figuras 5 y 6).

Existen 3 grupos de histona desacetilasas, las de tipo I, las de tipo II y las similares a Sir2, también llamadas HDACs de tipo III. La acetilación de histonas está implicada en el control transcripcional y también en la reparación del daño al DNA.

En general, en las regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos se detectan niveles elevados de acetilación. Por el contrario, la desacetilación de las histonas aumenta las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el DNA, con carga negativa, lo que trae consigo una estructura más compacta de la cromatina y menos accesible a la maquinaria enzimática que regula sus funciones biológicas.

En las células eucariotas la mayor parte del genoma está constituido por cromatina transcripcionalmente inactiva cuyas histonas se encuentran hipoacetiladas. En la mayoría de las especies los principales residuos donde se produce la acetilación son las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3 y las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4.

- Metilación de histonas

La metilación tiene lugar sobre los residuos de lisina y arginina. Sobre las lisinas se puede dar mono, di y trimetilación y el efecto sobre la transcripción de cada modificación depende del residuo modificado y del grado de metilación.

Esta modificación ha sido relacionada tanto con la activación como con la represión transcripcional y con la determinación de dominios estructurales de la heterocromatina.

Las regiones de heterocromatina se caracterizan por la presencia de niveles elevados de marcas como la trimetilación de la lisina 20 de H4 y la trimetilación de la lisina 9 de H3. Las enzimas que llevan a cabo la metilación de las histonas son

las histona metiltransferasas (HMT) y utilizan SAM como donante del grupo metilo.

Estas enzimas son altamente específicas en cuanto al sustrato, en comparación con las histonas acetiltransferasas. Por otro lado, recientemente se han descubierto diferentes enzimas histona desmetilasas. Existen dos tipos de dominio desmetilasa de lisinas, el dominio LSD1 (Lysine-Specific Histone Demethylase 1) y el dominio jumonji (Jmj).

La primera enzima con actividad desmetilasa de lisinas en ser caracterizada fue LSD1, cuyo sustrato más habitual es la lisina 4 de H3, aunque se ha observado que cuando forma un complejo con el receptor de andrógenos desmetila la lisina 9 de H3 activando la transcripción. El dominio jumonji fue identificado en ratón y tiene funciones importantes durante el desarrollo embrionario.

Más tarde se observó que una proteína con el dominio JmjC, JHDM1A, tenía actividad histona desmetilasa y que dicho dominio era el responsable de esa actividad enzimática. Desde entonces han sido caracterizadas varias proteínas con este dominio como JMJD2A/JHDM3A (jumonji domain containing 2A), JMJD2C/GASC1 (jumonji domain containing 2C) o UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome).

La especificidad de residuo y grado de metilación de todas estas proteínas con actividad desmetilasa ponen de manifiesto la importancia y complejidad del control preciso de la metilación de las lisinas. La metilación de los residuos de arginina se relaciona con actividad transcripcional.

Se han descrito 7 metilasas de arginina (PRMTs: Protein Arginine Methyltransferases), aunque aún no están completamente caracterizadas. También emplean como sustrato al grupo metilo de SAM. Se ha observado que la monometilación de la arginina 2 de la histona H3 es una marca asociada a activación, mientras que la dimetilación se relaciona con silenciamiento.

De momento no se han encontrado enzimas desmetilasas de argininas aunque la peptidil-arginina deiminasa-4 puede convertir una arginina monometilada en citrulina liberando monometilamina.

Sin embargo, la conversión de citrulina en arginina no ha sido descrita aún. Generalmente, la monometilación de las lisinas 9, 27 y 79 de la histona H3 y de la lisina 5 de H2B está relacionada con activación génica. Además, las regiones promotoras de los genes transcripcionalmente activos presentan niveles altos de trimetilación de la lisina 4 de H3, trimetilación de la lisina 36 de H3, monometilación de la lisina 20 de H4, monometilación de la arginina 3 de H4 y de la arginina 2 de H3.

Las zonas promotoras de genes transcripcionalmente inactivos se encuentran enriquecidas en modificaciones como la trimetilación de la lisina 79 de H3, la dimetilación y trimetilación de la lisina 27 de H3 y de la lisina 9 de H3.

- Fosforilación de histonas

La fosforilación se lleva a cabo sobre residuos serina y treonina. La fosforilación de la serina 10 de H3, llevada a cabo por las enzimas MSK1/2 (ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5/4) y RSK2 (ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3), está relacionada con la condensación mitótica de la cromatina y con la regulación transcripcional, sobre todo en la respuesta rápida de algunos genes como c-Jun, c-Fos (v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) y c-Myc.

Todo indica que una función u otra dependen del estado de acetilación de los residuos cercanos.

- Ubiquitinación de histonas

La ubiquitinación se produce sobre residuos de lisina. La ubiquitinación de la lisina 119 de la histonas H2A y de la lisina 120 de H2B afecta al 10-15% de las histonas en la mayoría de las células eucariotas.

La ubiquitinación de H2AK119 es llevada a cabo por las proteínas BMI1 (BMI1 polycomb ring finger oncogene)/Ring1A (ring finger protein 1) (parte del complejo Polycomb) y se asocia con represión transcripcional mientras que la ubiquitinación de H2BK120, mediada por RNF20 (ring finger protein 20)/RNF40 (ring finger

protein 40) y UbcH6 (ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1; UBC4/5 homolog, yeast) se vincula con activación transcripcional y con la elongación transcripcional mediada por la chaperona de histonas SSRP1 (structure specific recognition protein 1).

La ubiquitinación de las histonas se relaciona también con la meiosis, la espermatogénesis y la reparación del DNA. Sin embargo, no se ha podido relacionar la ubiquitinación de H2A y H2B con ningún cambio en la estructura del nucleosoma por lo que parece que estas modificaciones pueden actuar como señales de reconocimiento de factores reguladores y/o actuar sinérgicamente con otras modificaciones post-traduccionales de las histonas.

- Sumoilación de histonas

La sumoilación, basada en la unión covalente del péptido SUMO a las histonas, es una de las modificaciones menos estudiadas y existe gran controversia sobre su función en la regulación de la cromatina.

Se ha demostrado que esta modificación tiene lugar sobre las 4 histonas que forman el octámero y se han encontrado sitios específicos de sumoilación en H2A, H2B y H4.

En levaduras se ha observado que la sumoilación antagoniza tanto la acetilación como la ubiquitinación que se producen sobre el mismo residuo de lisina, por lo que esta marca se relaciona con la represión de la transcripción.

- Ribosilación de histonas

La ribosilación también se produce sobre las lisinas, que pueden ser mono o poli-ribosiladas con ADP (adenosín-difosfato), lo que da lugar a la clasificación de las enzimas que llevan a cabo esta modificación en dos clases: MART.

Esta modificación podría estar relacionada con la transcripción génica aunque parece que para su acción son necesarias las roturas en el DNA, ya que las roturas de doble hebra mediadas por la topoisomerasa IIb activan a la enzima PARP-1.

- Isomerización de histonas

Por último, la modificación de residuos de histona más novedosa es la isomerización cis-trans de la prolina, que es una modificación no covalente que regula la transcripción mediante su cooperación con la metilación de las lisinas.

En levaduras se ha caracterizado la proteína FPR4 (Peptidylprolyl cis-trans isomerase; PPIase; proline isomerase) que puede isomerizar las prolinas que se encuentran en el extremo N-terminal de H3 (Nelson et al, 2006a). La isomerización de la prolina 38 de H3 regula los niveles de metilación de la lisina 36 de H3 ya que la isomerización parece necesaria para el reconocimiento de la lisina por parte de metiltransferasas y desmetilasas.

Se ve, por lo tanto, que las modificaciones de histonas son muy numerosas y que interactúan entre ellas para dar lugar a un resultado transcripcional determinado.

1.4. La familia MBD

La información contenida en la metilación de la citosina es interpretada por una familia de proteínas que comparten un dominio de unión al DNA metilado llamado Methyl-CpG Binding Domain (MBD). En mamíferos, la familia de proteínas MBD está formada por 5 miembros: MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) , MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4.

En general, estas proteínas se localizan en zonas de la cromatina con metilación densa y están implicadas, a excepción de MBD4 (cuya función está relacionada con la reparación del DNA), en el silenciamiento de genes imprintados y de secuencias endoparásitas, en la estabilidad cromosómica y en la represión transcripcional a través del reclutamiento de actividades modificadoras y remodeladoras de la cromatina a secuencias del DNA metiladas.

Por lo tanto, las MBDs favorecen que la metilación del DNA y las modificaciones de histonas puedan interactuar mediante un preciso control en el que además participan diversos complejos.

Existen otras proteínas de unión a DNA metilado que carecen de este dominio MBD, como Kaiso, ZBTB4 (zinc finger and BTB domain containing 4) y ZBTB38 (zinc finger and BTB domain containing 38) (Filion et al, 2006).

1.5. Epigenética y cáncer

El cáncer es a la vez una enfermedad genética y epigenética. Las alteraciones epigenéticas más importantes en el cáncer humano son la hipermetilación de genes supresores de tumores, la hipometilación global del DNA y los cambios específicos de modificaciones de histonas, que promueven la carcinogénesis.

La contribución de cada una de estas alteraciones es muy importante, actuando sobre genes involucrados en todas las rutas afectadas en esta enfermedad. De hecho, la contribución de la epigenética al cáncer va más allá de los estadios iniciales de la transformación tumoral, afectando también a la metástasis, que es la principal causa de muerte entre los pacientes con tumores sólidos.

Así, las células tumorales tienen que ganar un genotipo y un epigenotipo para poder diseminarse a partir de la masa del tumor primario y para sobrevivir y proliferar en el tejido secundario. Por lo tanto, la metástasis es también una enfermedad genética y epigenética. Con todo esto, el estudio de las alteraciones epigenéticas asociadas a cáncer y metástasis se ha convertido en uno de los objetivos más importantes en la investigación del cáncer.

1.5.1. Hipermetilación de genes supresores de tumores

En las células tumorales, el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores por metilación aberrante de islas CpG es un proceso muy significativo y contribuye a todos los rasgos típicos de una célula tumoral. Así, numerosos genes con un papel crítico en la biología del cáncer, como el inhibidor del ciclo celular p16INK4a (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) o los genes de reparación del DNA MLH1 (mutL homolog 1) y BRCA1 (breast cancer 1), están reprimidos por hipermetilación del DNA en cáncer.

Mediante este mecanismo de silenciamiento, la expresión de los genes supresores de tumores en una célula tumoral puede estar disminuida o abolida, como alternativa a las mutaciones genéticas inactivantes.

También se ha observado recientemente que la metilación puede producirse en zonas no asociadas a promotores (aunque cercanas) que se han denominado CpG islands shores (orilla de islas CpG) y que se metilan de forma diferencial en cáncer. Así, la hipermetilación de genes supresores de tumores se considera, por sí misma, una característica propia de todos los tipos de cáncer.

Curiosamente, cada tipo tumoral presenta un perfil de metilación de islas CpG determinado, al igual que presenta determinados marcadores genéticos o citogenéticos. Y eso conlleva importantes implicaciones diagnósticas y pronósticas.

Es interesante resaltar que no todos los genes silenciados de forma epigenética presentan mutaciones genéticas. De hecho, hay más genes que sufren pérdida de función a través de modificaciones epigenéticas que a través de defectos genéticos. Aún no se ha determinado el número preciso de genes hipermetilados en un tumor dado pero resultados preliminares apuntan a un rango entre 100-400 genes.

Estos números podrían cambiar a medida que los estudios epigenéticos se lleven a cabo en una variedad más amplia de tipos tumorales y se utilicen técnicas más avanzadas. El papel que tiene la metilación del DNA en la metástasis no ha sido tan estudiado como los cambios de expresión en los genes asociados a metástasis.

Gran parte del esfuerzo se ha centrado en detectar incrementos de metilación del DNA dentro de las regiones promotoras de genes relacionados con metástasis.

Así, esta hipermetilación aberrante originaría la represión de los genes que permiten a las células tumorales formar metástasis o tener una ventaja selectiva en el tejido secundario. Estos genes asociados a metástasis que sufren hipermetilación de islas CpG de los promotores se corresponden con genes cadherinas, genes de la ruta de síntesis del heparán sulfato, inhibidores tisulares de proteinasas, trombospondinas y lamininas, entre otros.

El ejemplo más ilustrativo lo representa la E-cadherina (CDH1). Las mutaciones somáticas en CDH1 son características del cáncer de mama, mientras que las

mutaciones germinales son responsables de la forma heredada de cáncer gástrico difuso. Sin embargo, el principal mecanismo de pérdida de CDH1 en cáncer humano es el silenciamiento epigenético a través de la hipermetilación del DNA.

Y esto es debido a que la inactivación epigenética es el mecanismo darwiniano más adecuado para el silenciamiento reversible de un gen supresor de metástasis. Así, se ha demostrado que en algunos tumores primarios que muestran metilación de este gen, las correspondientes metástasis presentaban E-cadherina desmetilada.

Estos hallazgos apoyan la observación previa de falta de expresión de CDH1 en la neoplasia original y recuperación de la expresión en los sitios metastáticos distantes.

Así, su desmetilación y consiguiente re-expresión serían indispensables para la correcta incorporación de las células metastáticas a su nuevo entorno celular. En algunos casos, la inactivación génica de CDH1 en células transformadas puede estar mediada por la acción de los represores transcripcionales SNAIL (snail homolog 1) y SLUG (snail homolog 2), que reclutan desacetilasas de histonas a su promotor.

1.5.2. Hipometilación genómica global

En cáncer, al mismo tiempo que las islas CpG se hipermetilan, los genomas de las células tumorales sufren, paradójicamente, una hipometilación global, con una reducción del 20-60% del contenido total en 5-metilcitosina al compararlos con los tejidos normales correspondientes.

Esta pérdida se lleva a cabo principalmente por hipometilación del cuerpo de los genes (la región codificante y los intrones) y por desmetilación de secuencias de DNA repetitivo, que constituyen el 20-30% de todo el genoma humano. Este evento podría promover el cáncer, permitiendo la inestabilidad cromosómica y la expresión de secuencias patogénicas.

De forma adicional, genes que normalmente están metilados pueden sufrir desmetilación, originando su inadecuada expresión. En una neoplasia dada, los

niveles de metilación global del DNA descienden conforme la lesión progresa hasta un cáncer invasivo.

De esta forma, hay una pérdida continua de 5-metilcitosina conforme el tumor evoluciona, tal y como demuestran los estudios realizados mediante HPCE (high-performance capillary electrophoresis, electroforesis capilar de alta resolución). Así, los niveles de hipometilación del DNA podrían usarse como marcadores de agresividad tumoral, ya que la hipometilación es una característica dinámica de la carcinogénesis, lo que pone de manifiesto el papel clave en la transformación maligna que lleva a la metástasis.

La hipometilación del DNA se ha ligado al cáncer y a la metástasis por medio de distintos mecanismos. Por un lado, la pérdida de metilación del DNA puede favorecer la recombinación mitótica, originando deleciones y translocaciones, y pudiendo inducir reordenamientos cromosomales. Además, el DNA intragenómico endoparasítico puede ser activado, permitiendo su transcripción o translocación a otras regiones genómicas e interrumpiendo el genoma.

Respecto de la metástasis, hay una importante relación entre niveles más altos de hipometilación de LINE-1 (long interspersed element 1) y elementos Alu en tumores neuroendocrinos y metástasis a nódulo linfoide, y una tendencia hacia la pérdida de metilación de estas repeticiones en la progresión de adenocarcinomas de próstata. Además, se ha encontrado una fuerte correlación entre la hipometilación del cromosoma 8 y la presencia de metástasis en carcinoma de próstata.

Por otro lado, esta pérdida de metilación del DNA puede afectar a genes específicos. Por ejemplo, la pérdida de imprinting de IGF2 es un factor de riesgo de cáncer colorrectal y la disrupción de la impronta genómica contribuye al desarrollo de los tumores de Wilms. Respecto de la metástasis, la hipometilación de S100A4 (S100 calcium binding protein A4), un gen que codifica para una proteína de unión al calcio previamente implicada en metástasis, está asociada con la activación del gen en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, el desarrollo de meduloblastomas y la baja diferenciación o mayor grado en los adenocarcinomas pancreáticos ductales o carcinomas endometriales. Además, algunos genes como SNCG (gamma-sinucleína) y uPA/PLAU (plasminogen activator, urokinase) están

hipometilados en un amplio rango de tumores con alto potencial invasivo o metastático.

La hipermetilación de genes supresores de tumores es una alteración común en las células transformadas. También se produce una hipometilación global en secuencias repetitivas, genes específicos de tejido y genes imprintados, cooperando con la inestabilidad genómica.

En células normales, en los genes supresores de tumores, la acetilación de las lisinas de H3 y H4 y la 3mK4H3 son las marcas predominantes, mientras que el DNA repetitivo y las regiones heterocromáticas se caracterizan por la metilación de K27 y K9 de la H3 y 3mK20H4.

En células tumorales se produce una pérdida de marcas de activación en los genes supresores de tumores y una pérdida de marcas de represión en genes específicos de tejido, genes imprintados y secuencias repetitivas.

1.5.3. Cambios en las modificaciones de histonas

En el contexto de un sólo gen, la hipermetilación de islas CpG en células cancerosas va acompañada de una combinación particular de marcas de histonas: desacetilación de histonas H3 y H4, pérdida de trimetilación de la lisina K4 de la histona H3 y ganancia de metilación de H3K9 y trimetilación de H3K27.

También se conoce que algunos genes con propiedades supresoras de tumores como p21WAF1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) están silenciados a nivel transcripcional por la presencia de histonas hipocetiladas e hipermetiladas y en ausencia de hipermetilación de islas CpG.

A nivel genómico, recientemente se han establecido los perfiles de modificación de histonas y su localización en células transformadas. Así, se han caracterizado las modificaciones post-traduccionales de la histona H4 en un considerable número de tejidos humanos, líneas celulares cancerosas y tumores primarios.

En este estudio, las células tumorales mostraron una pérdida de monoacetilación y trimetilación de la histona H4. Además, estos cambios aparecían temprano y se

acumulaban durante el proceso tumoral, tal y como se demostró en un modelo de carcinogénesis de piel.

Estas pérdidas se concentraron en la K16 acetilada y la K20 trimetilada y se asociaron con la bien caracterizada hipometilación del DNA de secuencias repetitivas. Por lo tanto, la pérdida global de monoacetilación y trimetilación de histona H4 constituye un rasgo propio de las células tumorales, como se ha visto para la hipometilación global del DNA y la hipermetilación del islas CpG, y es una característica confirmada por otros estudios.

Como se ha indicado, estos cambios de histonas parece que se acumulan durante la tumorigenesis. Mediante inmunoprecipitación de la cromatina, usando anticuerpos contra H4 acetilada y dimetil K4H3, dos señales asociadas con actividad transcripcional, se observó una pérdida dramática de las dos marcas en promotores hipermetilados, mientras que islas CpG no metiladas aparecían enriquecidas en estas dos modificaciones.

Por último, varios trabajos recientes han mostrado que algunos genes metilados en células de cáncer están específicamente empaquetados con nucleosomas que contienen histona H3 trimetilada en K27. Esta marca de la cromatina se establece pronto en el desarrollo y se mantiene en células diferenciadas, aunque en ambos casos, los genes se mantienen desmetilados.

Después, en células tumorales, esta marca dirige la metilación de novo. Estos datos parecen apoyar un origen del cáncer de células madre en el que la represión reversible de genes es reemplazada por un silenciamiento permanente, poniendo a la célula en un estado perpetuo de división y por lo tanto, predisponiendo la subsiguiente transformación maligna.

1.5.4. Otras alteraciones epigenéticas en cáncer

Además de las tres principales alteraciones epigenéticas, en cáncer se pueden producir otros defectos epigenéticos. Por un lado, los patrones de metilación aberrante de las células tumorales provocan una redistribución de las proteínas MBDs, con un patrón característico en algunos tipos de tumores. Así, se generan

nuevas dianas para la unión de los miembros de esta familia de proteínas, dando lugar a una represión transcripcional más fuerte de dichos genes.

Otras alteraciones epigenéticas pueden deberse a mutaciones en las proteínas encargadas de regular los patrones epigenéticos de la célula y también propician el desarrollo de tumores. Por ejemplo, una mutación puntual en la secuencia que codifica la proteína HDAC2 origina una forma truncada que carece de actividad desacetilasa, produciendo patrones de acetilación alterados.

Además, esta mutación se ha observado en carcinomas esporádicos con inestabilidad cromosómica y en tumores de pacientes con síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico, reforzando su importancia. De forma similar se han encontrado mutaciones en la desmetilasa de lisinas UTX o JARID1A en numerosos tumores humanos, confirmando la relación entre epigenética y cáncer.

Valor clínico de la metilación

La metilación de las islas CpG puede ser usada como un marcador biológico de la transformación maligna. El desarrollo de la técnica de PCR específica de metilación (MSP) ha popularizado estos estudios, ofreciendo una forma rápida, sencilla y sensible de detectar la metilación génica.

Esta estrategia es interesante por tres aspectos: la señal de la PCR es una señal positiva que no es enmascarada por las células normales; la metilación de los promotores aparece de forma temprana en la evolución tumoral, permitiendo un diagnóstico precoz y además, todos los tumores parecen tener uno o más *loci* hipermetilados cuando un panel de genes son estudiados de forma conjunta.

Particularmente interesante es el hecho de que la epigenética puede en parte explicar la observación de que en el caso de dos personas con la misma mutación genética, una desarrolle una enfermedad y la otra no. Lo mismo puede explicar la distinta incidencia de dolencias en gemelos monocigóticos, que comparten el mismo genoma. Podemos imaginarlo como una partida de cartas: al repartir la baraja de nuestro genoma, a dos jugadores les quedan las peores cartas, tal como puede ser la mutación de un gen supresor tumoral como BRCA1. Ambos por tanto tienen las mismas posibilidades de entrada de perder la partida. La cuestión es ver

como se juegan esas cartas. Ciertos hábitos tóxicos y de estilo de vida pueden acelerar los procesos de desarrollo de un tumor en uno por alteración de su Epigenética, mientras que en el otro se previenen estas alteraciones.

Si alteramos la epigenética se producen muchas enfermedades: por ejemplo una pérdida en el nivel de metilación puede provocar una exposición excesiva de antígenos y originar una enfermedad autoinmune; o una mutación del gen epigenético MeCP2 puede provocar una enfermedad neurológica como el Síndrome de Rett, una de las principales causas de retraso mental en mujeres y que afecta a muchas familias que luchan contra esta enfermedad.

Sin embargo, es en el campo de la oncología donde se ha avanzado más en el conocimiento epigenético del cuerpo humano. El cáncer aparece por una combinación casi maliciosa de alteraciones genéticas y epigenéticas. Por ejemplo sabemos que los tumores humanos pierden metilación de su ADN, que se convierte en una estructura frágil y por eso aparecen aberraciones cromosómicas. Curiosamente, también ocurre que genes protectores del cáncer (los llamados genes supresores de tumores) dejan de ejercer esta acción beneficiosa porque la metilación bloquea, como si fuera una señal de stop de tráfico, su expresión. Los ejemplos más clásicos de este último aspecto son los genes BRCA1, MLH1, MGMT y GSTP1 en los casos de cáncer de mama, colon, cerebro y próstata, respectivamente. Este conocimiento tiene diversas aplicaciones. Una es la posibilidad de usar patrones de metilación del ADN a nivel genómico, o en genes particulares, como biomarcadores de la presencia de una lesión maligna, siendo el caso más representativo la detección de cáncer de próstata usando la metilación del gen GSTP1. Una segunda, recurre al uso de la metilación de genes reparadores del DNA como predictores de una buena respuesta a fármacos de quimioterapia, siendo el caso más ilustrativo el gen MGMT y la respuesta a temozolomida en tumores cerebrales: en resumen, dar el fármaco adecuado al paciente adecuado.

Las proteínas denominadas histonas, que envuelven el ADN como si fuera un collar de perlas, también juegan un papel importante como reguladores de la transcripción a través de modificaciones postraduccionales, como la metilación y la acetilación de algunos de sus aminoácidos. En general, se puede afirmar que la metilación se relaciona, la mayoría de las veces, con la represión de la expresión del gen,

mientras que la acetilación se relaciona con el desempaquetamiento y transcripción, es decir, la expresión del gen. Sin embargo, los cambios en cuanto al número, sitios específicos y combinaciones específicas de modificaciones, son los que determinan la remodelación final de la cromatina y, por tanto, la represión o expresión génica. Este patrón de combinaciones realizadas en el extremo amino terminal de algunas histonas- que sufren metilaciones y acetilaciones- es lo que define el llamado código de histonas (paralelo al código genético). Concretamente, la pérdida de metilación y acetilación de la histona H4 está presente en la mayoría de los tumores humanos. De hecho, la elevada frecuencia de esta alteración podría convertirla en el futuro en un importante marcador para el diagnóstico de cáncer así como en diana terapéutica para fármacos antitumorales; las alteraciones halladas en el "código de histonas" ocurren en regiones específicas del genoma humano, como las regiones repetitivas del ADN.

Si pensamos en nuevas terapias del cáncer, es importante reconocer que todos los tumores humanos tienen un componente epigenético. Por tanto fármacos que busquen reparar este patrón epigenético dañado podrían ser beneficiosos en principio contra diversos tipos de cáncer. En oncología, la punta de lanza de nuevos tratamientos suelen ser las enfermedades malignas de la sangre. Este es el caso también de los fármacos epigenéticos: los dos primeros agentes que reparan nuestra maltrecha metilación del ADN han sido aprobados para el tratamiento de ciertas leucemias y pre-leucemias, mientras dos fármacos que regeneran a nuestras histonas han sido aprobados para su uso en linfomas, un tumor de los ganglios linfáticos. Los inhibidores de histonas deacetilasas, como el ácido valproico y el fenilbutirato, relajan las histonas alrededor del ADN y permiten la expresión de los "genes buenos" al inducir la metilación de las mismas. La relajación de estos genes tiene lugar mediante el uso de diferentes agentes o fármacos que ocupan el sitio activo de las histonas deacetilasas. Actualmente, los esfuerzos en este campo están enfocados a la búsqueda de drogas menos tóxicas y más potentes inhibidoras de las histonas deacetilasas. Los agentes inhibidores de la metilación del ADN, como la 5- azacitidina y la 5aza-2 desoxycitidina, usados inicialmente a altas dosis como agentes intercalantes del ADN, se utilizan actualmente a dosis más bajas y, por tanto, con efectos menos tóxicos. Estos compuestos son análogos del

nucleósido citidina y su objetivo es reactivar genes supresores tumorales habiendo sido aprobado su uso para el síndrome mielodisplásico y ciertas formas de leucemia.

La metilación aberrante de las islas CpG se ha empleado como instrumento para la detección de células neoplásicas en los lavados bronquioalveolares, ganglios linfáticos, esputo y suero. La metilación de los promotores de ciertos genes puede emplearse para definir el pronóstico, la respuesta al tratamiento y establecer de forma más precisa el grupo de riesgo en el que incluir al paciente. Por ejemplo, la metilación del gen *p15* y *p16* constituyen datos de mal pronóstico en la LAM y en el mieloma múltiple, respectivamente.

En grupos seleccionados de riesgo estratificados por alteraciones genéticas, la metilación fue capaz de redefinir el pronóstico de los mismos. De este modo la metilación génica empeora el pronóstico de los pacientes *TEL-AML1* positivos, mientras que la ausencia de metilación mejora el pronóstico de la LLA *BCR-ABL* positiva.

Esto sugiere que el patrón de metilación es un nuevo marcador de riesgo en la LLA y que puede complementar los análisis inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares habituales. En la LMC, la metilación de la *cadherina-1*, un gen que controla la adhesión célula a célula se correlaciona significativamente con una ausencia de respuesta citogenética al interferón.

En el análisis genómico de los glioblastomas se constata que dentro de las distintas posibles alteraciones existen cambios importantes en el estatus de metilación. Pero posiblemente la primera referencia en este sentido corresponde al artículo publicado en el 2000 (figura 7) donde en una serie de pacientes con gliomas de alto grado y tratados con un agente alquilante, BCNU, el estatus de metilación del promotor del gen *MGMT* marcaba un perfil estadísticamente significativo distinto de respuesta con impacto igualmente estadísticamente significativo en tiempo a la progresión y en supervivencia global. Posteriormente estos datos fueron confirmados con el uso de Temozolamida. Así mismo se constató que la situación de metilación del gen se encontraba en relación directa con la actividad de la encima.

Una aplicación directa de la metilación en la toma de decisiones terapéuticas proviene del silencio epigenético del gen reparador del ADN *MGMT*. El tratamiento estándar del glioblastoma es la cirugía seguida de radioterapia adyuvante. El papel de la quimioterapia continúa siendo controvertido. Los estudios compararon la respuesta tratamiento con radioterapia sola con la combinación de radioterapia y temozolomida. Los autores encontraron un discreto aumento de la supervivencia (14.6 frente a 12.1 meses) con la combinación de radioterapia y temozolomida en comparación con radioterapia sola, pero la tasa de supervivencia a los 2 años fue del 26.5% con el tratamiento combinado y del 10.4% con radioterapia sola. Algunos grupos evaluaron el estado de metilación de la *MGMT* como factor predictivo de la supervivencia. La *MGMT* sintetiza una enzima que repara el ADN dañado. La metilación de la *MGMT* inhibe la reparación del ADN y acentúa el efecto antitumor de los alquilantes. Se ha reportado que la supervivencia media en pacientes con *MGMT* metilada aumentaba hasta 21.7 meses en los pacientes asignados al tratamiento combinado y a 15.3 meses en los tratados sólo con radioterapia.

La metilación de este gen en pacientes con linfoma que recibían regímenes que contenían ciclofosfamida se asoció a un incremento significativo en la supervivencia general y en la supervivencia libre de progresión. De este modo, el silencio del gen *MGMT* contribuye a una mayor sensibilidad de las células linfomatosas a los agentes alquilantes ya que las lesiones inducidas en el ADN por la quimioterapia no pueden ser reparadas adecuadamente llevando finalmente a las células defectuosas a morir por apoptosis.

No obstante no todas las técnicas para la detección de la metilación son igualmente sensibles; un estudio reciente ha demostrado que la aproximación analizando las distintas citoxinas que pueden ser metiladas constituye comparativamente la aproximación con mayor sensibilidad (figura 8).

En este mismo tumor la presencia y el análisis del estatus de metilación del promotor del gen *ERCC1* se encuentra asociado a la radiosensibilidad que presentan los gliomas de alto grado. En cáncer de pulmón la progresión de la

enfermedad parece estar relacionada con la metilación de genes como RAR beta, DAPK, GSTP1, FHIT, RASSF1; asimismo la posible respuesta a platinos podría modularse en función a estos distintos grados de inactivación epigenética.

En cáncer de esófago el pronóstico parece estar relacionado con el número de genes que se encuentra metilados. De esta manera algunos autores han marcado un umbral de 50 genes que cuando son superados en estatus de metilación la supervivencia global disminuye drásticamente.

En la misma línea la presencia de metilación en el gen LAMC2 en células exfoliadas en orina podría constituir un factor pronóstico de este tipo de tumor, como al tiempo una posible variable para el diagnóstico precoz.

No obstante uno de los campos con clara correlación entre la inactivación epigenética y la respuesta a fármacos vendría dada por la metilación del promotor del gen BRCA1 en cáncer de mama y la posible respuesta a inhibidores de la enzima PARP.

Bajo otro aspecto de este mecanismo la situación de acetilación de las histonas constituye un marcador potencial respecto al uso de los inhibidores de las histonas de acetilasas aunque su implicación clínica no ha sido todavía claramente demostrada.

Finalmente, a diferencia de los cambios genéticos que ocurren en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles y por tanto, existe la posibilidad de reactivar los genes silenciados por metilación con objeto de obtener un beneficio terapéutico.

Los agentes desmetilantes como la azacitidina o la 5-aza- 2-desoxicitidina (decitabina), son capaces de inducir la expresión de genes silenciados por metilación en cultivos de líneas celulares malignas. Estos compuestos deben incorporarse al ADN como un análogo de las citosinas y por tanto, pueden inducir efectos tóxicos inespecíficos cuando se utilizan a altas dosis probablemente por la inducción de daño en el ADN. Sin embargo, su principal mecanismo de acción es por una inhibición irreversible de las DNMT.

En síndromes mielodisplásicos (SMD) el empleo de 5-azacitidina subcutánea consigue una tasa de respuestas del 60 % y una significativa prolongación del

tiempo medio hasta la transformación. En el mismo sentido, la administración prolongada de bajas dosis de decitabina en infusión continua se asocia a una tasa de respuesta en SMD del 65%.

En LMC, el empleo de decitabina consigue respuestas objetivas en el 28 % de los pacientes en crisis blástica, en el 55 % de las fases aceleradas y en el 63 % de los pacientes en fase cónica. Por otra parte, el empleo secuencial de agentes desmetilantes seguidos de inhibidores de las desacetilasas de las histonas (fenilbutirato) está siendo investigado en la actualidad. Resultados preliminares indican que dicha asociación es capaz de inducir mejoría en el 50 % de los pacientes con SMD o leucemia secundaria a SMD.

Podemos decir que los mecanismos epigenéticos son críticos en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Los patrones de metilación son específicos para cada especie y tipo de tejido. La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las ADN metiltransferasas, desmetilasas putativas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. La metilación del ADN es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X. En contraste, alteraciones en ella están implicadas en algunas enfermedades humanas, especialmente aquéllas relacionadas con defectos en el desarrollo y el proceso neoplásico. El conocimiento de las modificaciones epigenéticas que ocurren en las enfermedades humanas será importante para su manejo futuro. Los cambios en los patrones de metilación podrán ser empleados como marcadores en cáncer y el estado potencialmente reversible de este proceso constituye una diana ideal para crear estrategias terapéuticas que impliquen la reactivación o el re-silenciamiento de genes específicos así como marcadores de respuesta a tratamiento.

Bibliografía

1. Baker EK, El-Osta A. The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Exp Cell Res* 2003;290(2):177-194.
2. Balch C, Huang TH, Brown R, Nephew KP. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(5):1552-1572.
3. Casorelli I, Russo MT, Bignami M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(4):368-380.
4. Claus R, Almstedt M, Lubbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 2005;32(5):511-520.
5. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1121-1125.
6. Fandy TE. Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases. *Curr Med Chem* 2009;16(17):2075-2085.
7. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007;447(7143):433-440.
8. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005;4(10):1377-1381.
9. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006;20(1):1-13.
10. Hegi ME, Liu L, Herman JG et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4189-4199.
11. Ibanez dC, I, Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction. *Clin Transl Oncol* 2007;9(7):429-437.
12. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116(3):496-526.
13. Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2009;625(1-3):131-142.

14. Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem* 2009;55(8):1471-1483.
15. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R65-R76.
16. Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(4):481-488.
17. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics* 2005;5(4):223-232.
18. Martens JW, Margossian AL, Schmitt M, Foekens J, Harbeck N. DNA methylation as a biomarker in breast cancer. *Future Oncol* 2009;5(8):1245-1256.
19. Mathers JC, Strathdee G, Relton CL. Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Adv Genet* 2010;71:3-39.
20. Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005;32(5):443-451.
21. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(1):1-11.
22. Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet* 2010;70:101-141.
23. Nagarajan RP, Costello JF. Molecular epigenetics and genetics in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* 2009;6(3):436-446.
24. Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol* 2009;19(3):188-197.
25. Oki Y, Issa JP. Review: recent clinical trials in epigenetic therapy. *Rev Recent Clin Trials* 2006;1(2):169-182.
26. Paige AJ, Brown R. Pharmaco(epi)genomics in ovarian cancer. *Pharmacogenomics* 2008;9(12):1825-1834.
27. Ross JS, Linette GP, Stec J et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(5):573-585.
28. Shelton BP, Misso NL, Shaw OM, Arthaningtyas E, Bhoola KD. Epigenetic regulation of human epithelial cell cancers. *Curr Opin Mol Ther* 2008;10(6):568-578.
29. Stebbing J, Bower M, Syed N, Smith P, Yu V, Crook T. Epigenetics: an emerging technology in the diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacogenomics* 2006;7(5):747-757.

30. Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat* 2004;7(4-5):267-278.
31. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Methods Mol Biol* 2009;507:3-20.
32. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol* 2010;44(1):71-81.
33. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 2008;659(1-2):40-48.
34. Vucic EA, Brown CJ, Lam WL. Epigenetics of cancer progression. *Pharmacogenomics* 2008;9(2):215-234.
35. Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer J* 2007;13(1):9-16.
36. Wild CP. Environmental exposure measurement in cancer epidemiology. *Mutagenesis* 2009;24(2):117-125.
37. Wooldridge JE, Weiner GJ. CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response. *Curr Opin Oncol* 2003;15(6):440-445.