



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO **Terapias epigenéticas en cáncer**

Epigenetic therapies in cancer

Autora: Paula Merino Vidal

Directora: M. Dolores Delgado Villar

Santander, junio 2020

ÍNDICE

RESUMEN	III
ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTRUCTURA Y MODIFICACIONES DE LA CROMATINA	2
2.1. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	2
2.2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS	3
<i>Writers, readers y erasers en la acetilación de histonas</i>	4
<i>Writers, readers y erasers en la metilación de histonas</i>	8
2.3. METILACIÓN DEL DNA.....	10
<i>Writers, readers y erasers en la metilación del DNA</i>	11
2.4. REMODELADORES DE CROMATINA	13
3. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER	15
3.1. ALTERACIONES EN LA METILACIÓN DEL DNA.....	16
<i>Hipometilación del DNA</i>	17
<i>Hipermetilación del DNA</i>	17
3.2. MUTACIONES EN REGULADORES EPIGENÉTICOS	19
<i>Mutaciones en reguladores de modificaciones de histonas</i>	19
4. TERAPIAS EPIGENÉTICAS EN CÁNCER	26
4.1. DIANAS TERAPÉUTICAS EPIGENÉTICAS	27
4.1.1. <i>Inhibidores de DNA metil transferasas (DNMTi)</i>	27
4.1.2. <i>Inhibidores de HDAC (HDACi)</i>	30
4.1.3. <i>Inhibidores de histona metil transferasas (HMTi)</i>	33
4.1.4. <i>Histona metil transferasa MLL</i>	37
4.1.5. <i>Inhibidores de histona demetiladas (HDMi)</i>	37
4.1.6. <i>Inhibidores de BET (BETi)</i>	39
4.1.7. <i>Inhibidores de IDH1</i>	41
4.1.8. <i>Terapia dirigida contra remodeladores de cromatina SWI/SNF</i>	41
4.2. COMBINACIÓN DE FÁRMACOS	42
4.3. INHIBIDORES EPIGENÉTICOS E INMUNOTERAPIA	44
5. CONCLUSIONES	47
6. REFERENCIAS	48
8. AGRADECIMIENTOS	51

RESUMEN

Actualmente, el conocimiento de las modificaciones epigenéticas fisiológicas -las modificaciones de la cromatina que alteran la expresión genética sin producir variaciones en la secuencia de DNA- ha permitido identificar las alteraciones epigenéticas presentes en cáncer. Los cambios en la acetilación y metilación en las colas de las histonas, la hipermetilación de islas CpG o la hipometilación global del DNA se han relacionado con distintas neoplasias sólidas y hematológicas, siendo actualmente un campo de investigación muy activo que intenta abordar estas alteraciones mediante terapias epigenéticas dirigidas. Para ello, se están desarrollando inhibidores de las proteínas que intervienen en este proceso (*writers*, *readers* y *erasers*), en base al conocimiento de su función molecular, de las marcas epigenéticas concretas con las que interactúan y de sus alteraciones en cáncer. En este trabajo se tratará un tema de enorme actualidad como es el de la terapia epigenética, no solo como terapia única, sino también en combinación con otras terapias epigenéticas, con los agentes antitumorales utilizados tradicionalmente y con la inmunoterapia, constituyendo éste un tema en constante renovación con gran potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: epigenética, cáncer, terapias epigenéticas

ABSTRACT

Currently, the knowledge of physiological epigenetic modifications -chromatin modifications that alter gene expression without producing variations in the DNA sequence- has allowed to identify the epigenetic alterations present in cancer. Changes in the acetylation and methylation in histone tails, hypermethylation of CpG islands or global hypomethylation of DNA have been related to different solid and hematological malignancies, being a very active field of research that tries to address these alterations through targeted epigenetic therapies. To this end, inhibitors of the proteins involved in this process (*writers*, *readers* and *erasers*) are being developed, based on the knowledge of their molecular function, the specific epigenetic marks with which they interact and their alterations in cancer. This work will deal with the highly topical issue that is epigenetic therapy, not only as a single therapy, but also in combination with other epigenetic therapies, with traditionally used antitumor agents and with immunotherapy. This is a subject in constant renewal with great therapeutic potential for cancer treatment.

Keywords: epigenetic, cancer, epigenetic therapies

ABREVIATURAS

2-HG:	2-hidroxiglutarato
AID:	citidina desaminasa inducida por activación
AN-9:	pivaloiloximetil butirato
AOE:	10-epoxy-decanoyl
ATRA:	ácido transretinoico
BAH:	bromodominios adyacentes homólogos
BER:	vía de reparación de escisión de base
BRD:	bromodominio
CBHA:	bishidroxamida del ácido m-carboxicinámico
CpG:	dinucleótido de citosina y guanina
CTA:	antígenos del cáncer de testículos
Dexx:	dominio helicasa tipo DEAD
DNMT:	DNA metil-transferasa
DZNep:	Deazaneplanocina A
EGCG:	galato de epigallocatequina
FDA:	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FIGO:	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
HAT:	histona-acetil-transferasas
HDAC:	histona-deacetilasa
HDM:	histona demetilasa
HELICc:	dominio c terminal helicasa
HMBA:	hexameten bisacetamida
IDH1 ó 2:	isocitrato deshidrogenasa-1 ó 2
IGF2:	factor de crecimiento similar a la insulina 2
IL-2:	interleucina 2
lncRNA:	RNA no codificante largo
JmjC:	dominio C de jumonji
KAT:	histona lisina acetiltransferasa
KDM1A:	demetilasa específica de lisina 1
KDM1A:	LSD1
KDM6A:	demetilasa 6A específica de lisina
KHMTasas:	lisina-histona-metil-transferasas
LMA:	leucemia mieloide aguda
LSD1:	demetilasa específica de lisina 1
MAGEA1:	antígeno asociado al melanoma 1
MBD:	proteínas de union a metil-citosina
MBT:	tumor cerebral maligno
MHC:	moléculas histocompatibilidad
MICA:	secuencia A relacionada con el polipéptido MHC clase I
MICB:	secuencia B relacionada con el polipéptido MHC clase I
miRNA:	microRNA
NDR:	zonas promotoras reguladoras de genes emprobecidas en nucleosomas

NK:	linfocitos <i>natural killer</i>
NuRD:	cromodominios de Mi-2
NURF:	factor de remodelación de nucleosomas
OGA:	N-oxalilglicina
PcG:	grupo polycomb
PDL-1:	ligando 1 de muerte programada
PHD:	homeodominios presentes en plantas
PI3K:	vía de la fosfoinositida 3-quinasa
PRC2:	complejo represivo polycomb 2
PRMT:	proteína arginina-metiltransferasa
pTEFb:	factor de elongación de la transcripción positivo
Rb:	retinoblastoma
SAH:	S-adenosil homocisteína
SAHA:	ácido suberoilánido hidroxámico (vorinostat)
SAM:	S-adenosil metionina
SBHA:	ácido bishidroxámico subérico
SET:	dominio trithorax
SIRT:	sir-tuinas
SMD:	síndrome mielodisplásico
snRNA:	pequeños RNA nucleares
TET:	proteína de translocación diez-once
TSA:	tricostatina A
TSS:	<i>Transcriptional Start Sites</i> (lugares de inicio de la transcripción)
UCHL1:	ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa1
UTX:	demetilasa 6A específica de lisina
VHL:	von Hippel-Lindau
VPA:	ácido valproico
α -KG :	ácido alfa-cetoglutárico

1. INTRODUCCIÓN

La epigenética es el proceso mediante el cual se regula la expresión génica a través de modificaciones heredables de la cromatina, que no suponen una variación de la secuencia del DNA y que son reversibles. Entre estos procesos se encuentran las modificaciones postraduccionales de histonas, así como la metilación del DNA o la regulación con RNAs no codificantes (Küçük et al., 2020; Pfister and Ashworth, 2017). Respecto a las modificaciones postraduccionales de las histonas destacan la acetilación y metilación de lisinas y argininas en las colas de las histonas, aunque existen muchos otros mecanismos implicados como la fosforilación, ubiquitilación y otros (Cheng et al., 2019). También cabe destacar que la metilación del DNA se lleva a cabo prioritariamente en las citosinas de las islas CpG, presentes fundamentalmente en los promotores de genes (Ahuja et al., 2016; Delgado, 2009; Esteller, 2008). En estos procesos intervienen grandes grupos de proteínas indispensables conocidas como *writers* (catalizan las modificaciones, por ejemplo, la adición de un grupo acetilo o un grupo metilo), *readers* (reconocen dominios específicos de las modificaciones e interaccionan con ellos) y *erasers* (retiran las modificaciones realizadas por los *writers*) (Brien et al., 2016). La cromatina también puede modificarse por los complejos remodeladores de la cromatina, proteínas que alteran los contactos entre las histonas y el DNA. Conocer los patrones de modificación fisiológicos y las proteínas que intervienen ha ayudado a estudiar las alteraciones epigenéticas implicadas en el desarrollo del cáncer y la progresión tumoral, así como a desarrollar terapias dirigidas contra las mismas. De este modo se sabe que tanto determinadas modificaciones de las histonas como la hipometilación global del DNA y la hipermetilación de las islas CpG están relacionadas con procesos cancerígenos (Baylin and Jones, 2011).

Conocer los componentes y patrones de la regulación epigenética que participan en cáncer ha sido clave a la hora de desarrollar terapias epigenéticas, dado que tales alteraciones son reversibles y es posible utilizarlas como diana terapéutica. Actualmente, la terapia epigenética constituye un campo de investigación muy activo que se encuentra en continuo estudio y desarrollo tanto en neoplasias hematológicas como sólidas (Ahuja et al., 2016; Allis and Jenuwein, 2016; Pfister y Ashworth, 2017; Cheng et al., 2019; Morel et al., 2020). Los primeros fármacos que se desarrollaron eran relativamente inespecíficos y presentaban elevada toxicidad, pero con los fármacos de segunda generación se ha conseguido mayor especificidad y menor toxicidad, estando varios ya aprobados por la FDA como la decitabina y el vorinostat (un inhibidor de DNA metil transferasas y un inhibidor de histona deacetilasas, respectivamente). Los inhibidores más estudiados son los inhibidores de DNA metil transferasas y los inhibidores de histona deacetilasas, pero también se han llevado a cabo otras terapias dirigidas al resto de proteínas que participan en la regulación epigenética, actualmente en múltiples ensayos clínicos. Se han encontrado limitaciones al utilizar estas terapias como terapia única, por lo que se han desarrollado enfoques combinados para mejorar la actividad clínica sin empeorar la toxicidad, y resulta especialmente prometedor en las neoplasias sólidas. Dichas terapias combinadas no se han llevado a cabo solo entre diferentes fármacos epigenéticos, sino que también se han ensayado en combinación con terapias estándar e inmunoterapia (Mohammad et al., 2019). En el presente trabajo se recogen los principales avances en este campo de investigación especialmente innovador, actual e importante hoy en día.

2. ESTRUCTURA Y MODIFICACIONES DE LA CROMATINA

2.1. Estructura de la cromatina

A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas poseen una ordenación del DNA en cromosomas, cada uno de ellos compuesto por una molécula lineal de DNA. En estas células el DNA se encuentra asociado con unas proteínas de pequeño tamaño denominadas histonas, que hacen que éste quede condensado en el núcleo de forma organizada formando la cromatina, que se compone de una mayor proporción de proteína que de DNA (Kornberg et al 2017). Las proteínas fundamentales en la estructura de la cromatina son las histonas, cuya característica principal es que se componen de aminoácidos básicos (lisina y arginina) que van a facilitar la unión con el DNA, que posee carga negativa. Podemos distinguir cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), de las cuales las cuatro últimas van a formar la unidad básica estructural de la cromatina, el nucleosoma, mientras que la histona H1 servirá de unión (Kornberg et al 2017).

El nucleosoma es una estructura de 10 nm formado por un octámero de histonas: un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, constituyendo las partículas centrales o core del nucleosoma, con el DNA enrollado a su alrededor (147 pares de bases, 1,65 vueltas) (Delgado, 2009; Cooper and Hausman, 2017; Kumar et al., 2016). Las histonas presentan dos dominios: una α -hélice central, cuyos extremos se componen de dos pequeñas α -hélices, que se encuentra en contacto con el DNA del nucleosoma y participa con las interacciones con otras histonas, y un dominio N-terminal poco estructurado que forma las denominadas “colas de las histonas”, conformado por pocos residuos (de 15 a 30 aminoácidos) y que se encuentra por fuera del nucleosoma. Conocer la estructura de las histonas nos ayudará posteriormente a comprender las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir ya que éstas se producirán en las “colas”, provocando un cambio en la estructura de la cromatina y como consecuencia, también en su función (Cooper and Hausman, 2017).

La cromatina se condensa más o menos según la fase del ciclo celular en el que se encuentre y también desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, de tal manera que aquellas modificaciones que no afectan a la secuencia de DNA pero sí a la organización y condensación de la cromatina, denominadas modificaciones epigenéticas, van a intervenir también en su uso y en la herencia de las mismas. De este modo, la epigenética consiste en modificaciones o alteraciones de la expresión génica (silenciamiento o activación génica) heredables de célula madre a célula hija, pero sin que impliquen una alteración de la secuencia de DNA propiamente dicha (Tsai and So, 2017). Waddington estableció que fundamentalmente eran cambios en el fenotipo sin cambios en el genotipo (Allis and Jenuwein, 2016).

Los cambios epigenéticos incluyen modificaciones postraduccionales de histonas, metilación del DNA, remodelación de nucleosomas y regulación con RNAs no codificantes (miRNA, lncRNA). Las anomalías epigenéticas se relacionan con carcinogénesis y están implicadas en la aparición de diferentes cánceres de forma específica (Küçük et al., 2020). Los que más relevancia presentan y por tanto trataremos

con más detalle son la acetilación y metilación de histonas, la metilación del DNA y los remodeladores de la cromatina.

2.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas

Como se ha mencionado anteriormente, una de las modificaciones epigenéticas más importantes son las modificaciones postraduccionales de las histonas. Entre estas destacan la acetilación y metilación de lisinas y argininas, que constituyen los mecanismos más importantes y serán desarrollados a continuación, pero también se incluyen la fosforilación de serinas y treoninas, la ubiquitilación, la SUMOilación de lisinas, la citrulinación, la ADP-ribosilación, la desaminación, la formilación, la O-GlcNAcilación, la propionilación, la butirilación, la crotonilación y la isomerización de prolina (Figura 1) (Cheng et al., 2019).

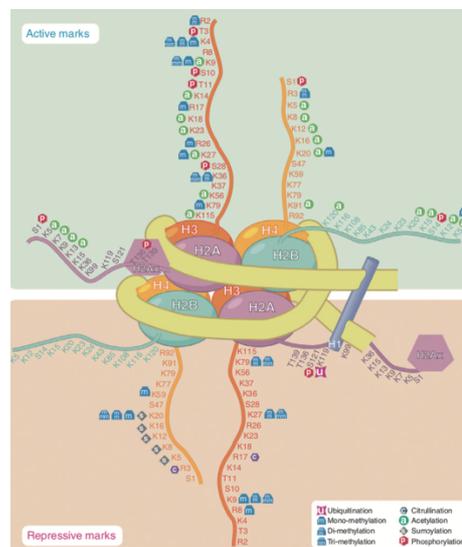


Figura 1. Se representa un nucleosoma con las cuatro histonas que forman el core central y la histona H1 unida al DNA y haciendo de enlace. Se observan las colas de las histonas con diferentes modificaciones postraduccionales, en la parte superior las marcas activas y en la inferior las marcas represivas (Sawan and Herceg, 2010).

Las modificaciones de las colas de las histonas provocan un cambio de conformación y permite que puedan unirse complejos proteicos, que a su vez permitirán nuevas modificaciones de histonas. Este proceso está muy regulado y genera cromatina modificada de forma estable, que puede transmitirse de generación en generación en cada división celular, permitiendo que sean heredables ciertos patrones característicos de cromatina activa e inactiva (Cooper and Hausman, 2017). La acetilación y metilación de histonas, por tanto, van a activar o reprimir la transcripción y con ello la expresión génica (Ahuja et al., 2016). De este modo, las histonas no son únicamente proteínas de empaquetamiento del DNA, sino que participan en la regulación de la expresión génica a través de las modificaciones postraduccionales que sufren puesto que afectan tanto a la transcripción como a la reparación del DNA (Esteller, 2008).

Según su grado de condensación, la cromatina puede clasificarse como heterocromatina (inactiva, muy condensada y sin expresión) y eucromatina (regiones menos plegadas) (Figura 2). La heterocromatina está estrechamente ligada a niveles

bajos de acetilación y niveles elevados de metilación en algunos residuos de histonas, mientras que en la eucromatina los patrones no son tan claros, activándose o reprimiéndose genes según sea necesario, aunque suelen verse en los genes transcripcionalmente inactivos niveles disminuidos de acetilación, metilación y fosforilación, y en los genes transcripcionalmente activos niveles elevados de acetilación de histonas (Figura 2).

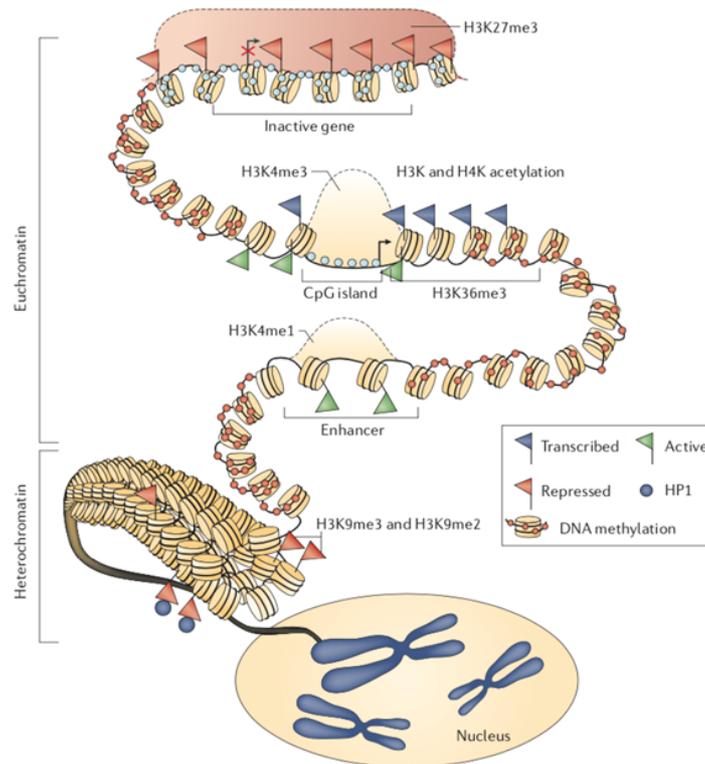


Figura 2. La imagen representa los diferentes estados de la cromatina, el lugar que ocupan los nucleosomas y la metilación del DNA en condiciones normales. En la parte superior, en la eucromatina, la X roja determina el punto de inicio de la transcripción de un gen silenciado. La isla CpG promotora del gen está invadida por el complejo polycomb (área roja) que media la trimetilación de H3K27 que es una alteración represiva (banderas rojas). Más abajo se representa un gen activo susceptible de ser transcrito. Éste posee modificaciones activadoras (banderas verdes) como H3K4me3 en el promotor, acetilación de lisinas en las histonas H3 y H4 y H3K36me3 para facilitar la elongación transcripcional. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción, libre de nucleosomas y con el DNA no metilado en la isla CpG. En la parte inferior se representa la compactación de los cromosomas con marcas represivas (H3K9me2 y H2K9me3) que constituye la heterocromatina, inactiva transcripcionalmente, intensamente metilada (puntos rojos) y la proteína HP1 (círculo azul) que también constituye una señal represiva (Baylin and Jones, 2011).

Writers, readers y erasers en la acetilación de histonas

En general, existe una correlación entre la acetilación de histonas y la cromatina transcripcionalmente activa como ocurre, por ejemplo, con la acetilación de las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3. Esto es debido a que el extremo N-terminal de las histonas, al ser rico en lisinas (que poseen carga positiva), es susceptible de acetilación,

lo que favorece que la carga se neutralice y la cromatina se descondense, dejando la secuencia de DNA listo para ser transcrito y abriendo el acceso a proteínas reguladoras (Cooper and Hausman, 2017; Esteller, 2008). La acetilación y deacetilación de las histonas es un proceso altamente regulado en el que intervienen diferentes enzimas que se describen a continuación.

Las modificaciones postraduccionales de las histonas van a ser reguladas por tres grandes grupos de proteínas, que se clasifican en *writers*, *readers* y *erasers* (Figura 3) (Allis and Jenuwein, 2016). Los *writers* van a catalizar las modificaciones postraduccionales de histonas, y entre ellas se encuentran las histona-acetil-transferasas (HAT), cuya función consiste en acetilar histonas o las histona-metil-transferasas (que metilan histonas). Por su lado, los *readers* reconocen dominios específicos de las histonas modificadas, se fijan a ellos mediante dominios propios como bromodominios (BRD, que se unen a histonas acetiladas) y los interpretan para llevar a cabo una función determinada. Por último, los *erasers* cumplen la función de eliminar las marcas llevadas a cabo por los *writers* y en este grupo de enzimas podemos encontrar histona-demetilasas (HDM), que retiran el grupo metilo, e histona-deacetilasas (HDACs), que provocan la deacetilación de las colas de histonas acetiladas. De este modo, las modificaciones postraduccionales llevadas a cabo por estas enzimas van a ser las que provoquen un cambio de conformación de la cromatina, activando o reprimiendo así la transcripción (Ahuja et al., 2016; Brien et al., 2016; Mohammad et al., 2019).

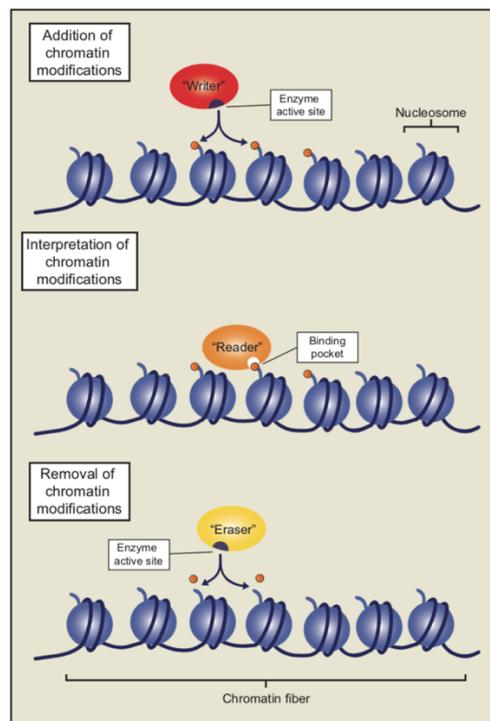


Figura 3. Existen tres tipos de proteínas que participan en la regulación de las modificaciones postraduccionales de histonas: *writers* (aquellas que añaden las modificaciones), *readers* (reconocen e interpretan las modificaciones) y *erasers* (eliminan dichas modificaciones) (Brien et al, 2016).

Histona Acetil Transferasas (HAT)

Las HAT (*writers*) se agrupan en familias como GNAT, que comprende un dominio de unión de histonas que actúa como coactivador de factores activadores de la transcripción a través de la unión a acetil-lisinas mediante un dominio acetil-transferasa y un bromodominio. Tenemos otros ejemplos como MYST, CBP/p300, MOZ, MORF, etc. (tabla 1). La familia CBP/p300 regula la transcripción de una forma más global y se componen de un dominio HAT, un bromo-dominio y otras zonas que favorecen la interacción entre proteínas (Delgado, 2009). Así, los factores activadores de la transcripción interaccionan con coactivadores con dominios HAT mientras que los factores represores con correpresores capaces de atraer a las HDAC (deacetilasa de histonas) a la cromatina (Cooper and Hausman, 2017).

Tabla 1. Modificaciones en cada histona y cada residuo y las enzimas está implicadas en dichas modificaciones (Sawan and Herceg, 2010).

Table 3.1. Different Histone Modifications on Different Histone Residues								
Modification	Histone	Residue	Organism	Enzyme	Possible role			
Acetylation	H2A	K4	Y	Esa1	Ta			
		K5	M	Tip60, Hat1, P300/CBP	Ta, R			
		K7	Y	Hat1, Esa1	Ta			
	H2B	K5	M	ATF2	Ta			
		K11	Y	Gen5	Ta			
		K12	M	ATF2, P300/CBP	Ta			
		K15	M	ATF2, P300/CBP				
		K16	Y	Gen5, Esa1	Ta			
		K20	M	P300	Ta			
	H3	K4	Y	Esa1, Hpa2				
		K9	M/Y	Gen5, SRC-1	Ta, R			
		K14	M/Y		Gen5, PCAF, Tip60, SRC-1,	Ta, R,		
					hTFIIIC90, TAF1, p300/Gen5,	Rep		
					Esa1, Elp3, Hpa2, TAF1, Sas2, Sas3			
		K18	M/Y	P300, CBP/Gen5 (SAGA)	Ta, R			
		K23	M/Y	P300, CBP/Gen5 (SAGA), Sas3	Ta, R			
		K27	M	Gen5	Ta, R			
	H4	K5	M/Y	Hat1, Tip60, ATF2, p300/Hat1, Esa1, Hpa2	Ta, R,			
Rep								
K8		M/Y	Gen5, PCAF, Tip60, ATF2, p300/Esa1, Elp3	Ta, R,				
				Rep				
K12		M/Y	Hat1, Tip60/Hat1, Esa1, Hpa2	Ta, R,				
K16	M/Y		MOF, Gen5, Tip60, ATF2/Gen5,	Rep				
			Esa1, Sas2	Ta, R				
Methylation	H1	K26	M	EZH2	Tr			
		R2	M	CARM1	Ta			
	H3	K4	M/Y	MLL4, SET1, MLL1, SET7/9, MYD3/Set1	Ta			
					R8	M	PMRT5	Tr
					K9	M/Y	SUV39h1, SUV39h2, ESET, G9A, EZH2, Eu-HMTase1/Clr4, S.p. Clr4	Ta, Tr
	R17	M	CARM1	Ta				
	H4	R3	M	PRMT1, PRMT5	Ta			
					K20	M/Y	PR-SET7, SUV4-20/SET9	Ta, Tr,
								R
					R26	M	CARM1	Ta
					K27	M	EZH2, G9A	Ta, Tr
					K36	M/Y	HYPB, NSD1/Set2, S.c.	Ta
K79	M/Y	DOT1L/S.c. Dot-1	Ta, Tr,					
			R					

Histona deacetilasas (HDACs)

La deacetilación de las histonas, al contrario que la acetilación, provoca que la cromatina se condense y favorece por ello la represión transcripcional. Del mismo modo que existen varias familias de HATs, podemos encontrar varias familias de histona

deacetilasas (HDAC), que van a constituir los *erasers*, clasificadas en cuatro clases (tabla 2). En la clase I, se incluyen las HDAC 1, 2, 3 y 8, que tienen en común que presentan zinc en su región activa, indispensable para su función y forman parte de diversos complejos de represión acompañadas de co-represores como NcoR, SMRT, MEF, MeCP2 o Sin3A; en la clase II, las HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10; en la clase III, NAD-dependiente de la familia SIRT (sir-tuinas); y en la clase IV se incluyen las HDAC 11.

Tabla 2. Clasificación de las familias de histona deacetilasas (Seto and Yoshida, 2014).

HDAC classification					
Superfamily	Family	Class	Protein (<i>S. cerevisiae</i>)	Subclass	Protein (human)
Arginase/deacetylase superfamily	Histone deacetylase family	Class I	Rpd3, Hos1, Hos2, Hos3		HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
		Class II	Hda1	Class IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
				Class IIb	HDAC6, HDAC10
		Class IV			HDAC11
Deoxyhypusine synthase like NAD/FAD-binding domain superfamily	Sir2 regulator family	Class III	Sir2, Hst1, Hst2, Hst3, Hst4	I II III IV	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7

Familias BET (Bromodomain and extra-terminal)

Por último, las familias BET son *readers* de acetil-lisinas que fomentan la transcripción. Así, se unen a acetil-lisinas, favoreciendo la transcripción mediante la interacción y reclutamiento de pTEFb (factor de elongación de la transcripción positivo) y los complejos del “mediator” a la cromatina. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas con bromodominios BRD4 o BRD3. Además, estas familias se asocian a NUT, proteína que interactúa con las HAT p300/CBP y favorece su actividad. Las proteínas de fusión BRD-NUT se asocian asimismo con regiones con niveles elevados de acetilación de histonas, constituyendo estos focos megadominios de unión a BRD-NUT, aunque también a pTEFb y componentes de mediator. Dichos megadominios requieren la asociación de los bromodominios BET, p300/CBP y acetiltransferasa, lo que lleva a pensar que la acetilación de histonas llevada a cabo por p300/CBP forma regiones de unión para los bromodominios BET, aumentando los complejos BET-NUT de la cromatina de alrededor (Brien et al., 2016; Filippakopoulos et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, los bromodominios constituyen dominios propios de los *readers* que reconocen y se unen a regiones de las histonas acetiladas. Existen 61 BRDs en el genoma humano (entre los que se encuentran los descritos en el párrafo anterior) que forman parte de HAT, complejos de remodelación de cromatina

dependientes de ATP, metiltransferasas, coactivadores transcripcionales y la familia BET, entre otras proteínas diversas (tabla 3). El dominio suele estar rodeado por otros dominios que constituyen *readers* como homeodominios presentes en las plantas (PHDs), múltiples BRDs y otros dominios que permiten la unión de proteínas como bromodominios adyacentes homólogos (BAH) (Filippakopoulos et al., 2012).

Tabla 3. Algunos tipos de BRDs (Filippakopoulos et al., 2012).

Proteína	Nombre	Otros nombres	Función
BRD1	Bromodominio que contiene la proteína 1	BRL, BRPF2	Regulador transcripcional, proteína estructural
BRD2	Bromodominio que contiene la proteína 2	FISH, RING3	Regulador transcripcional
BRD3	Bromodominio que contiene la proteína 3	ORFX, RING3L	Regulador transcripcional
BRD4	Bromodominio que contiene la proteína 4	CAP, MCAP, HUNK1	Regulador transcripcional
BRD7	Bromodominio que contiene la proteína 7	BP75, NAG4, CELTIX1	Regulador transcripcional
BRD8B	Bromodominio que contiene la proteína 8B	SMAP, SMAP2	Regulador transcripcional
BRD9	Bromodominio que contiene la proteína 9		Desconocida

La familia BET reconoce múltiples péptidos acetilados, y se ha demostrado que BRD4 interactúa mayoritariamente con regiones de lisinas di o triacetiladas, así como reconoce múltiples modificaciones de la cola de la histona H4. Las regiones con más de una acetilación poseen mayor afinidad para la unión de BRD en comparación con marcas individuales, como ocurre por ejemplo en la histona H4 tetraacetilada en las lisinas K5, K8, K12 y K16, que atrae con mayor intensidad a BRD2 y BRD4 (Filippakopoulos et al., 2012).

Writers, readers y erasers en la metilación de histonas

Por lo que se refiere a la metilación de histonas, ésta se asocia a activación o represión de la transcripción según el residuo de la histona que ocurra (Cooper and Hausman, 2017; Tsai and So, 2017; Esteller, 2008). Esta modificación tiene lugar en los residuos de lisina y arginina, que pueden ser mono, di o trimetilados (esto solo en el caso de la lisina) y se ejerce fundamentalmente en las histonas H3 o H4 (Tsai and So 2017). Por ejemplo, la metilación de los residuos de lisina 4, 36 y 79 de la histona H3, así como la metilación de los residuos de arginina 17 y 26 y la dimetilación de la arginina 3 en la histona 4, se asocian a activación transcripcional y por tanto a una cromatina menos condensada (Tsai and So, 2017; Cooper and Hausman, 2017; Esteller, 2008). Sin embargo, la metilación de las lisinas 9 y 27, también de la histona H3, y de la lisina 20 de la histona H4, se han correlacionado con represión transcripcional y con ello, a un gran empaquetamiento de la cromatina debido a que actúan como dominios de unión para correpresores (Cooper and Hausman, 2017; Tsai and So, 2017; Esteller, 2008). La metilación del residuo H3K9, y especialmente la triple metilación, está estrechamente asociada al silenciamiento de la heterocromatina. Además de los ejemplos mencionados previamente, podemos añadir que la metilación en H3K36 y H3K79 se relaciona con actividad transcripcional mientras que la metilación de H3K9, H4K20 se asocian con represión transcripcional.

Al igual que en la acetilación de histonas, en la metilación de éstas también existen enzimas específicos que se encargan de añadir, leer o retirar las modificaciones postraduccionales.

Histona metil transferasas (HMT)

La metilación de las lisinas y argininas es una modificación muy estable que se ejerce por enzimas específicos que actúan como *writers* (lisina-histona-metil-transferasas o KHMTasas), existiendo tres tipos fundamentalmente: i) histona metil-transferasas específicas de lisina con dominio SET (que actúan sobre las lisinas 4, 9, 27 y 36 de la histona H3 y sobre la lisina 20 de la histona H4), ii) sin dominio SET (modifican la histona H3 en su residuo de lisina 79) y iii) arginina metil-transferasas (actúan sobre varias argininas de las histonas H3 y H4) (Delgado, 2009; Sawan and Herceg, 2010). Las principales lisina-histona metil transferasas cuyas mutaciones tienen un papel en la tumorigénesis son:

- **MLL1** (KMT2A), actúa como metiltransferasa de H3K4. La metilación de H3K4 va a generar una región que permitirá la unión de proteínas con cromodominios, posteriormente atrayendo acetil-transferasas para mediar la activación de la transcripción. A su vez, también está relacionada con la unión de complejos remodeladores de la cromatina que generan cambios conformacionales en los nucleosomas permitiendo así la descondensación de la cromatina y consecuentemente la activación transcripcional (Brien et al., 2016; Jones, 2012).
- **EZH2**, forma parte del complejo polycomb2 (junto con SUZ12 y EED). Constituye la subunidad catalítica del complejo polycomb y ejerce la mono, di o trimetilación en H3K27 en las regiones promotoras de los genes diana de PRC2, provocando la represión transcripcional. El grupo polycomb va a hacer de intermediario entre los elementos reguladores de genes y la maquinaria de transcripción (Brien et al., 2016; Jones, 2012).
- **ASXL1**, otra proteína del grupo polycomb relacionada con la dimetilación y trimetilación de H3K27 llevada a cabo por PRC2 que provoca una supresión de los genes HOXA que se traduce en una inhibición del crecimiento celular (Tsai and So, 2017).
- **NSD2**, también forma parte de las HMT con dominio SET (MMSET o WHSC1) y ejerce la dimetilación en H3K36 en genes activos provocando una activación transcripcional (en ocasiones puede funcionar como represor, pero fundamentalmente constituye un activador). Esta metilación inhibe directamente la actividad enzimática del complejo PRC2 (Brien et al., 2016)

En cuanto a la metilación de histonas en residuos de arginina, éstas pueden ser mono o dimetiladas por proteínas arginina-metiltransferasas (PRMTs). Estas enzimas poseen un núcleo que presenta la actividad catalítica, pero son muy diferentes entre sí en lo que se refiere a las regiones N y C terminales. Existen dos tipos de PRMT: las tipo I, que catalizan la monometilación y la dimetilación asimétrica de la arginina y las tipo II, que catalizan la monometilación y la dimetilación simétrica de la arginina. Se conoce que la metilación de arginina está relacionada con la expresión de genes supresores de tumores (Filippakopoulos et al., 2012).

Histona Demetilases

Por lo que se refiere a las demetilases de histonas (*erasers*), también se conocen varias familias (Filippakopoulos et al., 2012; Jones, 2012).

- **KDM1A o LSD1** (demetilasa específica de lisina 1). Cataliza la desmetilación de la H3K4 mono y dimetilada. También es demetilasa de H3K9.
- **KDM6A/UTX** (demetilasa 6A específica de lisina)
- **JARID1A**. Se han descrito demetilases que presentan un dominio C de jumonji (JmjC) denominadas JARID1A-D. Estas pertenecen a una gran familia de dioxigenasa y entre ellas se encuentra, por ejemplo, JHDM1A, que retira la mono y dimetilación en H3K36. Esta superfamilia de enzimas desmetilan con un mecanismo diferente al de LSD1/KDM1 y además pueden catalizar la desmetilación de residuos trimetilados.
- Además, existen otras familias que también poseen dominios jumonji y actúan a nivel de K4, K9, K27 y K36 retirando los residuos metilados.

Readers de histonas metiladas

En cuanto a los readers, nos centraremos en los que implican la metilisina. Existen dos familias principales: la familia Real, donde se incluyen los dominios Tudor, los cromodominios y los dominios de tumor cerebral maligno (MBT); y los dominios PHD (Dawson and Kouzarides, 2012)

2.3. Metilación del DNA

La metilación del DNA está fuertemente implicada en el control de la expresión génica. En humanos ocurre en citosinas que siguen la secuencia CpG, dinucleótido que se encuentra a lo largo de todo el genoma (Ahuja et al., 2016; Delgado, 2009; Esteller, 2008). La gran mayoría de nuestro DNA presenta poca cantidad de dinucleótidos CpG y habitualmente se encuentran metilados. Sin embargo, existen a lo largo del genoma zonas que presentan abundantes dinucleótidos CpG, denominadas islas CpG, mayoritariamente sin metilación, y que suelen formar parte de zonas promotoras reguladoras de genes, particularmente empobrecidas en nucleosomas (NDR) y previas a las regiones de inicio de la transcripción (Ahuja et al., 2016; Delgado, 2009; Jones, 2012; Baylin and Jones, 2011). Los nucleosomas que delimitan los NDR se encuentran marcados con la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3), presentan una amplia acetilación de lisinas y además poseen la variante de histona H2A.Z, cuya función es desestabilizar los nucleosomas para permitir el inicio de la transcripción (Baylin and Jones, 2011). Así, las islas CpG de los promotores van a ser muy activas transcripcionalmente y, por lo tanto, tienen una estructura cromatínica muy poco condensada (contienen muy pocos nucleosomas). Por otra parte, las regiones hipermetiladas serán ricas en nucleosomas, constituyendo la metilación de las islas CpG un mecanismo de silenciamiento génico (Ahuja et al., 2016; You and Jones, 2012; Pfister and Ashworth, 2017). La metilación del DNA es un proceso muy relevante para mantener la estabilidad genómica mediante la regulación tanto los promotores de islas no CpG como de islas CpG y secuencias repetitivas (LINE y/o SINE) (Jones, 2012). Estabiliza el silenciamiento epigenético en promotores que no presentan la variante de

histona H2A.Z así como en aquellos que presentan nucleosomas a continuación de los sitios de comienzo de la transcripción (TSS) y los que presentan modificaciones represivas en histonas. La metilación del DNA no solo se relaciona con genes inactivos asociados al cromosoma X, genes de “imprinting” y genes germinales específicos, sino también con alteraciones propias del cáncer incluido el silenciamiento de los genes supresores de tumores (Baylin and Jones, 2011).

Como se detallará en el apartado de “alteraciones epigenéticas en cáncer”, la hipometilación especialmente (aunque también la hipermetilación de los promotores como se ha explicado previamente) se han relacionado inestabilidad genómica y con la activación de oncogenes y elementos transponibles, debido a variaciones en la expresión de los genes, y estas anomalías en la metilación del DNA pueden originar distintos tumores (Ahuja et al., 2016; Pfister and Ashworth, 2017). Desde hace años se conoce que las células cancerosas característicamente presentan una hipometilación generalizada del genoma y una hipermetilación del promotor de ciertos genes implicados en cáncer (Pfister and Ashworth, 2017).

Writers, readers y erasers en la metilación del DNA

Los *writers*, *readers* y *erasers* no son exclusivos de las modificaciones postraduccionales de histonas, catalizando también las alteraciones en el DNA y clasificándose del mismo modo. A continuación, se detallan las enzimas implicadas en la adición del grupo metilo, así como las que lo reconocen y aquellas que eliminan la marca.

DNA metil transferasas (DNMTs)

La metilación del DNA está catalizada por DNA metiltransferasas (DNMTs), que transfieren grupos metilo de S-adenosil-L-metionina en el extremo 5' de las citosinas. Existen varias familias DNMTs, de las que vamos a mencionar tres (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B), que constituyen los *writers* que van a llevar a cabo diferentes patrones de metilación del DNA. La DNMT predominante es DNMT1, que conserva los patrones de metilación que ya existen, mientras que DNMT3A y DNMT3B, menos abundantes, forman nuevas regiones de metilación y se expresan durante todo el ciclo celular (Figura 4) (Ahuja et al., 2016; Jones, 2012). Se ha establecido la colaboración entre DNMT1 y DNMT3A y 3B tanto en células normales como cancerosas, y se entiende que DNMT3A y DNMT3B reparan los errores posteriores a la síntesis de DNA llevados a cabo por DNMT1. DNMT3A y DNMT3B se encuentran unidas a los nucleosomas y en contacto con el DNA a través de las metilaciones generadas por ellas mismas para inducir la herencia epigenética (Baylin and Jones, 2011).

Proteínas de unión a metil-citososina (MBDs)

Por otro lado, las MBD (methyl cytosine binding proteins) corresponden a los *readers* que reconocen el DNA metilado. Se conocen principalmente cinco MBD, entre las que se encuentran MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4. Éstas, se vinculan a zonas del DNA silenciadas por hipermetilación y por tanto están implicadas en la represión transcripcional (Ahuja et al., 2016; Jones, 2012).

Las proteínas MBD van a facilitar que se unan complejos que realizan otra acción, por ejemplo, complejos histona deacetilasa e histona metil transferasas, haciendo que exista una asociación funcional entre la metilación del DNA y las modificaciones de histonas. De este modo, las proteínas DNMT/MBD influyen de manera directa al nivel de metilación del DNA, pero también intervienen en los patrones de ocupación e nucleosomas, estando la alteración de las mismas relacionada con el desarrollo del cáncer.

Desmetilación del DNA

Respecto a la desmetilación del DNA, ésta se puede llevar a cabo mediante un proceso activo o pasivo (Figura 4). La desmetilación pasiva ocurre durante la replicación cuando las regiones metiladas no se mantienen y se produce por tanto la pérdida de dichas metilaciones, mientras que la desmetilación activa ocurre independientemente de la replicación del DNA y se lleva a cabo mediante enzimas que hidroxilan, oxidan o desaminan las 5'-metil-citosinas (Jones, 2012).

Dentro del grupo de desmetilación activa vamos a encontrar a las proteínas de translocación diez-once (TETs) y las citidina desaminasa inducida por activación (AID), que son enzimas que eliminan la metilación del DNA y por tanto constituyen los *erasers*. La familia TET incluye tres tipos: TET1, TET2 y TET3, y se conoce que cada una de ellas lleva a cabo una función (Ahuja et al., 2016; Jones, 2012). Dicha familia va a catalizar la formación de 5-hidroximetilcitosina a partir de una citosina metilada, con un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la tumorigénesis (Figura 4) (Baylin and Jones, 2011). El proceso de desmetilación es progresivo, de tal forma que comienza por la hidroxilación de 5' metil-citosina por proteínas TET y puede continuar por dos vías: o bien con la actividad de las proteínas AID/APOBEC que producen una desaminación o bien con la entrada en la vía de reparación de escisión de base (BER) mediante una previa carboxilación (Jones, 2012).

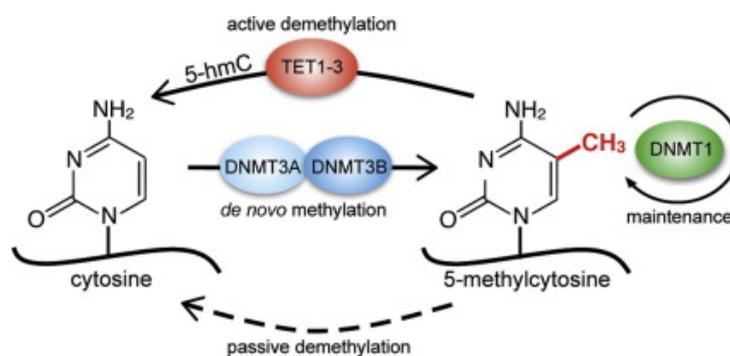


Figura 4. Se representa la metilación y demetilación del DNA. A la izquierda, se puede ver la estructura molecular de una citosina. La DNMT3A y DNMT3B, representadas como círculos azules, transfieren de novo el grupo metilo a la citosina, transformándola en 5-metilcitosina, mientras que DNMT1 mantiene dicha modificación. Por otro lado, en la parte superior, se esquematiza la demetilación activa llevada a cabo por TET1-3, retirando el grupo metilo de la metilcitosina y dejándola de nuevo como citosina. En la parte inferior de la imagen se simboliza la demetilación pasiva (Ambrosi et al., 2017).

2.4. Remodeladores de cromatina

La cromatina puede sufrir modificaciones bien a través de enzimas que interaccionan con las histonas o bien mediante los denominados factores remodeladores de la cromatina, complejos proteicos que provocan una variación en los contactos entre las histonas y el DNA. Estos factores proteicos pueden actuar esencialmente a través de tres mecanismos: i) mediante el desplazamiento del octámero de histonas a lo largo de la secuencia del DNA para permitir un reordenamiento nucleosomas y hacer más accesibles ciertas regiones del DNA para la transcripción, ii) provocando cambios conformacionales en los nucleosomas que al igual que en el caso anterior, dejarían secuencias de DNA al descubierto para ser susceptibles de transcripción y iii) eliminando histonas del DNA, haciendo que algunas secuencias queden libres de las mismas (por ejemplo, los promotores). Además, los factores remodeladores pueden ir acompañados de activadores o represores de la transcripción, que van a modificar la arquitectura de los nucleosomas favoreciendo o frenando la misma (Cooper and Hausman, 2017).

De esta manera, los remodeladores de la cromatina son complejos proteicos que, dependiendo de la hidrólisis de ATP, modifican la interacción entre las histonas y el DNA generando una reestructuración de los nucleosomas para que la maquinaria de la transcripción pueda acceder a los genes diana (Delgado, 2009; Kumar et al., 2016). Pueden actuar mediante diferentes mecanismos como la desestructuración del octámero de histonas y desenrollamiento transitorio del DNA, la formación de lazos de DNA o el cambio de posiciones de los nucleosomas. Así se producen variaciones y los factores de transcripción pueden acceder a zonas del DNA a las que no accedían previamente (Dawson and Kouzarides, 2012; Pfister and Ashworth, 2017; Kumar et al., 2016).

Estos complejos proteicos se dividen en cuatro familias (Figura 5): la familia SWI/SNF que incluye ARID1A, ARID1B, BRG1 (también denominado SMARCA4), SNF5 (también conocido como SMARCB1, INI1 o BAF47) y PBRM1; la familia ISWI, la familia NuRD/Mi-2/cromodominio de unión a DNA helicasa (CHD), y la familia INO80 (Dawson and Kouzarides, 2012; Pfister and Ashworth, 2017; Kumar et al., 2016).

Estas enzimas están conservadas evolutivamente y utilizan el ATP para provocar cambios en las histonas, bien moviéndolas, intercambiándolas o retirándolas. Además, poseen dominios diferentes para leer la cromatina como dominios SANT, bromodominios y cromodominios, que identifican regiones concretas y hacen que el remodelado sea específico (Dawson and Kouzarides, 2012; Pfister and Ashworth, 2017). Cada familia contiene una o dos ATPasas catalíticas tipo SWI2/SNF acompañadas de varias subunidades que van a aportar la especificidad para realizar determinados procesos biológicos (Kumar et al., 2016).

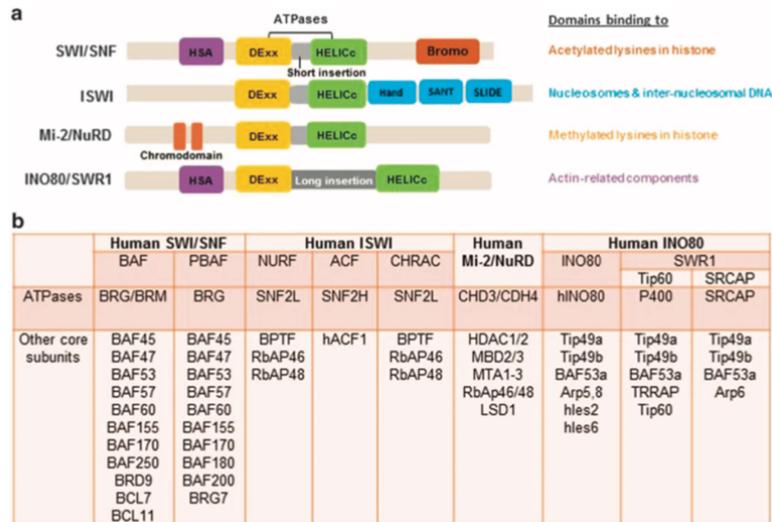


Figura 5. Clasificación de las familias de remodeladores de cromatina. (a) Se representa el dominio de la región catalítica ATP-asa de las cuatro principales familias, que se compone de un dominio helicasa tipo DEAD (Dexx) y otro dominio C-terminal helicasa (HELICc). En cada familia existen otros dominios específicos como el bromodominio de SWI/SNF o los cromodominios de Mi-2 (NuRD). (b) Se detallan las subunidades ATPasa y otras subunidades centrales de las cuatro familias mencionadas (Kumar et al., 2016).

Familia SWI/SNF

La familia SWI/SNF se compone de 12-15 subunidades, la mayoría de las cuales puede unirse directamente al DNA o a los nucleosomas evitando la interacción DNA-histona y regulando de este modo la transcripción de determinados genes diana (Kumar et al., 2016). Actúan movilizándolo los nucleosomas mediante el deslizamiento de los mismos o insertando octámeros de histona, de tal forma que los complejos SWI/SNF se unen al DNA en una posición concreta, interaccionan en la unión DNA-histona y lo separan, traslocan el DNA mediante una ATPasa y forman un bucle de DNA (Wilson and Roberts, 2011). Entre ellas se encuentran las ATPasa BRG1 (SMARCA4) o BRM (SMARCA2), que son mutuamente excluyentes; otras subunidades centrales (BAF250, BAF200), BAF47 (SMARCB1), BAF155 (SMARCC1) y BAF170 (SMARCC2); y otras subunidades accesorias (Kumar et al., 2016; Wilson and Roberts, 2011). También están presentes otros subcomponentes como las isoformas BCL7 y BCL11 y los bromodominios BRD9 y BRD7. Dependiendo de la composición de las subunidades, esta familia se puede clasificar en dos tipos de complejos: complejos BAF y complejos PBAF (BAF asociado a polibromo). Los primeros contienen BRG1 o BRM como ATPasa acompañado de BAF250 (ARID1A) o BAF250b (ARID1B) – no pueden estar presentes ARID1A y ARID1B, son excluyentes- mientras que los segundos se componen únicamente de la ATPasa BRG1 y las subunidades BAF180 (PBRM1) y BAF200 (ARID2) (Kumar et al., 2016; Wilson and Roberts, 2011).

Familia ISWI

Por lo que se refiere a la familia ISWI, presentan dos subunidades ATPasa: hSNF2H (SMARCA5), que corresponde a la subunidad catalítica y hSNF2L (SMARCA1), que actúa como factor de remodelación de nucleosomas (NURF). La subunidad catalítica

va a promover la formación de nucleosomas o la modificación de los mismos y para ejercer la remodelación requiere del dominio HAND-SANT-SLIDE presente en dicha unidad. El complejo NURF ya mencionado se compone de SNF2L, BPTF (factor de transcripción que presenta bromodominio y homeodominio de planta -PHD- y proteínas asociadas al retinoblastoma RbAP46 / RbAP48. El remodelador ACF está formado por SNF2H y Acf1 y su función es medir la longitud del DNA. Por su parte, CHRAC contiene hACF1 y p17 y p15 y van a llevar a cabo el plegamiento de las histonas. Por último, el RSF se compone de hSNF2H y Rsf1 (una chaperona de histona) y facilitan la remodelación y empaquetamiento de la cromatina (Kumar et al., 2016).

Familia Mi-2/NuRD

En cuanto a la familia Mi-2/NuRD, esta presenta CHD3 y CHD4 como subunidades catalíticas (son ATPasas que participan en el acoplamiento de la cromatina y en la reparación del DNA), HDACs, RbAp48 y RbAp46 (estos dos últimos se unen a las histonas y mantienen la estructura de la cromatina), la familia de proteínas asociadas a metástasis MTA1-3 (regulan la estructura de la cromatina uniéndose a las histonas y juega un papel fundamental en la tumorigénesis) y MBD2 y MBD3 (que presentan dominios de unión al dinucleótido CpG metilado). La integración de RbAp46/48 en el complejo NuRD es posible debido a la interacción RbAp48-MTA1, por lo que esta es fundamental (Kumar et al., 2016).

Familia INO80 y SWR1

Por último, la familia INO80 y SWR1 contienen un dominio ATPasa y proteínas Rvb1/2. INO80 mediante la hidrólisis de ATP facilita la movilización de nucleosomas mientras que SWR1 (que corresponde al dominio de una levadura y en humanos sería la p400 y SRCAP) sustituye la histona H2A por la variante H2A.Z. El complejo INO80/SWR1 de este modo también participa activamente en la regulación de la transcripción y la reparación del DNA.

Las señales extracelulares y citoplasmáticas (factores de crecimiento, citocinas, hormonas, metabolitos) van a reclutar los remodeladores de la cromatina al gen en el que se quiere llevar a cabo la transcripción para que pueda expresarse mediante la accesibilidad al DNA. De este modo, los remodeladores ejercen un papel fundamental integrando dichas señales extracelulares y citoplasmáticas en el núcleo para la regulación de la expresión de un gen diana. La disfunción de estos elementos remodeladores provoca alteraciones en los mecanismos de transcripción génica que se traducen en la expresión de genes específicos de enfermedades, lo que conlleva al crecimiento tumoral y la transformación neopásica (Kumar et al., 2016).

3. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER

Numerosas investigaciones han puesto en evidencia el papel central que tienen las alteraciones epigenéticas, junto con las alteraciones genéticas, en el desarrollo del cáncer y en la progresión tumoral (Baylin and Jones, 2011). La progresión tumoral con frecuencia está asociada a hipometilación global del DNA, hipermetilación de islas CpG de ciertas regiones reguladoras y un patrón alterado de las modificaciones de histonas

(Figura 6), en muchos casos producidos por mutaciones en reguladores epigenéticos. El conocimiento de estas alteraciones está generando nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento de diversas neoplasias. En este apartado se recogen los principales mecanismos epigenéticos alterados en cáncer, con especial foco en la metilación aberrante del DNA y mutaciones en genes que afectan a reguladores epigenéticos.

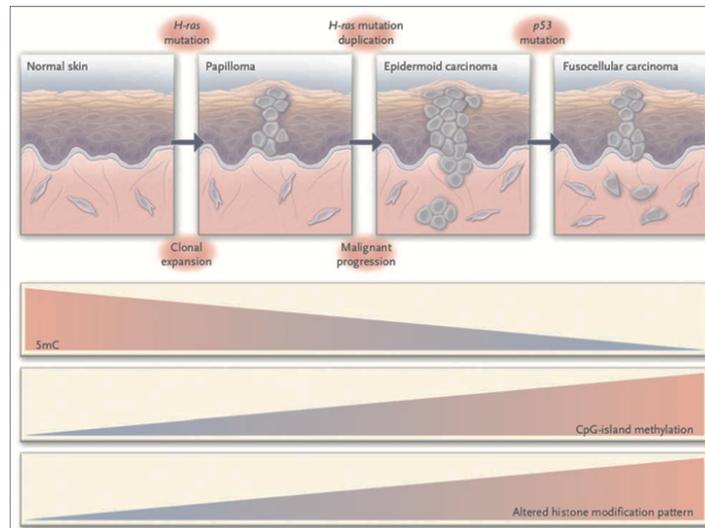


Figura 6. Fases de oncogénesis en la piel como ejemplo de progresión tumoral. En la parte superior se representa la progresión maligna desde la piel normal hasta el carcinoma fusocelular secundaria a mutaciones en diferentes genes (H-ras y p53). En la parte inferior se representan los cambios epigenéticos producidos a medida que avanza el tumor, disminuyendo la metilación general de todo el DNA (hipometilación del DNA), aumentando la metilación en islas CpG y produciéndose patrones alterados de modificaciones de histonas (Esteller, 2008).

3.1. Alteraciones en la metilación del DNA

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas, conociéndose la relación entre una metilación aberrante y enfermedades inflamatorias, lesiones precancerosas y cáncer. A pesar de que frecuentemente las células cancerígenas presentan una hipometilación global del DNA, las alteraciones epigenéticas más conocidas son las alteraciones en la metilación presentes en las islas CpG que forman parte de los promotores (Dawson and Kouzarides, 2012).

En el cáncer se produce una reactivación de genes que en condiciones normales en células somáticas se encuentran silenciados a través de la metilación de novo, mientras que a través de metilaciones aberrantes se produce la represión de la transcripción y la inestabilidad de la cromatina (Cheng et al., 2019). Así, se conoce la relación entre ciertos tumores humanos y tanto la hipometilación global del DNA (una de las primeras alteraciones identificadas en cáncer) como la hipermetilación de promotores en genes supresores de tumores que en condiciones normales se encuentran sin metilar (Cheng et al., 2019; Esteller, 2008; Lan et al., 2020). Igualmente, la metilación del DNA puede llevar a la inactivación de genes de microRNAs (Esteller, 2008).

Hipometilación del DNA

La hipometilación del DNA ocurre en secuencias repetitivas de DNA y regiones codificantes e intrones, que van a provocar alteraciones en el RNA mensajero obtenido tras la transcripción. La hipometilación general del genoma, por tanto, es tumorigénica ya que facilita la inestabilidad genómica y la activación aberrante de oncogenes y transposones (Esteller, 2008; Pfister and Ashworth, 2017). En una neoplasia la hipometilación es más pronunciada a medida que aumenta la lesión, haciéndose invasiva. Existen tres mecanismos principales que llevan a cáncer por hipometilación del DNA: i) reactivación de elementos transponibles, ii) generación de inestabilidad cromosómica y iii) pérdida del *imprinting* (Esteller, 2008). En cuanto al primer mecanismo, se ha descubierto que la hipometilación en las células cancerosas lleva a reactivar regiones repetitivas de DNA transponible como las regiones L1 (elementos nucleares largos intercalados) y Alu (secuencia recombinogenética), que además debido a su naturaleza de transposón pueden cambiar su posición en el genoma y provocar una alteración aún mayor. Por lo que se refiere a la modificación del *imprinting* genómico por hipometilación como mecanismo en la génesis del cáncer, tenemos el ejemplo del síndrome Beckwith-Wiedemann, en el que se ve alterado el *imprinting* de IGF2 (gen del factor de crecimiento similar a la insulina) y aumenta el riesgo de cáncer. Igualmente, el tumor de Wilms y el cáncer colorrectal se asocian a una pérdida del *imprinting* de IGF2 (Esteller, 2008).

El resultado de esta modificación también provoca recombinación mitótica y con ello deleciones y translocaciones que llevan a modificar la organización cromosómica. Esto se descubrió mediante experimentos en los que una alteración de las DNMTs y la consecuente hipometilación llevaban a aneuploidías (Esteller, 2008). En algunas células cancerígenas, existen determinados genes específicos de los testículos, genes que codifican los antígenos del melanoma o genes específicos de proliferación, que se expresan debido a la hipometilación de los promotores. Por ejemplo, la activación del gen PAX2, que codifica un factor de transcripción relacionado con regulación de la proliferación se produce por la hipometilación de su promotor, al igual que la expresión del gen miRNA let-7a-3, implicado en cáncer de colon y endometrio (Esteller, 2008).

Hipermetilación del DNA

En relación con la hipermetilación del DNA, se sabe que los promotores de los genes activos, en general, no se encuentran metilados en tejidos sanos y sí lo están en gran medida en tejidos cancerosos, especialmente en los promotores de genes supresores de tumores (Dawson and Kouzarides, 2012; Cheng et al., 2019). Se ha demostrado que las islas CpG de los promotores se metilan anormalmente en cáncer. Esta hipermetilación de las islas CpG va a provocar la inactivación de los genes y consecuentemente generar múltiples cánceres, afectando por ejemplo a genes supresores de tumores como retinoblastoma (RB), VHL (relacionado con la enfermedad von Hippel-Lindau, puede ser silenciado por hipermetilación en carcinomas renales), P16 (gen supresor de tumores codificado por CDKN2A que se hipermetila de novo en aproximadamente el 20% de las neoplasias primarias), hMLH1 (un homólogo de MutL Escherichia coli) y BRCA1 (gen asociado al cáncer de mama pero también se identifica en múltiples cánceres, al igual que P53) (Esteller, 2008; Cheng et al., 2019; Lan et al.,

2020; S et al., 2019). Este mecanismo afecta a genes implicados en diversos procesos relacionados con la carcinogénesis, entre los que encontramos la reparación del DNA, apoptosis, reguladores del ciclo celular, metabolismo de las células cancerosas, interacción intercelular y angiogénesis (Esteller, 2008; Cheng et al., 2019). En la tabla 4 se indican algunos genes cuyos promotores están hipermetilados y el tipo de cáncer al que están asociados.

Tabla 4. Promotores hipermetilados en genes asociados a cáncer.

Genes con hipermetilación de las islas CpG de los promotores	Cáncer asociado	
FES	Cáncer de colon, mieloma múltiple	
P2RX7		
HSD17B12		
GSTM2		
EN1	Cáncer colorrectal, cáncer próstata, carcinoma adenoide quístico glándulas salivares	
SCTR	Cáncer colorrectal, cáncer próstata	
GSTP1	Cáncer de próstata	
RUNX3	Cáncer colorrectal	
NEUROG1		
CACNA1G		
SFR2		
IGF2 DMR0		
HMLH1		
CDKN2A		
APC		Cáncer de páncreas
PENK		Neoplasias intraepiteliales pancreáticas
SPARC		
BRCA1	Cáncer de ovario	
RASSF1	Linfoma T periférico	
P73		
HMLH1		
P16		
P15		
RARβ		
DLEC1		
UCHL1	Cáncer de páncreas, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, carcinoma de células renales	

El grado de metilación está relacionado con el tamaño del tumor y el grado de diferenciación del mismo (Cheng et al., 2019). Además, la hipermetilación de las islas CpG ocurre desde etapas tempranas en la carcinogénesis (S et al., 2019). Según el patrón de metilación específico se produce un tumor determinado, denominándose al DNA hipermetilado “hipermetiloma” (Esteller, 2008).

Se han encontrado diversos genes cuyos promotores se encuentran hipermetilados en cáncer entre los que se encuentran genes supresores de tumores como P73, hMLH1, P16, P15 y RARβ. Éstos se relacionan con un tipo de linfoma natural killer/célula Tperiféricos y está asociado a la infección con virus Epstein Barr, siendo P73 el gen más asiduamente hipermetilado (Küçük et al., 2020). Por otro lado, en el cáncer de páncreas existe una sobreexpresión de DNMT que provoca una hipermetilación del gen APC, otro supresor tumoral (Cheng et al., 2019). Otros genes supresores de tumores hipermetilados, en este caso en el cáncer de vejiga, son P15, P16 y PAX6 no en el promotor, sino a nivel de todo el gen (Cheng et al., 2019).

No solo se afectan genes supresores de tumores, sino que también pueden hipermetilarse promotores de genes que codifican enzimas relacionadas con el ciclo celular, como UCHL1 (ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa1), que induce la detención del ciclo celular y la regulación de la formación de microtúbulos mediante su actividad desubiquitinante. Su promotor se encuentra hipermetilado en cáncer de mama,

carcinoma hepatocelular, cánceres de esófago y carcinoma de células renales, siendo además muy específica del cáncer de páncreas (Singh et al., 2020). También se han encontrado hipermetilados los promotores de algunos genes de reparación como BRCA1. La hipermetilación del promotor de BRCA1 constituye una alteración precoz en el cáncer de ovario y la frecuencia de dicha metilación se correlaciona no solo con el subtipo histológico, sino también con el estadiaje FIGO (que es la clasificación utilizada para el cáncer de ovario, trompa uterina y peritoneo) y los niveles de los marcadores tumorales CA125 y CEA (Esteller, 2008). La metilación de islas CpG no solo ocurre en genes codificantes, también puede ocurrir en RNAs no codificantes con potencial transformación maligna (Dawson and Kouzarides, 2012).

La hipermetilación de los promotores en las islas CpG también se asocia a modificaciones postraduccionales de las colas de histonas, existiendo patrones específicos que lo favorecen entre los que encontramos la deacetilación de las histonas H3 y H4, la pérdida de la trimetilación H3K4, la metilación de H3K9 y la trimetilación de H3K27. Además, la hipoacetilación e hipermetilación de H3 y H4 provocan el silenciamiento de genes supresores de tumores como p21WAF1 (Esteller M, 2008).

3.2. Mutaciones en reguladores epigenéticos

Las mutaciones en genes codificantes de enzimas que catalizan las modificaciones tanto en las colas de histonas como en el DNA van a llevar a procesos cancerígenos debido a la alteración de los patrones normales de modificaciones epigenéticas.

Mutaciones en reguladores de modificaciones de histonas

Como se ha descrito anteriormente, las modificaciones postraduccionales de histonas tienen una influencia importante en la regulación de la transcripción y las variaciones de las mismas puede derivar en procesos oncológicos. Conocer y comprender las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas puede ser una herramienta eficaz para predecir e intervenir en los cánceres.

En los tumores, en la histona H4 las monoacetilaciones (especialmente en la lisina 16) y trimetilaciones (especialmente en la lisina 20), se van perdiendo progresivamente a medida que avanza el tumor. Las alteraciones en las histonas comienzan temprano y se acumulan a medida que avanza el tumor (Esteller, 2008; Cheng et al., 2019), como se observa en los tumores de mama e hígado. En el cáncer de próstata el hallazgo de la dimetilación de la lisina 4 y acetilación de la lisina 12 en la histona H3 se relaciona con un alto riesgo de recidiva y se utiliza como marcador de alto riesgo de la misma. Por otra parte, en las leucemias y sarcomas predominan las translocaciones cromosómicas en las que se ven afectados genes de enzimas modificadoras de histonas (histona acetiltransferasas e histona metiltransferasas) y se producen proteínas de unión al DNA anormales, mientras que en los tumores sólidos existe una amplificación de genes para histona metiltransferasas o demetilinas (Esteller, 2008).

A continuación, se detallan los principales reguladores epigenéticos cuyas alteraciones se han asociado con diferentes tipos de cáncer.

Acetilación y deacetilación de histonas

Los patrones de acetilación de histonas se encuentran alterados en cáncer, pero además se sabe que muchos oncogenes y genes supresores de tumores (como MYC y P53) y otras proteínas también se acetilan y desacetilan dinámicamente (Dawson and Kouzarides, 2012). En la leucemia mieloide aguda no promielocítica suele existir una hipoacetilación de las histonas H3 y H4 respecto a las series celulares normales. La hipoacetilación de histonas puede conllevar reordenamientos cromosómicos que provocan que las regiones de DNA a las que se asocian normalmente las enzimas HAT no se encuentren donde deberían, provocando que dichas HAT se asocien a otros genes (Dhall et al., 2019).

Writers: Histona acetil transferasas.

Las principales histona acetil transferasas alteradas en cáncer son: **CPB**, **p300** y **MOZ**. CBP (o CREBBP) es una histona lisina acetiltransferasas (KAT) capaz de unirse a la región transformadora de la oncoproteína viral E1A, lo cual hizo evidente la importancia de las KATs en la carcinogénesis (Dawson and Kouzarides, 2012). Las mutaciones inactivantes de CBP, con pérdida de la actividad HAT, se relacionan con linfoma difuso de células B, leucemia mieloide aguda, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga (Pfister and Ashworth, 2017). Actualmente se conoce que la mayoría de las KATs están implicadas en la diferenciación neoplásica y múltiples oncoproteínas virales se vinculan con ellas (Dawson and Kouzarides, 2012).

Existen varias translocaciones cromosómicas que relacionan varias KAT con neoplasias sólidas y hematológicas, como **MLL-CBP** o **MOZ-TIF2**. MLL-CBP se relaciona con leucemia mieloide aguda y MOZ-TIF2 induce una leucemia agresiva por ganancia de función de la actividad HAT de MOZ (Dawson and Kouzarides, 2012; Pfister and Ashworth, 2017). En la leucemia mieloide aguda también se producen mutaciones en MOF, que regula la diferenciación y desarrollo celular, lo que provoca una alteración de la proliferación (Dhall et al., 2019)

Las mutaciones en p300 (o EP300), provocan una disminución de su actividad y se relacionan con linfoma difuso de células B, leucemia mieloide aguda y cáncer de cérvix. Al igual que en el caso de CBP, existen translocaciones que provocan fusiones, en el caso de P300 se ha descrito la fusión con MLL (p300-MLL), relacionada con cáncer endometrial (Pfister and Ashworth A, 2017).

Readers: Familia BET.

Respecto a la familia BET, proteínas con bromodominios que reconocen histonas acetiladas, existen translocaciones que implican a **BRD3/4** y están asociadas con el carcinoma NUT-midline agresivo (Dawson and Kouzarides, 2012). BRD4 se fusiona con NUT (BRD4-NUT) y constituyen una oncoproteína que va a detener la diferenciación y promover la proliferación del epitelio, provocando dicho carcinoma. Por otro lado, BRD4 se encuentra sobreexpresada o amplificada en cáncer de mama, de hígado y de ovario (Pfister and Ashworth, 2017).

Erasers: Histona deacetilasas.

En cuanto a las HDACs, éstas actúan sobre histonas y otras proteínas no histonas con un papel relevante en cáncer. Las mutaciones somáticas de las HDACs no son muy características en el cáncer, pero los niveles de HDAC sí que se encuentran frecuentemente alterados en múltiples cánceres, asociados en general a un peor pronóstico (Dawson and Kouzarides, 2012). **HDAC1** se encuentra sobreexpresada en linfoma de Hodgkin y tumores sólidos como cáncer gástrico, de mama, pancreático, hepatocelular, pulmonar, renal y de próstata. Por su parte, **HDAC2** se ha encontrado mutada e inactiva en cáncer colorrectal y sobreexpresada en LH y cáncer renal. La sobreexpresión de **HDAC8** se relaciona con neuroblastoma infantil y de **HDAC9** con meduloblastoma, leucemia linfocítica aguda infantil y cáncer de cérvix. Mutaciones de **HDAC4**, así como su sobreexpresión, se relacionan con el cáncer de mama (Pfister and Ashworth, 2017).

Finalmente, existen proteínas de fusión como **PML-RARa**, **PLZF-RARa** y **AML1-ETO** producidas por translocaciones cromosómicas en leucemias agudas, que atraen HDACs a sus genes diana, lo que provoca un silenciamiento transcripcional y favorecen el desarrollo de estas leucemias.

Metilación y demetilación de histonas

Se han descrito mutaciones recurrentes que afectan a reguladores epigenéticos implicados en la metilación de las histonas. Entre ellos, destacan las histonas metil transferasas de la familia MLL, la metil transferasa EZH2 (KMT6) y la familia NSD (KMT3B). Por otra parte, se han descrito mutaciones en genes de histona demetiladas, destacando LSD1.

Writers: Histona metil transferasas.

La **familia MLL** se ha encontrado alterada en diversos cánceres. De todas las HMT, la metiltransferasa MLL (KMT2A) es la más frecuentemente alterada, asociada al desarrollo leucemias agudas mieloides y linfoides con muy mal pronóstico. Cuando existe una mutación en MLL (que regula genes HOX) existe una metilación incrementada en H3K79, asociada a activación transcripcional. MLL a través de la trimetilación de H3K4 en los promotores de genes activos entre otras, ejerce un papel de activación de la transcripción. El gen MLL presenta numerosos reordenamientos que hacen que se fusione a determinadas regiones, constituyendo las translocaciones más comunes MLL-AF4 t(4;11), MLL-AF9 t(9,11), MLL-ENL t(11; 19), MLL-AF10 t(10; 11) y MLL-ELL t(11; 19). Estas fusiones son el motor para desarrollar leucemias y en ellas se pierde el dominio SET de MLL, pero se mantienen los niveles correspondientes de H3K4 metilados, lo que nos hace pensar que existen otras metiltransferasas que lo mantienen. Se cree que el mantenimiento de los niveles de metilación en H3K4 influye en el potencial leucémico (Brien et al., 2016).

El linfoma folicular y otros tumores malignos presentan alrededor del 90% de los casos mutaciones de la histona metiltransferasa **MLL2** (Dawson and Kouzarides, 2012). Además, mutaciones en MLL2, **MLL3** y **MLL4** se relacionan con una disminución de la metilación en H3K4 y son responsables de linfoma no Hodgkin. Mutaciones

heterocigóticas de estas HMT se han encontrado en cáncer de vejiga, pulmón, endometrio y hepatocelular (Pfister and Ashworth, 2017).

DOT1L es una histona metil transferasa que no posee dominio SET que produce la metilación de la lisina en las colas de las histonas (H3K79) y en el núcleo de las histonas. Como se ha explicado previamente, el gen MLL se asocia a translocaciones cromosómicas, perdiéndose con éstas el dominio SET y generando proteínas de fusión. Estas proteínas de fusión movilizan y atraen a DOT1L, por lo que esta metiltransferasa participa en el mantenimiento de la leucemia linfocítica aguda y se asocia por tanto prioritariamente a neoplasias hematológicas. Sin embargo, también se ha asociado a cáncer colorrectal, de mama y de ovario (Cheng et al., 2019).

La metiltransferasa **EZH2** (subunidad catalítica de complejos PRC2) también se encuentra mutada en neoplasias mielodisplásicas y mieloproliferativas, y es esencial para la progresión rápida de la leucemia mieloide aguda (Dhall et al., 2019). Las mutaciones de EZH2 con ganancia de función se asocian a neoplasias linfoides como el linfoma folicular y el linfoma difuso de células B, donde se encuentran mutaciones heterocigotas que provocan la sustitución de la tirosina 641 en el dominio SET (Brien et al., 2016; Dawson and Kouzarides, 2012; Pfister and Ashworth, 2017). Por tanto, las mutaciones de EZH2 ocurren en la región activa catalítica, que impulsa el dominio trithorax (SET). Las mutaciones en el dominio SET relacionadas con linfomas provocan un aumento del paso de la dimetilación en H3K27 a trimetilación que facilita la represión de los genes que regulan el inicio del ciclo celular y la diferenciación apropiada de las células B, conduciendo a una diferenciación aberrante y una mayor proliferación (Brien et al., 2016; Dawson and Kouzarides, 2012). Esta metiltransferasa se encuentra sobreexpresada en tumores sólidos como el cáncer de mama, melanoma, próstata, endometrio, vejiga, glioblastoma, hígado, pulmón y ovario (Pfister and Ashworth, 2017).

NSD2, gen que codifica para una HMT, interviene en la translocación cromosómica t(4;14) presente en varios casos de mieloma múltiple. Además, presenta mutaciones por ganancia de función en muchos tumores malignos linfoides, especialmente en leucemias linfoblásticas agudas pediátricas portadoras de ETV6-RUNX1. Las mutaciones ocurren en el dominio SET de NSD2, que lleva a un aumento de los niveles de dimetilación en H3K36 y a una pérdida global de la metilación H3K27 (que reprimía la transcripción). Sin embargo, aunque provoque una disminución de la metilación H3K27 global, ésta aumenta en determinados promotores relacionados con genes de diferenciación de células B que se encuentran normalmente reprimidos (Brien et al., 2016).

Readers de histonas metiladas

Por lo que se refiere a los *readers* que reconocen histonas metiladas, éstos también se relacionan con el cáncer, como la proteína con cromodominio **HP1**, que presenta una expresión anómala en múltiples cánceres. No se han encontrado mutaciones somáticas en el cromodominio HP1, aunque sí en la familia **ING**, implicadas en melanoma y cáncer de mama (Dawson and Kouzarides, 2012). Cuando existen mutaciones inactivadoras de ING1 se produce una alteración de la reparación del DNA,

asociándose a melanoma, carcinoma escamoso de esófago y leucemia linfocítica aguda (Pfister and Ashworth, 2017).

Erasers: Histona demetiladas

LSD1 (KDM1A) está sobreexpresada en varios cánceres como el neuroblastoma, el cáncer de próstata, de vejiga, colorrectal, de pulmón y algunos hematopoyéticos. La mono y dimetilación de H3K4 está regulada por LSD1, que se encuentra mutado en leucemia mieloide aguda e interviene en su malignidad (Brien et al., 2016). La alteración de LSD1 produce una disminución global de H3K4me2.

Se han observado mutaciones en las demetiladas **KDM5A (JARID1A)**, **KDM5C (JARID1C)** y **KDM6A (UTX)**. Las mutaciones inactivantes en UTX se encuentran en gran proporción de cánceres sólidos y hematológicos (Dawson and Kouzarides, 2012).

Respecto a las demetiladas de la familia Jumonji, se han encontrado mutaciones en genes que codifican las enzimas metabólicas isocitrato deshidrogenasa-1 (**IDH1**) e **IDH2**, que dependen de NADP y catalizan la descarboxilación oxidativa de isocitrato, transformándolo en α -cetoglutarato y produciendo además NADPH. El NADPH se reduce debido a la actividad enzimática derivada de las mutaciones generando 2-hidroxiglutarato (2-HG). Las células malignas pueden ir acumulando 2-HG que va generando la inhibición de las demetiladas Jumonji, por lo que aumenta la proporción de histonas metiladas. En pacientes con glioblastoma multiforme se encuentran en una amplia proporción mutaciones en IDH1 e IDH2, y también están presentes en neoplasias mieloides, especialmente leucemia mieloide aguda (Dawson and Kouzarides, 2012).

Metilación del DNA

La reciente secuenciación de genomas del cáncer ha permitido la identificación de mutaciones tanto en los genes de las DNMTs, como de las proteínas *reader* MBD y de las enzimas TET que producen alteraciones en la metilación del DNA y favorecen el desarrollo tumoral.

Writers: DNMTs

En la leucemia mieloide aguda existe una hipermetilación del DNA debido a una sobreexpresión de la **DNMT1**, que lleva a un silenciamiento génico, En algunos casos de cáncer colorrectal esta DNA-metil transferasa presenta mutaciones que la inactivan (Pfister and Ashworth, 2017).

Las mutaciones en **DNMT3A**, se encuentran en aproximadamente un 25% de pacientes con leucemia mieloide aguda. Son muy recurrentes en pacientes con LMA de nueva aparición con un perfil de riesgo intermedio y se asocian con mal pronóstico. (Ley et al., 2010), aunque también se encuentra en carcinoma endometrial, colorrectal, linfoma T y cáncer de pulmón (Dawson and Kouzarides, 2012; Scourzic et al., 2015; Pfister and Ashworth, 2017). Existe una sobreexpresión de la misma en LMA, provocando que exista un aumento de la metilación y silenciamiento génico. En el resto de tumores se produce hipometilación puesto que la mutación producida en la DNMT3A es inactivante (Pfister and Ashworth, 2017).

Respecto a la **DNMT3B**, ésta presenta sobreexpresión en AML y en cáncer endometrial produciendo hipermetilación local del DNA y silenciamiento génico (Pfister and Ashworth, 2017).

Readers: MBDs

Las mutaciones de las **MBD** se asocian también a neoplasias sólidas como cáncer de pulmón o de mama y a neoplasias hematológicas (principalmente LMA) (Scourzic et al., 2015).

Erasers: TET

Las mutaciones en las TET se asocian a patologías hematológicas variadas como la leucemia mielomonocítica crónica, que presenta una alta tasa de mutación de la **TET2**. También se conoce que esta enzima está relacionada con síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas y linfoides y un peor pronóstico en la leucemia mieloide aguda (Dawson and Kouzarides, 2012; Scourzic et al., 2015). En tumores malignos secundarios a mutaciones de TET2 encontramos una elevación de los niveles de 5-metilcitosina a expensas de un descenso de los niveles de 5-hidroximetilcitosina. Normalmente estas mutaciones afectan al dominio catalítico, aunque pueden afectar a otra región afectando también su función. Además, cabe remarcar que en las células hematológicas el nivel de expresión de TET2 es mucho mayor que de **TET1** o **3**. Se han descrito mutaciones de TET3 pero al tener menor expresión, parecen ser menos relevantes (Scourzic L et al., 2015).

Remodeladores de la cromatina

Diversos componentes de la familia SWI/SNF de remodeladores de la cromatina se encuentran alterados en un número importante de neoplasias hematológicas y sólidas. Esto se debe a que los complejos SWI/SNF regulan la progresión del ciclo celular, la motilidad y la señalización intracelular, por lo que se altera la diferenciación y la proliferación celular (Dawson and Kouzarides T, 2012). Estas mutaciones se encuentran en aproximadamente el 20% de todos los cánceres humanos (Helming et al., 2014). En la figura 7 se observan los componentes de los complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes.

SMARCB1 (SNF5/INI1/BAF47) fue el primer remodelador de la cromatina identificado como supresor de tumores y el primero en relacionarse con el tumor rabdoide (un tipo de tumor inusual y agresivo que afecta a niños) mediante la inactivación bialélica (Helming KC et al., 2014; Pfister SX y Ashworth A, 2017).

En la familia ARID podemos encontrar mutaciones en **ARID1A** que se relacionan con una amplia variedad de cánceres como el carcinoma de ovario de células claras, endometroide, cáncer de vejiga, hepatocelular, mama, colorrectal, melanoma y páncreas entre otros. Las mutaciones en **ARID2** están asociadas con melanoma y carcinoma hepatocelular. En general el efecto de estas mutaciones es el silenciamiento transcripcional aberrante. **SMARCA4** (BRG1) también está mutada en una gran cantidad

de cánceres como pulmón, meduloblastoma, páncreas, y carcinoma de ovario de células pequeñas y PRBM1 está alterado en el carcinoma renal (Helming et al., 2014).

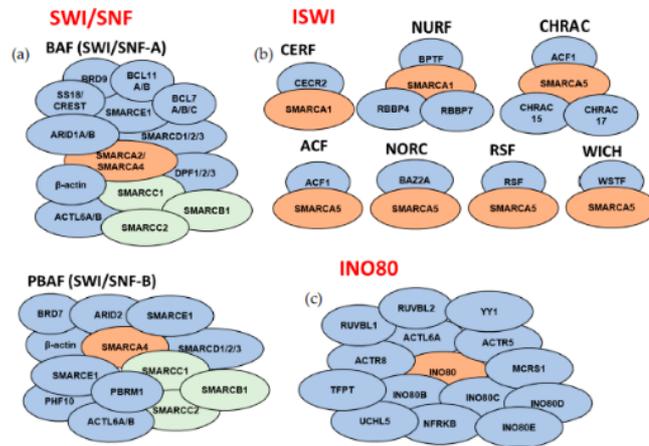


Figura 7. Representación de los componentes de los complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes. a) se observan los complejos SWI/SNF, coloreados en naranja las subunidades ATPasa catalíticas, en verde las subunidades que forman el núcleo y en azul las accesorias. b) complejos ISWI, con las subunidades catalíticas en naranja y las accesorias en azul. c) se representa el complejo INO80, con la misma distribución de colores que en los casos anteriores (Hasan and Ahuja, 2019).

4. Terapias epigenéticas en cáncer

Conocer y estudiar los componentes de la regulación epigenética, así como los patrones de alteración en tumores ha resultado clave para buscar y desarrollar terapias epigenéticas en cáncer (Ahuja et al., 2016). Las modificaciones epigenéticas, a diferencia de las mutaciones en la secuencia de DNA, constituyen un mecanismo reversible que presenta diferentes fases en los que intervienen varios componentes (*writers, readers, erasers*) que se pueden utilizar como dianas terapéuticas (Foulks et al., 2012). El hecho de que los cambios epigenéticos sean reversibles se denomina plasticidad epigenética e incluye tanto las modificaciones en las histonas como en el DNA. Las terapias epigenéticas han resultado ser más efectivas cuando se llevan a cabo en combinación con otras terapias. Así, los fármacos epigenéticos sensibilizan las células tumorales y se combinan con otra terapia, evitando las resistencias adquiridas con la aplicación de únicamente una terapia (Morel et al., 2020).

Las alteraciones epigenéticas, como ya hemos visto, están implicadas en el desarrollo tumoral tanto en neoplasias hematológicas como sólidas (Morel et al., 2020). Una vez conocidas las modificaciones epigenéticas en los diferentes cánceres, las proteínas que participan en dicha regulación epigenética se identificaron como dianas terapéuticas prometedoras de tal forma que comenzaron a desarrollarse inhibidores (Allis and Jenuwein, 2016). Dentro de los primeros inhibidores, que abrieron camino al resto, se encuentran los inhibidores de DNMT, que bloquean la metilación del DNA, acompañados de inhibidores de HDAC como TSA (tricostatina A) y vorinostat. En 2006 la FDA aprobó los primeros fármacos como terapias epigenéticas: decitabina y vorinostat. Los resultados clínicos de estas terapias abrieron la puerta a buscar otras dianas terapéuticas entre las enzimas que llevan a cabo las modificaciones epigenéticas además de buscar combinaciones eficaces (Allis and Jenuwein, 2016; Pfister and Ashworth, 2017; Cheng et al., 2019; Ahuja et al., 2016). Las terapias epigenéticas se están utilizando especialmente en los tumores hematológicos puesto que en los tumores sólidos existe una diferenciación celular muy específica que implica una reducción en la capacidad de reprogramación epigenética, por lo que resulta más complicado modificar las alteraciones epigenéticas presentes. Además, se necesitan más ensayos clínicos en tumores sólidos, lo cual también ha podido retrasar el avance de estas terapias en estas neoplasias (Morel et al., 2020; Ahuja et al., 2016).

En la figura 8 se resumen las principales dianas epigenéticas que se irán describiendo en los siguientes apartados.

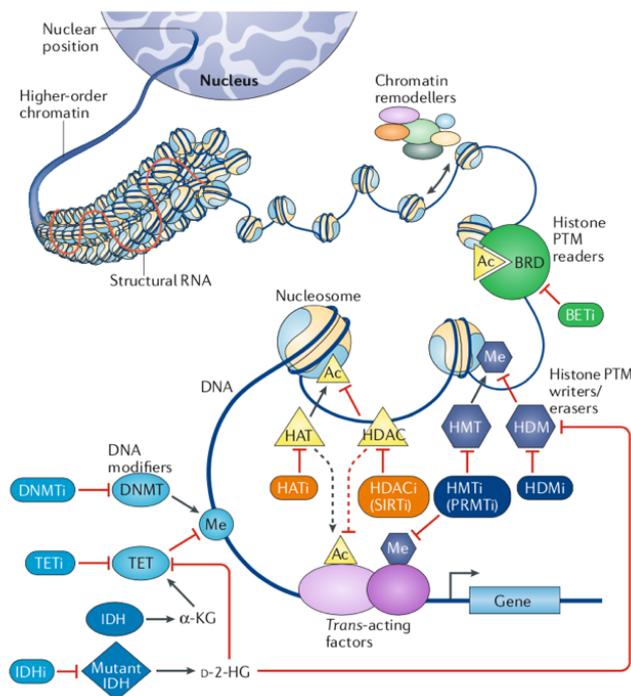


Figura 8. Representación de las dianas epigenéticas frente a las que se están dirigiendo distintas terapias. Se observan los remodeladores de la cromatina interaccionando con las histonas y alterando los contactos entre éstas y el DNA. Representado en verde, un lector con bromodominio (BRD) unido al grupo acetilo en una cola de histona hacia el que se dirige un inhibidor BET. Como hexágonos azules aparecen las histona metiltransferasas e histona demetilinas, añadiendo o retirando el grupo metilo de la cola de histonas, respectivamente. En azul más oscuro se representan sus respectivos inhibidores (HMTi, HDMi). Como triángulos amarillos aparecen las histona acetiltransferasas e histona deacetilasas ejerciendo la adición o retirada del grupo acetilo de la cola de histonas, respectivamente, y a las que se han dirigido sus inhibidores (HATi, HDACi, en naranja). Sobre la secuencia de DNA vemos la actividad de las DNA metiltransferasas (DNMT) y DNA demetilinas (TET), representadas en azul claro, y hacia las que también se dirigen inhibidores. Por último, también en azul, observamos la proteína IDH, que a través de la producción de α -KG, favorece la desmetilación por parte de las TET, mientras que mutaciones de la misma producen oncometabolitos 2-hidroxiglutarato, que inhiben la desmetilación por parte de α -KG (Morel et al., 2020).

4.1. Dianas terapéuticas epigenéticas

4.1.1. Inhibidores de DNA metil transferasas (DNMTi)

Dado que la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de determinados genes, como los genes supresores de tumores, se relaciona con diversos cánceres, se han utilizado inhibidores de las DNMTs como terapia anticancerígena. Estos inhibidores impiden la metilación del DNA, disminuyendo la cantidad de promotores hipermetilados y provocando la expresión de genes que se encontraban silenciados por esta alteración (Figura 9) (Pfister and Ashworth, 2017).

Se conocen dos clases de inhibidores de DNMTs: análogos de nucleósidos y análogos no nucleósidos. Los primeros son formas modificadas de la citidina que se incorporan al DNA en la replicación provocando además la retención de las DNMT en el DNA y su

posterior degradación mediada por proteasoma. Los segundos se unen al dominio catalítico de las DNMTs compitiendo con el cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) e inhibiendo la actividad DNMT (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019; Cheng et al., 2019; Foulks et al., 2012; Ahuja et al., 2016).

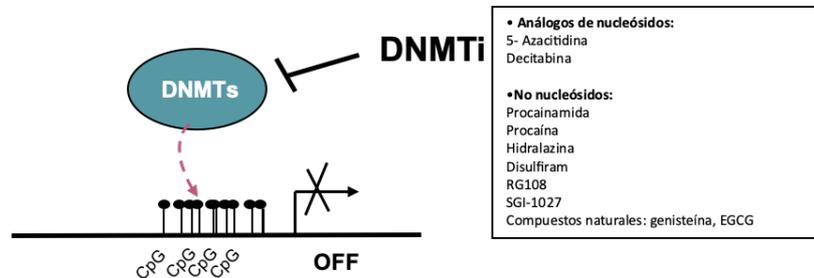


Figura 9. Se representa la hipermetilación de islas CpG por parte de DNA metiltransferasas (azul) cuyo resultado final es la inactivación de la transcripción génica. En el recuadro se recogen los principales inhibidores de las DNMTs.

A lo que más se presta atención a la hora de realizar estudios sobre el bloqueo de DNMT es a la especificidad y toxicidad, puesto que los inhibidores de DNMTs causan hipometilación de todo el DNA y no solo reactivan los genes de interés, sino que pueden reactivar cualquier gen aleatoriamente, provocando efectos perjudiciales (Pfister and Ashworth, 2017; Cheng et al., 2019).

Así, los **análogos de nucleósidos** son algo tóxicos y no siempre presentan las propiedades farmacocinéticas esperadas (Mohammad et al., 2019). Además, pueden tener también efectos citotóxicos debido a que presentan un elevado riesgo mutagénico y provocan inestabilidad genómica (Pfister and Ashworth, 2017; Cheng et al., 2019). La 5-azacitidina (azacitidina) y la 5-aza-2'-deoxicidina (decitabina) son los dos análogos de nucleósidos más estudiados hasta ahora y se utilizan en el tratamiento del síndrome mielodisplásico y la leucemia mielomonocítica crónica, habiendo sido aprobado su uso, como se mencionó previamente, por la FDA. Debido a que se insertan en el DNA recién sintetizado, afectan principalmente a las células cancerosas que se encuentran en división activa (Cheng et al., 2019). Fueron los dos primeros en utilizarse y actualmente se encuentran en múltiples ensayos clínicos como tratamiento potencial de otras leucemias y tumores sólidos (Pfister and Ashworth, 2017).

La 5-azacitidina constituye un análogo de la citidina que presenta importantes efectos secundarios (mayores cuanto más elevadas sean las dosis) como anomalías fetales e infertilidad masculina, mientras que la 6-azacitidina no presenta dichos efectos secundarios. Además, la 5- azacitidina presenta un análogo, la dihidro-5-azacitidina, que presenta menor toxicidad y puede administrarse en infusión intravenosa. Sin embargo, la azacitidina se ha utilizado en líneas no invasivas de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75-1) provocando que las células adoptaran potencial invasivo secundaria a la hipometilación de varios genes que promueven metástasis. Por su lado, la decitabina y 5-fluoro-2'-desoxicidina son análogos de desoxirribonucleósidos, por lo que se unen al DNA (requieren fosforilación). La decitabina frena la metilación del DNA, teniendo

diferentes propiedades según la dosis: a dosis bajas, puede reactivar genes inactivos, mientras que a dosis altas adopta propiedades citotóxicas. A todas las dosis se produce mielosupresión como principal efecto adverso (Cheng et al., 2019).

Además de la toxicidad, otro argumento en contra de los análogos nucleósidos clásicos es que resultan inestables en soluciones acuosas y que son susceptibles de desaminación por la citamina desaminasa (Foulks et al., 2012). Por otro lado, el síndrome mielodisplásico puede desarrollar resistencia a los análogos de nucleósidos clásicos (azacitidina y la decitabina) debido a que las células tumorales pueden detener la entrada, fosforilación e integración de los mismos al DNA, por lo que se comenzaron a desarrollar los análogos no nucleósidos, que no necesitan incorporarse al DNA, evitando este obstáculo (Foulks et al., 2012).

Entre los **análogos no nucleósidos** se encuentran procainamida, procaína, hidralazina, disulfiram, RG108, SGI-1027 y compuestos naturales que incluyen genisteína y galato de epigallocatequina (EGCG) (Pfister and Ashworth, 2017). Los análogos no nucleósidos presentan menor toxicidad puesto que no se integran en el DNA, pero no son muy eficaces ni específicos, además de que no se han llevado tantos ensayos clínicos como con los análogos nucleósidos (Pfister and Ashworth, 2017). Sin embargo, han demostrado provocar una desmetilación del DNA más importante que con la decitabina y sin que la toxicidad suponga un problema, presentando de este modo una acción antitumoral importante (Mohammad et al., 2019). RG108 inhibe selectivamente a la DNMT1 y disminuye de este modo la metilación. Además, silencia el gen la metiltransferasa *in vitro* y en las células detiene la metilación del promotor del gen supresor de tumores, pero no de los satélites o centrómeros, todo ello sin efectos citotóxicos incluso a dosis altas (Cheng et al., 2019; Foulks et al., 2012). Psammaplin, por su lado, pertenece a una familia que procede de la esponja *Pseudoceratina Purpurea* e inhibe conjuntamente las DNMTs y las HDACs con una toxicidad reducida. EGCG (un compuesto del té verde) retira grupos metilo de forma reversible del DNA, reactivando algunos genes que permanecían inactivos en cáncer de colon, esófago y próstata como hMLH1, P16 y RA. La hidralacina y la procainamida, que se utilizan en determinadas patologías autoinmunes, también actúan como represores de la metilación del DNA y reactivan genes supresores de tumores en cáncer de mama (Cheng et al., 2019).

Entre los análogos de segunda generación (tanto nucleósidos como no nucleósidos), que presentan una mejorada farmacocinética y farmacodinámica, se encuentran SGI-110, zebularina y CP-4200 (Mohammad et al., 2019). SGI-1027 o guadecitabina parece que presenta buenos resultados en la leucemia mielocítica aguda y está en estudio como posible tratamiento de neoplasias sólidas y hematopoyéticas, no solo como terapia única sino también como terapia combinada con otros fármacos (Mohammad et al., 2019). SGI-110 actúa como profármaco de decitabina, pero posee una vida media más prolongada y es menos susceptible a la degradación. Se encuentra en ensayos clínicos de fase III como tratamiento del síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda (Ahuja et al., 2016).

Los inhibidores de DNMTs se utilizan especialmente en neoplasias hematológicas, pero no presentan eficacia ni respuesta clínica suficiente como agentes únicos en tumores sólidos debido a la hipoxia y a la dificultosa penetración en estos tumores (Pfister and Ashworth, 2017, Mohammad HP et al., 2019). Sin embargo, estos agentes se pueden utilizar a dosis bajas para permitir la sensibilización y que la posterior radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia sean más efectivas, como se detallará más adelante (Pfister and Ashworth, 2017).

4.1.2. Inhibidores de HDAC (HDACi)

El mecanismo de acción exacto de los inhibidores de HDAC no se ha esclarecido totalmente pero se supone que, al provocar un aumento de la acetilación de histonas, reactivan genes supresores de tumores que permanecían silenciados (Figura 10). Los HDAC no solo actúan retirando el grupo acetilo de las histonas, pueden actuar también sobre otras proteínas nucleares como factores implicados en la transcripción (por ejemplo, p53 y NF-κB), regulando su acción y estabilidad. Así, estos inhibidores van a inducir la apoptosis de las células tumorales y efectos antimetastásicos bloqueando el ciclo celular, inhibiendo la angiogénesis, produciendo daño directo en el DNA y generando radicales libres de oxígeno (Ahuja et al., 2016; Pfister and Ashworth, 2017; Pant et al., 2020).

Están aprobados por la FDA tres inhibidores de HDAC que se emplean en el ámbito clínico en todo el mundo desde 2009: vorinostat (o SAHA), belostat y romidepsina. Vorinostat se utiliza en el linfoma cutáneo de células T, belostat en el linfoma periférico de células T y romidepsina en ambos. También se han utilizado eficazmente en el cáncer hepatobiliar, incluyendo el colangiocarcinoma (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019; Pant et al., 2020; McClure et al., 2018).

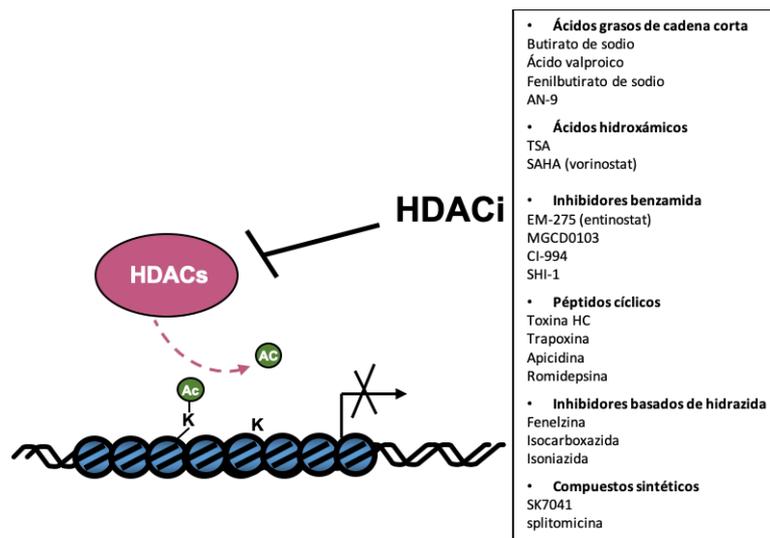


Figura 10. Se representa la acetilación de lisinas de la cola de histonas y la actividad de HDACs, que retiran dicho grupo acetilo, inhibiendo la transcripción. También se representa la inhibición de HDAC mediante HDACi y se recogen los principales inhibidores.

Existen varios grupos de inhibidores de HDAC (ácidos grasos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, benzamidas, péptidos cíclicos y moléculas híbridas) y compuestos sintéticos nuevos que también presentan esta acción (McClure et al., 2018; Cheng et al., 2019) (figura 10).

Dentro del primer grupo de **ácidos grasos de cadena corta** se encuentran el butirato de sodio, ácido valproico (VPA), fenilbutirato de sodio y AN-9 (pivaloiloximetil butirato) (Cheng et al., 2019). Esta familia es poco utilizada y requiere altas dosis para ser eficaz. El ácido valproico es un antiepiléptico cuyo efecto no es inmediato, por lo que se cree que interviene en la regulación de la transcripción. Sin embargo, no es muy útil como terapia antitumoral puesto que no presenta una actividad suficiente en la inhibición de las HDAC (McClure et al., 2018).

Respecto a la familia de los **ácidos hidroxámicos**, ésta se compone de más de diez componentes. Por ejemplo, TSA y SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida, también denominado vorinostat) actúan mediante un mecanismo de inhibición no competitiva de los HDAC al presentar una estructura similar a las HDAC de clase I y clase II. Además, son quelantes del zinc, que está presente en la región catalítica de estas enzimas. Esta familia fue la primera en desarrollarse. El vorinostat fue el primero en comercializarse, y aunque en primera instancia se creía que actuaba sobre todos los HDAC, se comprobó que solo ejercía su acción en las HDAC 1, 2, 3 y 6 (McClure et al., 2018).

Otra familia de estos compuestos es la de los **inhibidores de la benzamida**, también utilizados como terapias anticancerígenas mediante la unión al zinc de las regiones catalíticas de HDAC, de forma probablemente reversible (Cheng et al., 2019; McClure et al., 2018). En este grupo se encuentran EM-275 (entinostat), MGCD0103 y CI-994. Otro compuesto de este grupo es SHI-1, que bloquea selectivamente la acción de HDAC1/HDAC2, siendo mucho más específico que los otros inhibidores (Cheng et al., 2019). La familia de inhibidores de la benzamida poseen menor efecto que los ácidos hidroxámicos o los péptidos cíclicos, como se demostró con entinostat y vorinostat, probándose que el primero presenta un índice terapéutico menor a pesar de que paradójicamente sea mucho más selectivo hacia HDAC I. Probablemente esto se deba a que presenta débiles propiedades farmacocinéticas, así como una elevada toxicidad y una unión menos específica a las HDAC pese a ser más selectivo (Cheng et al., 2019; McClure et al., 2018). Esta familia fue la primera que consiguió actuar específicamente en HDAC de clase I. Entinostat fue el primero del grupo que llegó a probarse en ensayos clínicos (McClure et al., 2018).

Por su lado, los **péptidos cíclicos** a su vez se subdividen en dos clases: los tetrapéptidos cíclicos, que presentan 10-epoxy-decanoyl (AOE) (como la toxina HC y la trapoxiona), y los péptidos cíclicos sin AOE, entre los que se encuentran la apicidina y la romidepsina. Estos también se unen a la región catalítica a través del zinc, pero de forma irreversible (Cheng et al., 2019). Romidepsina constituye un derivado natural de una bacteria (*Chromobacterium violaceum*) (McClure et al., 2018).

Entre los **compuestos polares híbridos** encontramos el HMBA (hexametilén bisacetamida), que constituye uno de los inhibidores de HDACs de primera generación (Cheng et al., 2019).

Los inhibidores de HDAC basados en hidrazida actúan selectivamente HDAC 1, 2 y 3. De este grupo existen varios fármacos aprobados por la FDA, como los inhibidores de la monoaminoxidasa de primera generación (fenelzina, isocarboxazida e isoniazida). En estos inhibidores se ha estudiado la toxicidad y los perfiles de seguridad, pero aún no se sabe exactamente el mecanismo de acción, considerándose un mecanismo mixto de inhibición. Por otro lado, presentan una propiedad importante y es que a través de las pruebas de Ames se demostró que no son agentes mutagénicos como ocurre con muchos inhibidores de HDAC de la familia de los ácidos hidroxámicos, lo cual es importante puesto que éstos últimos pueden desencadenar leucemia secundaria por el tratamiento (McClure et al., 2018).

Por último, SK7041 es un **compuesto sintético** que inhibe de forma específica a las HDAC de clase I, mientras que splitomicina, otro miembro de los productos químicos sintéticos, inhibe selectivamente a la familia sir2 (Cheng et al., 2019).

Dentro de los inhibidores de HDAC de segunda generación, que presentan un efecto mayor en el bloqueo de la desacetilación y poseen mayor acción antitumoral que los de primera generación, se incluyen oxamflatina, vorinostat, ácido bishidroxámico subérico (SBHA), y la bishidroxamida del ácido m-carboxicinámico (CBHA), algunos mencionados previamente en cada uno de los grupos. Actualmente están en estudio como terapias diversas en múltiples ensayos clínicos (Cheng et al., 2019). Además, los inhibidores de HDAC también pueden clasificarse según su espectro de actuación. Por un lado, están aquellos que actúan sobre múltiples tipos de HDAC (denominados inhibidores pan) como por ejemplo, el vorinostat. Por otro lado, se encuentran los que actúan sobre clases específicas de HDAC, como la romidepsina (Ahuja et al., 2016).

El uso de HDAC modula un reducido y limitado conjunto de genes (aproximadamente el 1-2%), pero provoca un descenso importante y temprano del gen c-MYC, lo que revela que existen determinados genes concretos que son especialmente susceptibles a las alteraciones en la acetilación de histonas (Cheng et al., 2019). Actualmente existen ensayos clínicos para el tratamiento de neoplasias sólidas y hematológicas mediante estos agentes, pero como no se conoce exactamente el mecanismo de acción y además actúan sobre proteínas histonas y no histonas, éstos ensayos se ven dificultados (Pfister and Ashworth, 2017). Cabe destacar que se sabe que la actividad que llevan a cabo estos inhibidores depende fundamentalmente de la dosis, llevando a cabo una función epigenética o citotóxica en función de la misma (Ahuja et al., 2016).

Del mismo modo que ocurría con los inhibidores de DNMTs, la actividad terapéutica en los tumores sólidos se ve restringida cuando se utilizan como terapia única y han sido utilizados de forma restringida a tumores hematológicos. Esto se explica porque existe una limitación a la hora de aumentar la dosis por los efectos secundarios que produce y la toxicidad generada, probablemente derivado de su acción en las distintas isoformas de HDAC (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). Por eso, se han desarrollado nuevos inhibidores de las HDAC de segunda generación, que permiten ser más específicos con las isoformas a las que se dirigen (Mohammad et al., 2019).

4.1.3. Inhibidores de histona metil transferasas (HMTi)

A diferencia de lo que ocurre con las terapias dirigidas a la deacetilación de histonas o la metilación del DNA, los inhibidores de histona metil transferasas constituyen agentes mucho más específicos y mucho menos limitados por la toxicidad. Esto es debido a que existen más de 60 HMTs y cada familia produce la metilación en la cola de histonas de tan solo 1 o 2 residuos de lisina, asociándose además cada una a un nivel de metilación concreto (mono-, di- o trimetilación). Por ello, las terapias dirigidas hacia HMTs concretas resultan mucho más precisas. El problema en este caso, ha sido encontrar los niveles de selectividad y bioactividad precisos (Pfister and Ashworth, 2017).

Inhibidores de EZH2

Como se explicó en apartados anteriores, tanto la sobreexpresión de EZH2 como las mutaciones de ganancia o pérdida de función EZH2 se relacionan con diferentes neoplasias sólidas y hematológicas. Cabe recordar que EZH2 constituye la subunidad catalítica del complejo represivo polycomb PRC2 y provoca la trimetilación de H3K27. De este modo, la inhibición de EZH2 va a tener como consecuencia una disminución de los niveles de trimetilación de H3K27, provocando la activación de genes inactivos y bloqueando el desarrollo de aquellas células tumorales que presentan sobreexpresión o mutaciones de ganancia de función EZH2 (Pfister and Ashworth, 2017) (Figura 11). Debido a que los ensayos preclínicos resultaron muy prometedores respecto a la eficacia clínica, actualmente se están desarrollando diversos ensayos clínicos con estos inhibidores (Kim and Roberts, 2016).

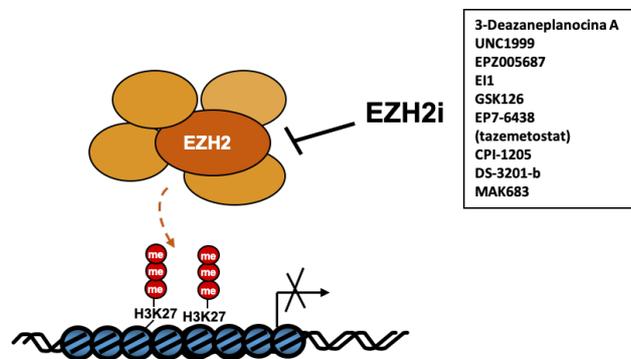


Figura 11. Se representa la trimetilación de H3K27 por EZH2, que forma parte del complejo polycomb, provocando la inhibición de la transcripción. También se representa la inhibición de EZH2 mediante EZH2i y se recogen los principales inhibidores.

El primer inhibidor de EZH2 que se utilizó fue **3-deazaneplanocina A (DZNep)**, que impide el ciclo de la metionina. Por eso, este efecto no es selectivo de EZH2 a pesar de que intervenga en la desmetilación de H3K27 e inhiba al complejo PRC2. La terapia con este fármaco tiene una respuesta antitumoral favorable en varios cánceres en ensayos preclínicos, sin embargo, en modelos animales se puso en evidencia que su vida media es muy corta, al no tener un efecto único sobre EZH2 inhibe la metilación de histonas de forma inespecífica y presenta toxicidad (Kim and Roberts, 2016).

UNC1999 inhibe EZH1 y EZH2, provocando una regulación de algunos genes supresores de tumores como p16 y p19, desencadenando apoptosis en las células de la leucemia linfocítica (Pfister and Ashworth, 2017). Fue el primero que pudo administrarse por vía oral, con alta especificidad hacia EZH2 a pesar de inhibir las dos enzimas (Kim and Roberts, 2016).

Algunos de los fármacos que se mencionarán a continuación actúan a través de una inhibición competitiva con S-adenosilmetionina (SAM), mientras que otros actúan a través de una inhibición competitiva independiente de SAM, como es el caso de **EPZ005687**. Éste es bastante selectivo de EZH2 y su inhibición es mayor cuanto mayor sea la dosis administrada. Se ha ensayado en linfomas con mutaciones Y641 y A677, así como líneas celulares de tumores sólidos como el cáncer de mama y de próstata Y641 y A677. Otro inhibidor competitivo independiente de SAM es **EI1** que inhibe la metilación de EZH2 sin interferir en los niveles de la misma en el linfoma difuso de células B grandes (Kim and Roberts, 2016).

Varios inhibidores de EZH2 se encuentran en ensayos clínicos incluyendo GSK126, EPZ-6438 (tazemetostat), CPI-1205, DS-3201b y MAK683 (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). Los dos primeros tienen como diana a EZH2, especialmente las mutaciones de la misma, a través de una inhibición competitiva con SAM (Pfister and Ashworth, 2017; Kim and Roberts, 2016). **GSK126** presenta una especificidad por EZH2 mucho mayor que un amplio número de metiltransferasas y actúa sobre linfomas que presentan mutación de ganancia de función de EZH2 (Kim and Roberts, 2016). En cuanto a **EPZ-6438**, presenta una mejor farmacocinética respecto a **EPZ005687** y se puede administrar por vía oral. Su efecto es dosis dependiente y su actividad es prometedora (Kim and Roberts, 2016). Se encuentra indicado en tumores recidivantes SNF5 negativos, en el sarcoma sinovial, en tumores sólidos avanzados, el linfoma de células B, el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma folicular, en ensayos clínicos de fase I y II como terapia única (Pfister and Ashworth, 2017). Este agente presenta tasas de respuesta extraordinarias en pacientes con linfoma folicular que presentan mutado EZH2. En el caso del linfoma difuso de células B los resultados no han sido tan prometedores. Además, se está comenzando a ensayar en mesoteliomas y tumores rabdoideos malignos, puesto que a estos les falta el complejo de deubiquitinasa BAP1 y el complejo SWI/SNF INI1/SMARCB1/SNF5 respectivamente, ambos complejos sometidos a la acción de EZH2 (Mohammad et al., 2019). **CPI-1205** se utiliza para el linfoma de células B, en ensayos de fase I. **DS-3201b**, por su lado, está ensayándose en pacientes con linfoma, e inhibe ambas EZH (EZH1, EZH2) y presenta una mayor eficacia preclínica en tumores hematológicos (incluyendo la leucemias mieloide y linfocítica agudas) que los agentes que solo tienen efecto en la EZH2 (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). Por último, **MAK683** presenta un mecanismo de acción algo diferente puesto que se fusiona a EED (que forma parte de PRC2), impidiendo que éste interactúe con EZH2 y disminuyendo por ende la trimetilación de H3K27. Se está estudiando en linfoma difuso de células B grandes y en tumores sólidos en estadios avanzados (Mohammad et al., 2019).

Inhibidores DOT1L

DOT1L provoca la metilación, dimetilación y trimetilación de H3K79 (esta lisina también puede ser metilada por NSD2) (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). Regula la supervivencia y proliferación de líneas celulares leucémicas que presentan translocaciones del gen MLL (Figura 12). Las proteínas de fusión con MLL atraen a DOT1L y se produce la metilación de H3K79, lo que tiene como resultado final una expresión anómala de genes implicados en la generación de leucemia como HOXA9 y MEIS1 (Pfister and Ashworth, 2017). La actividad enzimática de DOT1L es crucial para la actividad de las proteínas de fusión MLL lo que hace que éste sea una importante diana terapéutica (Kim and Roberts, 2016).

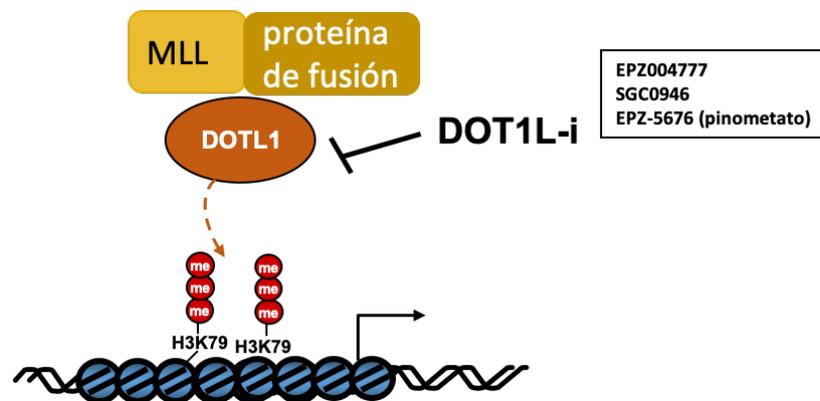


Figura 12. Se representa la metilación de H3K79 por DOT1L. Las proteínas de fusión con MLL atraen DOT1L y participan en la actividad del mismo. A su vez, se representa la inhibición de DOT1L mediante DOT1L-i y se recogen los principales inhibidores.

El hecho de que las leucemias con reorganización de MLL secundaria a la acción de DOT1L llevó a pensar que si se llevaba a cabo una terapia dirigida a DOT1L podría servir como tratamiento eficaz en este tipo de leucemias (Mohammad et al., 2019). Sin embargo, estos inhibidores presentan una actividad lenta por lo que su acción clínica puede resultar limitada (Kim and Roberts, 2016). Entre los inhibidores de DOT1L que se han identificado se encuentran **EPZ004777**, **SGC0946** y **EPZ-5676**, que impiden la metilación de H3K79 silenciando genes de fusión MLL y provocando la destrucción de líneas celulares con reorganización MLL (Kim and Roberts, 2016). De este modo, el objetivo final es producir la apoptosis de las células con reorganización MLL. El inhibidor EPZ-5676 (pinometato) se está utilizando en ensayos clínicos para comprobar su eficacia en las recidivas de leucemia que presentan reordenamiento MLL (Pfister and Ashworth A, 2017). Este inhibidor desencadenó la apoptosis de las células leucémicas con dicho reordenamiento, sin embargo, en la leucemia refractaria al tratamiento recidivante la respuesta clínica fue escasa. Sería necesario una actividad mayor del fármaco bloqueando la metilación de H3K79 y estudiar detenidamente las dosis-eficacia para explicar el porqué de esta paradoja (Mohammad et al., 2019). También se ha utilizado esta terapia en la leucemia mieloide aguda con mutación de NPM1, presente en una proporción bastante relevante de todos los casos de este tipo de leucemia (aproximadamente el 30%) (Mohammad HP et al., 2019).

Inhibidores G9A (EHMT2)

G9A, también denominada EHMT2, produce la metilación y dimetilación de H3K9 (Figura 13). Se encuentra sobreexpresada en leucemia, carcinoma hepatocelular y en cáncer de mama, pulmón y próstata. Participa en procesos que intervienen en el desarrollo de tumores como la diferenciación, proliferación y metaplasia celulares (Pfister and Ashworth, 2017).

Debido a la sobreexpresión de la HMT G9a en tumores sólidos y hematológicos, se ha tratado de utilizarla como diana terapéutica. Sin embargo, los efectos de esta familia de inhibidores sobre el desarrollo tumoral han sido, hasta ahora, mucho menores de lo esperado (Mohammad et al., 2019).

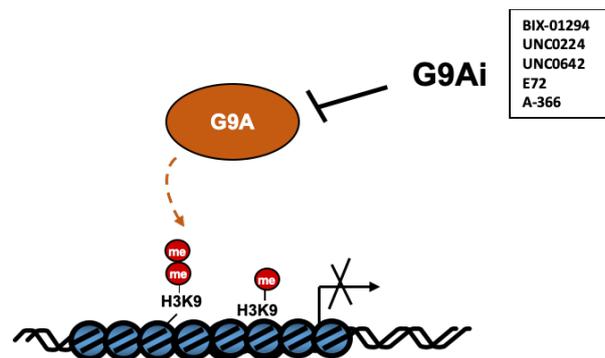


Figura 13. G9A cataliza la metilación y dimetilación de H3K9, asociado con represión transcripcional. Se representan los principales inhibidores.

Podemos clasificar estos inhibidores según su mecanismo de acción, dividiéndolos en inhibidores competitivos del sustrato, inhibidores competitivos SAM e inhibidores de mecanismo incierto.

Los inhibidores competitivos del sustrato se unen a la histona a través del lugar de unión de G9a y no compiten con SAM, siendo más específicos que aquellos que compiten con SAM (Cao et al., 2019). Entre estos se encuentra **BIX-01294**, que se ha demostrado que reduce los niveles de metilación de H3K9 en múltiples líneas celulares, y algunos de sus derivados como **UNC0224**, **UNC0638**, **UNC0642**, **E72** y **A-366** (Pfister and Ashworth, 2017; Cao et al., 2019). Lo más importante de BIX-01294 es la posibilidad de generar derivados de éste más potentes y menos tóxicos, como UNC0224, que presenta una unión muy específica a la región de unión de G9A y resulta significativamente más potente que BIX-01294. UNC0638 se desarrolló para ganar mayor actividad simultáneamente a reducir la toxicidad, y se ha demostrado que puede disminuir la metilación de H3K9 en varias líneas celulares. Presenta buena permeabilidad celular, lo que resulta muy eficaz a la hora de obtener resultados clínicos y también posee una importante selectividad para G9a. Este agente inhibe la metilación en importantes genes supresores de tumores como P53 (Cao et al., 2019). El que consigue menos toxicidad y efectos secundarios por ser más selectivo es A-366, que demostró simultáneamente disminuir los niveles de dimetilación de H3K9 y la progresión tumoral (Pfister and Ashworth A, 2017; Cao et al., 2019).

4.1.4. Histona metil transferasa MLL

Algunas formas de leucemia agresiva poseen reordenamientos MLL. Cuando MLL se fusiona con otros componentes como AF4 -AFF1-, AF6 -AFDN-, AF9, AF10 -MLLT10- y ENL -MLLT1-, desaparece el dominio SET catalítico y no puede ser inhibido de forma directa, por lo que es necesario inhibir las proteínas de fusión en su conjunto (Pfister and Ashworth, 2017).

En el caso de la leucemia con reordenamiento MLL se pueden utilizar inhibidores EZH1 y EZH2, DOT1L, KDM1A y BET, bloqueando la transcripción de genes que favorecen la leucemia (Pfister and Ashworth, 2017). Cabe destacar que no todas las proteínas MLL están fusionadas con otros componentes, por lo que puede inhibirse también MLL salvaje y que incrementa el resultado terapéutico en este tipo de leucemia. De esta forma se han desarrollado inhibidores que bloquean la unión de MLL con otros componentes, como MM-401 que impide la unión MLL-WDR5. Otro ejemplo es MIV-6R, que imposibilita la fusión MLL-menin y la metilación de H3K4 y proporcionando un efecto antitumoral en las células leucémicas con reordenamiento MLL (Pfister and Ashworth, 2017; Liang et al., 2017). También se puede impedir el equilibrio entre proteínas de fusión MLL y MLL salvaje inhibiendo quinasas que interactúan con el receptor de interleucina 1 (que participa en la estabilidad de MLL) consiguiendo detener el desarrollo celular de la leucemia MLL (Liang et al., 2017). Una terapia probablemente muy conveniente es dirigirse hacia las vías de degradación de MLL/COMPASS (familia de enzimas Set1, codificada por MLL) para la leucemia MLL agresiva y refractaria (Liang et al., 2017).

Otra diana terapéutica es MLL-FP, que recluta DOT1L y produce la expresión anómala de HOXA9 y MEIS1 (implicados en la génesis de la leucemia), por lo que no solo constituye una de las proteínas de fusión presentes en la leucemia, sino que además participa directamente en la transcripción del gen MYC. Además, MLL-FP pueden asociarse a BRD4, PADc y SEC, que regulan la expresión de otros genes favorecedores de la leucemia como BCL2, CDK6 y MYC. De este modo, MLL-FP presenta un papel oncogénico importante. Hasta ahora ha resultado muy complicado encontrar un agente que inhiba directamente MYC puesto que su estructura es compleja y surgen dificultades para conseguir compuestos que puedan unirse e inhibirlo (Chan y Chen, 2019).

4.1.5. Inhibidores de histona demetilasa (HDMi)

Podemos dividir las histona demetilasa en aquellas cuya región activa depende de flavina (subfamilia KDM1) y aquellas cuya región activa depende del hierro y el cetoglutarato α (subfamilia con dominio Jumonji C). Ha resultado extremadamente complicado encontrar la especificidad suficiente hacia el dominio JMJC debido a que éste está muy conservado estructuralmente. De este modo todos los inhibidores que se encuentran en ensayos clínicos se dirigen hacia KDM1A (LSD1), como **GSK2879552**, **tranilcipromina**, **INCB059872** y **ORY-1001**. Estos inhibidores producen un incremento de los niveles de dimetilación de H3K4, expresando de este modo determinados genes (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019) (Figura 14).

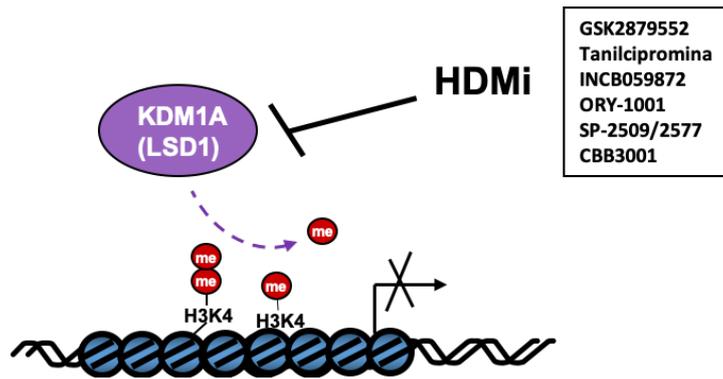


Figura 14. Se representa la principal histona demetilasa KDM1A (LSD1), que retira la metilación de H3K4 y podemos inhibirla mediante HDMi, representados los principales inhibidores en el recuadro.

Como se ha mencionado, la **tranilcipromina** inhibe KDM1A (LSD1), que controla la expresión de genes regulados por la oncoproteína de fusión MLL-AF9, presente en células leucémicas. De este modo, este inhibidor tiene actividad en leucemias con reorganización MLL-AF9, induciendo apoptosis (Pfister and Ashworth, 2017). Además, existen derivados de la misma, entre los que se encuentran: ORY-1001, GSK2879552, IMG-7289, CC-90011 e INCB059872, en ensayos clínicos para evaluar su eficacia en leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicos, leucemia linfoblástica aguda y cáncer de pulmón de células pequeñas (Fu et al., 2017).

ORY-1001 a través de la inhibición de KDM1A se ha demostrado que inicialmente incrementa la diferenciación, sin embargo no está claro que como terapia única provoque muerte celular por lo que es necesario pensar en posibles combinaciones terapéuticas del mismo. Este inhibidor se ha ensayado en leucemia mieloide aguda demostrando presentar una elevada toxicidad, causando trombocitopenia y neutropenia, aunque también presenta resultados precoces de actividad terapéutica como la diferenciación de células de leucemia mieloide aguda (Mohammad et al., 2019). Por su lado, **GSK2879552**, presenta un mecanismo de acción similar a ORY-1001 y bloquea el desarrollo celular en el cáncer de pulmón de células pequeñas puesto que en esta neoplasia el DNA se encuentra hipometilado (Pfister and Ashworth A, 2017; Mohammad et al., 2019). Los estudios realizados en el mencionado tipo de cáncer y en leucemia mieloide aguda han demostrado que el riesgo con esta terapia es mayor que el beneficio obtenido debido a su toxicidad (Mohammad et al., 2019). Pese a la toxicidad presentada por ORY-1001 y GSK2879552, han demostrado eficacia suficiente como para comenzar a esbozar otros potentes inhibidores a partir de los mismos (Fu et al., 2017).

Los inhibidores no selectivos de la monoaminoxidasa, el **sulfato de fenelzina** y la tranilcipromina constituyen inhibidores irreversibles que ya son utilizados en la clínica. El único inhibidor no reversible es **SP-2509/2577**, que ejerce su acción sobre KDM1A pero su efecto biológico está en duda (Mohammad et al., 2019).

Además, se ha desarrollado un inhibidor de KDM1 que detiene específicamente el desarrollo y división celular en el teratocarcinoma y carcinoma embrionario que expresan SOX2 y OCT4: **CBB3001**. Éste presenta una estructura distinta al resto de

inhibidores de este grupo, baja toxicidad y requiere concentraciones menos elevadas que otros inhibidores (como tranilcipromina) para ejercer su acción (Hoang et al., 2018).

Respecto a otras KDM, se cree que son potenciales dianas terapéuticas KDM4A y KDM4B debido a que se sobreexpresan en varios tumores y además participan en la activación de los receptores de andrógenos y estrógenos (Pfister and Ashworth, 2017). La inhibición de KDM4B provoca tanto la modificación de la expresión génica como el bloqueo del desarrollo celular (Mohammad et al., 2019). Algunos de los inhibidores para estas HDMT son **N-oxalilglicina (OGA) 110** y **NSC636819**, pero no son suficientemente específicos ni presentan una acción marcada, por lo que aún es necesario mejorar sus propiedades antes de incluirlos en ensayos clínicos (Pfister and Ashworth A, 2017). También se cree que es potencialmente una buena diana terapéutica la inhibición de KDM5A puesto que, al intervenir en la tolerancia farmacológica, podría ser útil en terapias combinadas o en las recidivas tumorales (Mohammad et al., 2019). **GSK-J4** es un inhibidor de KDM6A y KDM6B (Pfister and Ashworth, 2017).

La leucemia promielocítica aguda es un tipo de leucemia mieloide aguda que cuando presenta proteínas de fusión con RARa es susceptible de ser tratada con ácido transretinoico (ATRA), el cual provoca un silenciamiento génico y bloqueo de la transcripción y diferenciación de dicha leucemia. KDM7B (PDFH8), se relaciona directamente con las proteínas de fusión RAR y juntas retiran la dimetilación de H3K9. El tratamiento con ATRA provoca una alteración estructural de las proteínas de fusión RARa, por lo que no pueden interactuar el resto de elementos que intervienen en las modificaciones epigenéticas. KDM1 también participa en la interacción con las proteínas de fusión RARa, y la inhibición de KDM1 mediante ácido transretinoico (ATRA) puede incrementar los niveles de dimetilación en H3K4 en la leucemia mieloide aguda no promielocítica (Tsai and So, 2017).

4.1.6. Inhibidores de BET (BETi)

Como se detalló en apartados anteriores, entre las proteínas con bromodominio se encuentra la familia BET, presente como proteínas de fusión BRD4-NUTM1 o BRD3-NUTM1 producidas por traslocaciones cromosómicas en el carcinoma de línea media NUT, provocando un incremento de la expresión de MYC y fomentando la proliferación (Pfister and Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). Así, la fusión de BRD3 o BRD4 con NUT activa genéticamente a un tumor con una elevada letalidad, el carcinoma de línea media, y los inhibidores BET impiden el desarrollo de dicha neoplasia (Mohammad et al., 2019) (Figura 15).

Esta familia no solo aumenta la expresión de MYC, también de otros genes proinflamatorios como NFκB, que también impulsan genéticamente neoplasias hematológicas, por lo que estos inhibidores también se utilizan en este tipo de cánceres (Allis and Jenuwein, 2016; Mohammad et al., 2019). De hecho, se ha demostrado que BRD4 es una buena diana terapéutica en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, y los inhibidores BET han demostrado resultados eficaces en leucemia mieloide aguda y linfomas en diversos ensayos clínicos (Gerlach et al., 2018).

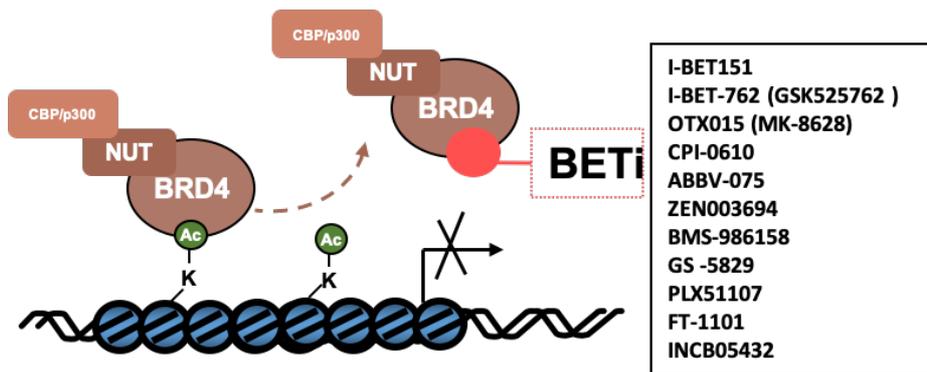


Figura 15. Se representa la proteína con bromodominio BRD4 interaccionando con una lisina acetilada. Se encuentra como proteína de fusión BRD4-NUT que a su vez interactúa con las HAT CBP/p300. El punto rojo representa un inhibidor de BET, indicándose en el recuadro los principales inhibidores.

El inhibidor BET **I-BET151** es efectivo en la leucemia con genes de fusión MLL puesto que MLL se asocia a BRD3 o BRD4 y dicho inhibidor desaloja el complejo de transcripción de la cromatina impidiendo que se transcriban genes como BCL2 y MYC. A pesar de que no suelen presentarse otras traslocaciones de esta familia en otros cánceres, la inhibición de BET ha demostrado bloquear el desarrollo del linfoma, la leucemia mieloide aguda, el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el meduloblastoma, además de cánceres de próstata, mama, páncreas, ovario, y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Pfister and Ashworth, 2017).

Las regiones de genes conocidas como *super-enhancers* son especialmente susceptibles a la acción de inhibidores BET. Los *enhancers* son regiones de 50-1500 pares de bases de DNA a las que se unen activadores, y en el caso de los *super-enhancers*, presentan elevadas concentraciones de complejo “mediador” (un coactivador transcripcional), BRD4 y H3K27ac. De este modo, se desarrolló **JQ1**, un inhibidor competitivo de BRD4 con la estructura de las tiodiazepinas, que se une a la lisina acetilada, interfiere en las uniones proteína-histona, desplaza la proteína de fusión BRD4-NUT e inhibe el desarrollo y la proliferación del carcinoma de línea media NUT. Este inhibidor también puede resultar útil en neoplasias que presenten un aumento de la expresión de MYC (Pfister and Ashworth, 2017; Allis and Jenuwein, 2016). Derivado de JQ1 se encuentra TEN-010, el cual se está utilizando en ensayos clínicos para carcinoma de línea media NUT, la leucemia mieloide aguda y el síndrome mielodisplásico (Pfister and Ashworth, 2017).

Otros inhibidores BET se están desarrollando y estudiando en ensayos clínicos. Principalmente se intenta esclarecer la eficacia, seguridad, toxicidad y tolerancia, aunque también se intenta comparar la terapia única con la terapia combinada para comprobar la efectividad (Mohammad et al., 2019). Entre los compuestos en ensayos se encuentran agentes como **I-BET-762 (GSK525762)**, **OTX015 (MK-8628)**, **CPI-0610**, **ABBV-075**, **ZEN003694**, **BMS-986158**, **GS-5829**, **PLX51107**, **FT-1101** e **INCB05432**, de los que OTX015 y CPI-0610 han revelado tener eficacia en neoplasias hematológicas avanzadas (Pfister and Ashworth, 2017). OTX015 ha demostrado ser eficaz en la regresión tumoral y estabilidad en carcinoma de línea media e I-BET-762 ha demostrado favorecer la estabilidad tumoral y la regresión parcial. Además, OTX015, ABBV-075 e I-

BET-762 han conseguido eliminar completamente neoplasias hematológicas, dejando en algunos casos únicamente alteraciones hematológicas asociadas. Sin embargo, en los tumores sólidos no se han logrado resultados tan convenientes, observándose sólo respuesta con PLX51107, ABBV-075 e I NCB057643 (Mohammad et al., 2019).

Actualmente se está intentando una línea de investigación con inhibidores BET de nueva generación que tratan de ser más selectivos, pero aunque en los ensayos preclínicos la eficacia está demostrada, no se conoce si presenta mejores resultados terapéuticos. Entre estos se encuentran inhibidores BET dirigidos específicamente a un bromodominio (como **ABBV-744**, que se dirige hacia el bromodominio II), inhibidores bivalentes como **MT1 (AZD5153)**, análogo de JQ1 y moléculas de pequeño tamaño que provocan proteólisis de BET, como **ARV-771**, **BETd-260**, **dBET6** y **QCA570** (Mohammad et al., 2019). Se ha desarrollado un nuevo inhibidor muy selectivo que presenta eficacia antitumoral en leucemia mieloide aguda secundaria a la expresión génica de HEXIM1 (un RNA mensajero que se utiliza como marcador farmacodinámico): **BI 894999**. Éste se ha ensayado también en tumores sólidos y a dosis más elevadas también presenta eficacia terapéutica (Gerlach et al., 2018).

4.1.7. Inhibidores de IDH1

IDH no constituye una proteína epigenética hacia la que dirigir una terapia específica como en el resto de apartados. En este caso se trata de que, al producirse en estas enzimas metabólicas una mutación aberrante, se puede desencadenar una neoplasia secundaria a una desregulación del estado epigenético de la célula (Mohammad et al., 2019).

De este modo, existen mutaciones de IDH que producen oncometabolitos 2-hidroxioglutarato, que se almacenan en las células malignas e inhiben la desmetilación por parte de α -KG (incluyendo las histona demetilasa y las DNA hidroxilasas) al unirse a la región activa al que se uniría la demetilasa y provocando alteraciones en la histona y en los patrones de metilación (Mohammad et al., 2019; Pfister and Ashworth, 2017; Dawson and Kouzarides, 2012). Por ello, se han desarrollado inhibidores de las IDH1 e IDH2 mutadas. AG-881 inhibe ambas IDH, AG-120 inhibe IDH1 y AG-221 inhibe IDH2. Se ha probado la eficacia de AG-120 y AG-221 en leucemia mieloide aguda con IDH1 o IDH2 mutadas, siendo bien tolerados (Pfister and Ashworth, 2017). Enasidenib inhibe IDH2 mutada y también ha demostrado conseguir remisión completa en pacientes con leucemia mieloide aguda recidivante o refractaria y dicha mutación (Dawson and Kouzarides, 2012).

4.1.8. Terapia dirigida contra remodeladores de cromatina SWI/SNF

Las mutaciones en los complejos SWI/SNF son las más frecuentes dentro de los componentes epigenéticos y están presentes en diversas neoplasias sólidas y hematológicas (Mohammad et al., 2019). Se han tratado de desarrollar terapias dirigidas a mutaciones de SWI/SNF pero normalmente éstas son mutaciones con pérdida de función por lo que es difícil encontrar compuestos que actúen de forma directa. Por ello, se ha propuesto llevar a cabo terapias alternativas de letalidad sintética estudiando las posibles vulnerabilidades de estas proteínas mutadas (Mohammad et al., 2019; Pfister

and Ashworth, 2017). La letalidad sintética consiste en que es necesaria la alteración de mínimo dos genes para conseguir la muerte celular (Mohammad et al., 2019). Se han producido varios compuestos que actúan sobre la deficiencia de SWI/SNF, interaccionando con dicho complejo y eliminándolo. Una de las interacciones letales sintéticas prometedoras en el tratamiento de diferentes cánceres con niveles de SNF5 (coactivador de la transcripción) disminuidos secundarios a los inhibidores de EZH2. La deficiencia de SNF5 promueve la formación de tumores rabdoides malignos, sarcomas epitelioides, hepatoblastomas de células pequeñas y sarcomas indiferenciados (Pfister and Ashworth, 2017).

Cuando SNF5 no está expresado, EZH2 regula el silenciamiento de P16 (supresor de tumores). En los tumores con niveles reducidos de SNF5, los niveles de EZH2 se encuentran elevados, lo que provoca la activación de P16 e impide el desarrollo de las células con niveles reducidos de SNF5. De este modo, podemos utilizar como diana terapéutica la deficiencia de SNF5 y el bloqueo de EZH2, con inhibidores como EPZ-6438 (Pfister and Ashworth A, 2017). También se ha asociado la deficiencia de otros componentes epigenéticos como ARID1A, PBRM1 o BRG1 inhiben EZH2. En el cáncer de ovario con mutaciones en ARID1A se ha demostrado que al ser tratados con GSK126 (inhibidor de EZH2) se consigue una inhibición de la proliferación y un retroceso tumoral importante. Sin embargo, la inhibición de EZH2 no resulta suficiente como terapia única para provocar letalidad de las células tumorales. ARID1B es susceptible de ser eliminado en los tumores con mutaciones de ARID1A, bloqueándose de este modo el desarrollo de aquellas líneas celulares con dichas mutaciones. De este modo, ARID1B podría ser una terapia en este tipo de neoplasias (Mohammad et al., 2019).

PBRM1 y BRG1 constituyen subunidades de SWI/SNF y son letales con la deficiencia de EZH2. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de estos mecanismos, es necesario seguir estudiando los posibles inhibidores que pueden contribuir en la interacción letal entre EZH2 y los componentes de SWI/SNF ya que por ejemplo EPZ-7210 (inhibidor EZH2) consigue acabar con las células de cáncer de ovario con niveles disminuidos de BRG1, pero no si el linaje es de cáncer pulmonar a pesar de que también sea deficiente en BRG1 (Pfister and Ashworth A, 2017). También, BRM es una diana para la letalidad sintética en los tumores con deficiencia de BRG1, por lo que la relación entre ellos es similar a la de EZH2 y BRG1 (Mohammad et al., 2019). Resulta más complicado dirigir terapias hacia ARID1B que hacia BRM debido a sus bromodominios o dominios ATPasa. El abordaje mediante letalidad sintética ofrece potenciales terapias prometedoras para abordar las alteraciones epigenéticas (Mohammad et al., 2019).

4.2. Combinación de fármacos

Debido a las limitaciones encontradas al utilizar los inhibidores de componentes epigenéticos como terapia única, se han llevado a cabo enfoques combinados que tratan de incrementar la eficacia sin empeorar la tolerabilidad (Mohammad et al., 2019). El uso de terapias combinadas es muy prometedor, fundamentalmente en tumores sólidos. Actualmente se encuentran en ensayos clínicos múltiples inhibidores epigenéticos combinados con terapias estándar, dirigidas e inmunoterapia, para determinar su eficacia terapéutica. A lo que más se presta atención en este tipo de terapias es a la dosis, toxicidad y eficacia (Mohammad et al., 2019; Ahuja et al., 2016). Un ejemplo es

que los inhibidores epigenéticos, al intervenir sobre la actividad transcripcional, pueden tardar días en tener efecto, por lo que jugar con la dosis del agente o sensibilizar al tumor o sistema inmune mediante otros tratamientos previamente al inhibidor epigenético propiamente dicho, puede resultar mucho más efectivo (Mohammad et al., 2019).

Una de las asociaciones más estudiadas es la de HDACi y DNMTi, y entre los HDACi e inhibidores de *check points* (como el inhibidor de WEE1, quinasa checkpoint que interviene en el ciclo celular, AZD1775), debido a la propiedad de los HDAC de favorecer la expresión génica (Pfister and Ashworth A, 2017; Ahuja et al., 2016). Se conoce que cuando se administra en primer lugar 5-azacitidina o decitabina a dosis bajas y posteriormente un inhibidor de HDAC el resultado es mucho mayor. Esta combinación induce la expresión de genes previamente silenciados con hipermetilación de promotores especialmente en neoplasias hematológicas (síndrome mielodisplásico y/o leucemia mieloide aguda) pero también en el cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado, mientras que el efecto de la HDAC como terapia única no consigue estos resultados (Ahuja et al., 2016). Se han llevado a cabo otros ensayos utilizando la combinación de hidralazina con valproato en el síndrome mielodisplásico (Foulks et al., 2012) y se ha probado la asociación de SAHA y TSA (ambos inhibidores de HDAC) obteniendo buenos resultados en el melanoma ya que se comprobó que favorecían el bloqueo del desarrollo celular a través de la expresión y activación de p21, p27 y NF- κ B, y MG132, lo que potencia la acción de TSA (Cheng et al., 2019).

Otra de las inhibiciones combinadas viene determinada por la complementariedad de la inhibición de DOT1L y la inhibición del cofactor de MLL, por lo que bloquear al tiempo ambas dianas proporciona rapidez de respuesta y efectos más profundos en la expresión génica de las traslocaciones MLL, siendo menos efectivos como terapias únicas por separado (Kim and Roberts, 2016). Se ha demostrado que aumenta la eficacia antileucémica debido a un incremento de la función antiproliferativa en las células con reordenamientos MLL la combinación de un activador de SIRT1 (SRT1720) con un inhibidor DOT1L (EPZ004777) (Moufarrij et al., 2020). Por otro lado, se conoce que, aunque sus dianas son diferentes, DOT1L y BRD4 presentan funciones similares y al abarcar la inhibición de ambos con una terapia combinada con SGC0946 e I-BET produce sinergia y detiene el desarrollo de células leucémicas con MLL reordenado. En otro tipo de leucemias ha resultado útil la combinación de pinometostat (inhibidor de DOT1L) y JQ1 (inhibidor de BRD4) puesto que disminuye los niveles de expresión del gen MYC (Moufarrij et al., 2020).

Otra de las combinaciones llevadas a cabo que cabe mencionar es aquella realizada con agentes quimioterápicos. En estos ensayos se trata de reducir la posible resistencia vinculados a alteraciones epigenéticas, como con los inhibidores de quinasas (Mohammad et al., 2019; Ahuja et al., 2016). Sin embargo, las resistencias no solo se deben a dichos eventos por lo que resulta complicado. Los inhibidores de quinasas presentan un inconveniente y es que pueden provocar reprogramación transcripcional, problema que se ha tratado de resolver asociando inhibidores BET, mostrando esta combinación resultados positivos en el cáncer de mama y melanoma (Mohammad et al., 2019). Se han encontrado resultados muy favorables asociando el inhibidor de HDAC vorinostat con quimioterapia (carboplatino y paclitaxel) en el tratamiento del carcinoma pulmonar no microcítico metastásico, incrementando la respuesta y la supervivencia de

los pacientes. También en casos similares se está probando DAC (5-aza-2'-deoxycytidine, un inhibidor DNMT) junto a carboplatin y llevándose a cabo un ensayo en el cáncer colorrectal mediante SGI-110 para recuperar la sensibilidad al irinotecán (Ahuja et al., 2016).

La FDA ha aprobado la asociación entre un inhibidor HDAC (panbinostat) con un inhibidor del proteasoma (bortezomib) y un fármaco inmunoterápico en el mieloma múltiple (Ahuja et al., 2016).

4.3. Inhibidores epigenéticos e inmunoterapia

Numerosas evidencias indican que los mecanismos epigenéticos participan en la regulación del sistema inmune y las alteraciones epigenéticas están implicada en la evasión inmune tumoral. Por ejemplo, la presentación del antígeno se ve comprometida por la hipermetilación del DNA o la deacetilación por las HDAC de los promotores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Igualmente, en varios tipos de cáncer se expresan antígenos muy inmunogénicos (antígenos de cáncer de testículo, CTA) que generan mecanismos inmunogénicos para detener el tumor y están regulados por la metilación de promotores. De esta forma, la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas van a participar en la función inmunológica a través de la regulación de la expresión de inmunoglobulinas, el desarrollo de células B, la maduración de linfocitos T helper 1 y 2 y la generación de citocinas. Por tanto, al dirigir terapias para la inhibición de componentes epigenéticos también se incide sobre la respuesta inmune antitumoral, aumentando la respuesta clínica y la respuesta a terapias inmunogénicas (Figura 16) (Pfister and Ashworth, 2017).

Los inhibidores HDAC y DNMT al modular la transcripción génica en las células cancerígenas e inmunes regulan positivamente la inmunidad antitumoral por lo que se estudia utilizarlos asociados a inmunoterapia (Mohammad et al., 2019). Se está investigando cómo los inhibidores epigenéticos pueden mejorar la eficacia de terapias dirigidas al bloqueo de los *checkpoint* inmunes y de terapias con células T basadas en el sistema CAR (Pfister and Ashworth, 2017).

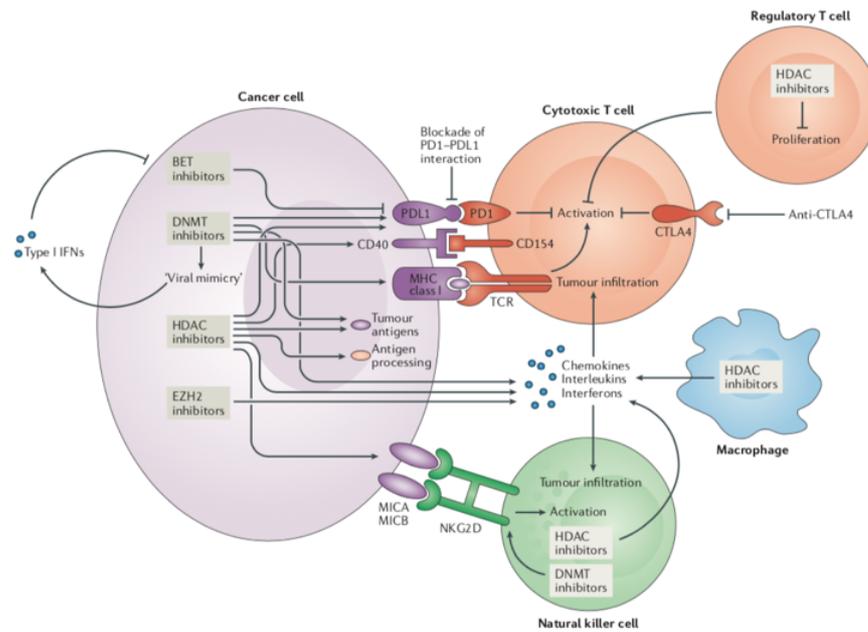


Figura 16. Papel de los inhibidores epigenéticos en inmunooncología. Se encuentran en ensayos clínicos tres inhibidores epigenéticos en combinación con terapias que bloquean o la interacción entre PD1 y PDL1 o CTLA4: inhibidores de HDAC, inhibidores de DNMT e inhibidores de EZH2. Los inhibidores de DNMT y HDAC aumentan la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), antígenos tumorales y CXCL9 y CXCL10 (quimiocinas de tipo T helper 1 (TH1), que permiten que los linfocitos T CD8+ citotóxicos y las células *natural killer* se infiltren en el tumor favoreciendo su regresión). Los inhibidores de EZH2 provocan, al igual que los anteriores un aumento de la expresión de quimiocinas de tipo TH1. Los inhibidores de DNMT también inducen la respuesta del interferón tipo I a través del aumento de los niveles de RNA de doble cadena (dsRNA) en las células tumorales ("mímica viral"). El interferón tipo I a su vez, inhibe la acción de los inhibidores BET. Mientras que los inhibidores BET provocan una disminución de los niveles de PDL1, los inhibidores de DNMT y HDAC provocan un incremento de los mismos. Los inhibidores DNMT también aumentan la expresión de los ligandos del receptor NKG2D de las células *natural killer* (receptor activador, por lo que aumenta la actividad de las células natural killer contra el tumor) MICA (secuencia A relacionada con el polipéptido MHC clase I) y MICB (Pfister and Ashworth, 2017).

En células neoplásicas, Azacitidina y decitabina (inhibidores de DNMT) incrementan la expresión de genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de antígenos CTA, entre los que se engloban el antígeno asociado al melanoma 1 (MAGEA1) y NY-ESO-1 (CTAG1A), induciendo así la respuesta inmune. Por otra parte, las células tumorales se vuelven más sensibles al interferón tipo I tras el tratamiento con decitabina debido a que ésta induce la expresión de genes que participan en la respuesta a dicho interferón. Estos dos compuestos también han demostrado una respuesta coordinada con terapias inmunológicas en el carcinoma pulmonar no microcítico. A dosis bajas, la decitabina también induce los receptores de los linfocitos *natural killer* (NK) favoreciendo la destrucción de las células de LMA (Ahuja et al., 2016; Pfister and Ashworth, 2017).

Por su lado, los inhibidores de HDAC facilitan la acción destructora de los linfocitos T en múltiples tumores sólidos entre los que se encuentra el cáncer de mama, pulmón, próstata y renal y también en neoplasias hematológicas como en el linfoma.

Estos inhibidores de HDAC participan en la regulación de la expresión de MHC, antígenos tumorales, ligandos PD-1, quimioquinas y otros componentes que regulan el procesamiento de antígenos, así como en la supresión de células T reguladoras, la inducción de apoptosis inmunogénica en líneas celulares neoplásicas y en la generación de ligandos para los receptores de las células NK (Mohammad et al., 2019; Pfister and Ashworth, 2017). Además, los inhibidores de HDAC regulan el mantenimiento de la activación de células T, eludiendo la apoptosis impulsada por la activación (Allis and Jenuwein, 2016). Así, se ha demostrado que la asociación de un inhibidor HDAC con un inhibidor de PD1 genera una mayor respuesta antitumoral (Pfister y Ashworth, 2017). Entinostat (inhibidor de HDAC clase I) se ha utilizado asociado a altas dosis de IL-2 en el carcinoma renal metastásico, demostrando un incremento de la supervivencia secundaria a la reducción de linfocitos T reguladores (Mohammad et al., 2019).

Por su parte, los inhibidores de EZH2 y los de DNMT incrementan los niveles de CXCL9 y CXCL10, que reclutan a las células T y facilitan la destrucción del tumor (Pfister y Ashworth, 2017; Mohammad et al., 2019). La inhibición de EZH2 reduce los linfocitos T reguladores y aumenta los efectores, por lo que asociándolo a anti-CTLA4 (que en los linfocitos T favorece la expresión de EZH2) incrementa los efectos terapéuticos. La inhibición de G9a (KMT) provoca la expresión de genes de interferón y confiere mayor resistencia frente a los patógenos (Allis and Jenuwein, 2016). Por otro lado, se ha demostrado que los inhibidores de KDM1 incrementan la sensibilidad al anti-PD (inmunoterapia) puesto que inducen inmunidad antitumoral y la entrada en el tumor de linfocitos T.

JQ1 (inhibidor de BET) provoca una reducción del nivel de expresión de PDL1 y por lo tanto incrementa la acción de los linfocitos T citotóxicos y detiene el desarrollo tumoral, mientras que los inhibidores de DNMT y de HDAC provocan un aumento de PDL1, los primeros en leucemia y carcinoma pulmonar no microcítico y los segundos en melanoma (Mohammad et al., 2019; Pfister and Ashworth, 2017).

Por tanto, los inhibidores epigenéticos pueden asociarse a terapias sobre *check points* de control inmunitario (anticuerpos anti-PD1 o anti-CTLA4) y sobre células T. Anti-CTLA4 regula la tolerancia en los linfocitos T y se han obtenido resultados prometedores en el melanoma, mientras que anti-PD-1 está resultando efectivo en pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico. En ensayos clínicos de pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico avanzado en los que se utiliza terapia epigenética combinada con anti-PD-1 presentaron una supervivencia libre de progresión mucho más elevada que la presentada únicamente con la inmunoterapia (Ahuja et al., 2016). Los anticuerpos anti-PD1 o anti-CTLA4 se han asociado a azacitidina o entinostat mostrando resultados muy importantes en la regresión tumoral. También se ha experimentado con GSK126 (inhibidor de EZH2) aumentando la actividad de los inhibidores de *check points* y células T. Así, se están desarrollando ensayos con combinación de inhibidores de *check points* con inhibidores de DNMT, HDAC y EZH2, logrando mayores respuestas terapéuticas, como en el linfoma de Hodgkin recidivante o refractario, en el que se ha utilizado azacitidina previamente al tratamiento con pembrolizumab o nivolumab (inhibidores de *check points*) mejorando la tasa de respuesta (Pfister and Ashworth, 2017).

En resumen, dada la capacidad de los inhibidores epigenéticos de modular la expresión génica de células cancerosas e inmunes, incrementando la inmunidad antitumoral y afectando a la función de las células inmunitarias, existe un creciente interés en el uso de estos agentes epigenéticos en combinación con la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.

5. CONCLUSIONES

Como hemos visto a lo largo de este trabajo de revisión, el conocimiento de los patrones epigenéticos fisiológicos, proporciona la información necesaria para detectar las alteraciones epigenéticas presentes en cáncer. Dado que estas modificaciones son reversibles, son susceptibles de terapias dirigidas a las mismas, lo que abre un potencial terapéutico extraordinario, permitiendo el abordaje específico hacia cada modificación. Estos nuevos modelos de terapia están en continuo estudio y desarrollo, presentando resultados muy prometedores, no sólo como terapias únicas sino también y especialmente, como terapias combinadas con otros agentes. Constituye un campo de investigación muy activo y continuamente actualizado por lo que las perspectivas de futuro resultan prometedoras a la hora de abordar las diferentes neoplasias tanto sólidas como hematológicas desde un punto de vista epigenético y, como se ha mencionado anteriormente, no solo como terapia única sino con una importante relevancia en combinación con otras terapias de gran actualidad como la inmunoterapia, aportando la posibilidad de nuevas perspectivas terapéuticas con una importante proyección en la actividad clínica para el tratamiento del cáncer.

6. REFERENCIAS

1. Ahuja, N., Sharma, A. R., & Baylin, S. B. (2016). Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 73–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-111314-035900>
2. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016 Aug;17(8):487-500.
3. Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J Mol Biol*. 2017 May 19;429(10):1459-1475.
4. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011 Sep 23;11(10):726-34.
5. Brien GL, Valerio DG, Armstrong SA. Exploiting the Epigenome to Control. Cancer-Promoting Gene-Expression Programs. *Cancer Cell*. 2016 Apr 11;29(4):464-476. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.007.
6. Cao H, Li L, Yang D, Zeng L, Yewei X, Yu B, Liao G, Chen J. Recent progress in histone methyltransferase (G9a) inhibitors as anticancer agents. *Eur J Med Chem*. 2019 Oct 1;179:537-546.
7. Chan AKN, Chen CW. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. *Front Cell Dev Biol*. 2019 May 15;7:81
8. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, Han J, Wei X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2019 Dec 17;4:62.
9. Cooper, G. and Hausman, R. *La Célula*. 7ª ed. Madrid: editorial Marbán: 2017.
10. Dafflon C, Craig VJ, Méreau H, Gräsel J, Schacher Engstler B, Hoffman G, Nigsch F, Gaulis S, Barys L, Ito M, Aguadé-Gorgorió J, Bornhauser B, Bourquin JP, Proske A, Stork-Fux C, Murakami M, Sellers WR, Hofmann F, Schwaller J, Tiedt R. Complementary activities of DOT1L and Menin inhibitors in MLL-rearranged leukemia. *Leukemia*. 2017 Jun;31(6):1269-1277.
11. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012 Jul 6;150(1):12-27.
12. Delgado, M.D. , “Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer,” *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.*, vol. XXIV, Apr. 2009.
13. Dhall A, Zee BM, Yan F, Blanco MA. Intersection of Epigenetic and Metabolic Regulation of Histone Modifications in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2019 May 22;9:432.
14. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1148-59
15. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Müller S, Pawson T, Gingras AC, Arrowsmith CH, Knapp S. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*. 2012 Mar 30;149(1):214-31.
16. Foulks JM, Parnell KM, Nix RN, Chau S, Swierczek K, Saunders M, Wright K, Hendrickson TF, Ho KK, McCullar MV, Kanner SB. Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *J Biomol Screen*. 2012 Jan;17(1):2-17.

17. Fu X, Zhang P, Yu B. Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Future Med Chem.* 2017 Jul;9(11):1227-1242
18. Gerlach D, Tontsch-Grunt U, Baum A, Popow J, Scharn D, Hofmann MH, Engelhardt H, Kaya O, Beck J, Schweifer N, Gerstberger T, Zuber J, Savarese F, Kraut N. The novel BET bromodomain inhibitor BI 894999 represses super-enhancer-associated transcription and synergizes with CDK9 inhibition in AML. *Oncogene.* 2018 May;37(20):2687-2701.
19. Hasan N, Ahuja N. The Emerging Roles of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Complexes in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(12):1859.
20. Helming KC, Wang X, Roberts CWM. Vulnerabilities of mutant SWI/SNF complexes in cancer. *Cancer Cell.* 2014 Sep 8;26(3):309-317.
21. Hoang N, Zhang X, Zhang C, Vo V, Leng F, Saxena L, Yin F, Lu F, Zheng G, Bhowmik P, Zhang H. New histone demethylase LSD1 inhibitor selectively targets teratocarcinoma and embryonic carcinoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2018 May 1;26(8):1523-1537.
22. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* 2016 Feb;22(2):128-34.
23. Kornberg, R. D., Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond. *Cromosomas y cromatina. La célula.* 7ª ed. Madrid: editorial Marbán; 2017. Pág 204 -216.
24. Küçük C, Wang J, Xiang Y, You H. Epigenetic aberrations in natural killer/T-cell lymphoma: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Feb 20;12:1758835919900856.
25. Kumar R, Li DQ, Müller S, Knapp S. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene.* 2016 Aug 25;35(34):4423-36.
26. Lan L, Cao H, Chi W, Meng W, Zhao L, Cui W, Wang B. Aberrant DNA hypermethylation-silenced LINC00886 gene accelerates malignant progression of laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2020 Feb 13:152877.
27. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 Dec 16;363(25):2424-33.
28. Liang K, Volk AG, Haug JS, Marshall SA, Woodfin AR, Bartom ET, Gilmore JM, Florens L, Washburn MP, Sullivan KD, Espinosa JM, Cannova J, Zhang J, Smith ER, Crispino JD, Shilatifard A. Therapeutic Targeting of MLL Degradation Pathways in MLL-Rearranged Leukemia. *Cell.* 2017 Jan 12;168(1-2):59-72.e13.
29. Maresca A, Zaffagnini M, Caporali L, Carelli V, Zanna C. DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front Genet.* 2015 Mar 12;6:90.
30. McClure JJ, Li X, Chou CJ. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. *Adv Cancer Res.* 2018;138:183-211. 2018 Mar 1. Review.

31. Mohammad HP, Barbash O, Creasy CL. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nat Med.* 2019 Mar;25(3):403-418. doi: 10.1038/s41591-019-0376-8.
32. Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S. Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Feb;17(2):91-107.
33. Moufarrij, S., Srivastava, A., Gomez, S. *et al.* Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Sci Rep* 10, 3470 (2020)
34. Pant K, Peixoto E, Richard S, Gradilone SA. Role of Histone Deacetylases in Carcinogenesis: Potential Role in Cholangiocarcinoma. *Cells.* 2020 Mar 23;9(3).
35. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Apr;16(4):241-263.
36. S SK, Swamy SN, Premalatha CS, Pallavi VR, Gawari R. Aberrant Promoter Hypermethylation of RASSF1a and BRCA1 in Circulating Cell-Free Tumor DNA Serves as a Biomarker of Ovarian Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Oct 1;20(10):3001-3005.
37. Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:57-85. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4.
38. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.* 2015 Jan 29;7(1):9.
39. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Apr 1;6(4):a018713. doi:10.1101/cshperspect.a018713.
40. Singh N, Rashid S, Rashid S, Dash NR, Gupta S, Saraya A. Clinical significance of promoter methylation status of tumor suppressor genes in circulating DNA of pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020 Mar 7.
41. Tsai CT, So CW. Epigenetic therapies by targeting aberrant histone methylome in AML: molecular mechanisms, current preclinical and clinical development. *Oncogene.* 2017 Mar 30;36(13):1753-1759. doi: 10.1038/onc.2016.315.
42. Wilson BG, Roberts CW. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jun 9;11(7):481-92.
43. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell.* 2012 Jul 10;22(1):9-20.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y sin ninguna duda, me gustaría agradecer a mi directora todo el tiempo empleado en orientarme e instruirme en este proyecto, su dedicación, su paciencia y entusiasmo por que disfrutara y aprendiera de esta experiencia y me empleara a fondo en este trabajo. Por darme todas las herramientas necesarias para poder ser autosuficiente y por guiarme siempre que lo he necesitado, por su eterna disponibilidad y por animarme y darme la motivación necesaria para llevarlo a cabo siempre aspirando a la máxima potencia. Gracias, Dolores, por exigirme (siempre en el buen sentido) la mejor versión de mí misma, y ayudarme a conseguirlo. Me siento muy orgullosa del resultado final, de la elección de mi trabajo y de todo lo que he aprendido en este recorrido, y no sería posible de no haber sido por ti.

Por supuesto, a mi persona y máximo apoyo: mi madre. Gracias, mamá, por tu infinita paciencia cuando el estrés me invade y nadie más me soporta, por estar ahí independientemente de que te lo pida o no, por confiar en mí al menos un millón de veces más que yo misma y por haberme acompañado en todas las decisiones, los baches y los momentos amargos de estos largos seis años de carrera (y de toda mi vida). Gracias por transmitirme siempre tu cariño y orgullo y por hacer que siga adelante y no me venga abajo cuando flaqueo. Y evidentemente, gracias por compartir conmigo las mejores etapas, por quererme sin límites y aceptarme sin cuestionarme.

A toda mi familia, por confiar en mí, especialmente mis abuelos, que siempre se les llena la boca de orgullo. Buelito, si tuviera que dedicar a una sola persona este logro, este título y este trabajo, sería a ti.

A mis amigas que considero de siempre (Bego, María, Ale, Mer, Ana Lobeto) por nunca hacerme caso en mi negatividad y siempre dar por hecho que lo conseguiría. Gracias, gracias y gracias por acompañarme en este viaje, incluso en la distancia. También a Ana Rojo, por apoyarme especialmente este último año y haber sido un gran pilar en la cuarentena (donde ha tenido lugar gran parte de este proyecto).

A la familia de la que tuve la suerte de formar parte en Reus en mi año de SICUE, por hacerme crecer y regalarme la mejor experiencia personal de toda la carrera y haber estado siempre a la altura incluso con distancia de por medio. Especialmente a las que fueron mis compañeras de piso por ser lo más parecido a hermanas que he conocido, a Onia, que consigue hacerme llorar en todas las despedidas y a Carlos, que siempre tiene un rato para hacerme reflexionar.

Y no pueden faltar mis amigas de la carrera: quienes verdaderamente han comprendido y compartido siempre agobios, frustraciones y sentimientos, así como días de máxima liberación y felicidad. Gracias a quienes forman parte de mi vida desde el comienzo (Celia, Lydia y Ana) pero también a quienes se unieron por el camino a lo largo de los cursos y estuvieron a la altura. Celia, mi compañera desde el principio de los principios: gracias por haberme escogido y haberte quedado, por tu valentía, por tus consejos ilimitados, por estar siempre sin excepción. Eres el mayor regalo que la carrera

podría darme y me siento tremendamente afortunada de ser tu amiga. Si de alguien estoy orgullosa a más no poder, es de ti. Lydia, porque a veces tengo buen ojo y contigo no me equivoqué. Gracias por tener siempre en la retaguardia una broma que regalarme, por sacarme una media de cien carcajadas al día y por supuesto, por ser mi gran apoyo sin pedir explicaciones, y sin excepción.