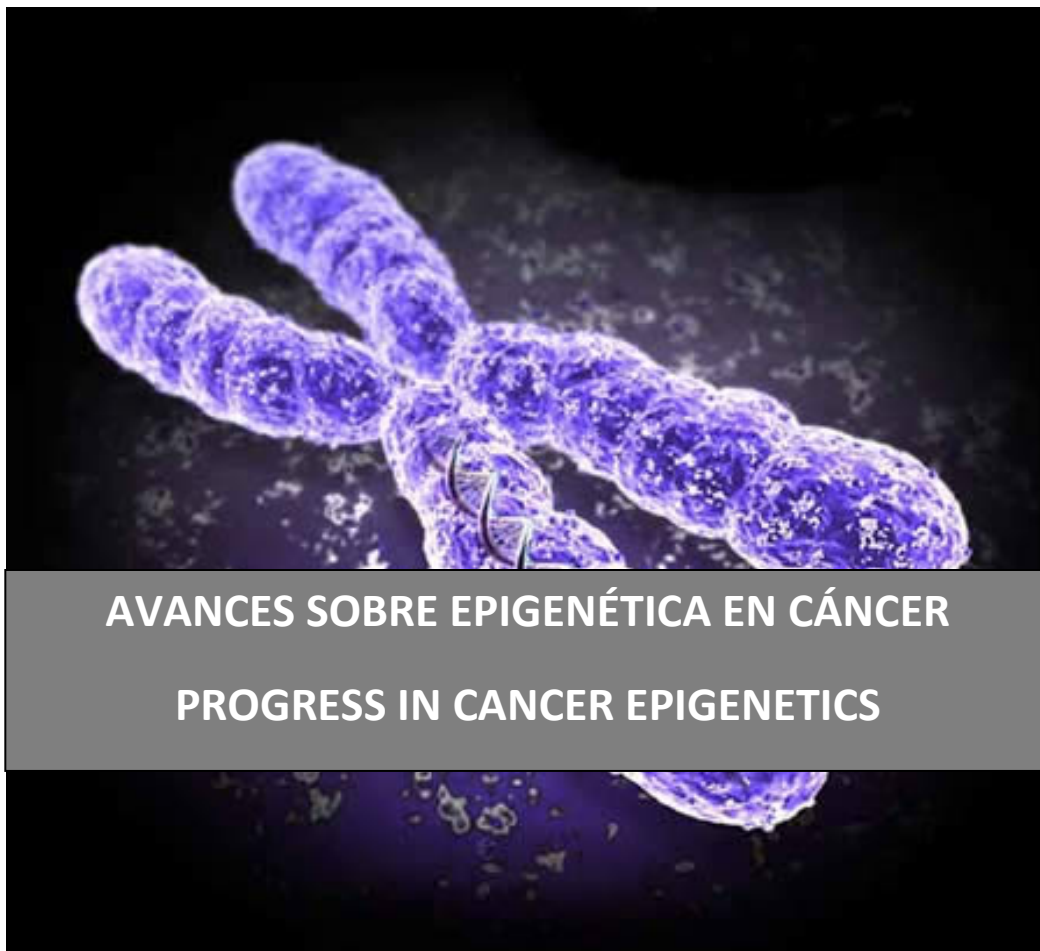




Facultad de Medicina

GRADO EN MEDICINA
TRABAJO DE FIN DE GRADO

Santander, Junio 2016



Autora: M^a Soledad Díaz-Rivavelarde Arozamena

Directora: M. Dolores Delgado Villar

Índice

1. Introducción	7
2. Estructura de la cromatina	8
2.1 Los nucleosomas y niveles de empaquetamiento de la cromatina	9
2.2 Heterocromatina y eucromatina.....	10
3. El epigenoma en células normales	12
3.1 Modificaciones postraduccionales de las histonas	12
3.1.1 Tipos de modificaciones de las histonas.....	15
3.2 Metilación del DNA	19
3.2.1 Hidroximetilación del DNA	21
3.3 Remodeladores de la cromatina	23
4. El epigenoma en cáncer	25
4.1 Metilación del DNA y cáncer.....	26
4.1.1 Mutaciones en DNMT3A	27
4.1.2 Mutaciones en TET	28
4.2 Modificaciones de las histonas y cáncer	29
4.3 Remodeladores de la cromatina y cáncer.....	33
5. Terapia epigenética de cáncer.....	36
5.1 Inhibidores de las DNA metiltransferasa	37
5.2 Inhibidores de las histonas deacetilasas	38
5.3 Combinación de DNMTis y HDACis	39
5.4 Combinación de DNMTis y HDACis con otras terapias	39
5.5 Combinación de terapia epigenética con inmunoterapia.....	41
5.6 Terapias epigenéticas con nuevos agentes.....	43
5.6.1 Inhibidores de IDH1 e IDH2	44
5.6.2 Inhibidores de EZH2.....	44
5.6.3 Inhibidores de DOT1L	44
5.6.4 Inhibidores de LSD1	44
5.6.5 Inhibidores de BET	45
6. Conclusiones.....	46
7. Agradecimientos.....	47
8. Bibliografía.....	47

RESUMEN

La epigenética se refiere al estudio de los cambios de la expresión génica heredables a través de la división celular que tienen lugar sin cambios en la secuencia de DNA. El epigenoma constituye el estado epigenético global de una célula. Los principales mecanismos epigenéticos incluyen las modificaciones de las histonas, la metilación del DNA y el remodelado de la cromatina. Estudios recientes están contribuyendo a descifrar el epigenoma humano y cómo éste está alterado en cáncer. Las alteraciones epigenéticas en cáncer tales como patrones alterados de modificaciones de histonas o silenciamiento de genes supresores de tumores por hipermetilación de sus promotores están frecuentemente relacionadas con mutaciones en genes que controlan el empaquetamiento del DNA dentro de la cromatina. La terapia epigenética incluye inhibidores de enzimas responsables de la metilación del DNA o de la deacetilación de histonas, además de nuevos agentes dirigidos hacia modificadores epigenéticos. Este trabajo presenta los avances recientes sobre el epigenoma en las células normales, cómo las alteraciones en modificadores epigenéticos mutados frecuentemente promueven la tumorigénesis y cómo estas alteraciones están siendo utilizadas como dianas terapéuticas contra el cáncer.

Palabras clave: epigenética, cáncer, metilación del DNA, modificaciones de histonas, terapia epigenética.

ABSTRACT

Epigenetics refers to the study of the changes in the gene expression which are inherited upon cell division without changes in the DNA sequence. The epigenome constitutes the global epigenetic state of a cell. The main epigenetic mechanisms include histone modifications, DNA methylation and chromatin remodeling. Recent studies are contributing to understand the human epigenome and how it is altered in cancer. Epigenetic abnormalities in cancer such as alteration in histone modification patterns or silencing of tumor suppressor genes by promoter hypermethylation are frequently related to mutations in genes that control the packaging of DNA in chromatin. Epigenetic therapy includes inhibitors of enzymes responsible of DNA methylation or histone deacetylation as well as new agents targeting epigenetic modifiers. This work presents the recent progress on the epigenome in normal cells, how alterations in frequently mutated epigenetic modifiers promote tumorigenesis and how these alterations are being used as targets for cancer therapy.

Key words: epigenetics, cancer, DNA methylation, histone modifications, epigenetic therapy.

ABREVIATURAS:

BET:	Bromodominio y extra-terminal.
BRCA1:	Cáncer de mama 1.
BRD:	Bromodominio.
CDKN2A:	Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina.
CREBBP:	Proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP.
CTD:	Dominio C terminal.
DAC:	Dacogen.
DNMT:	DNA metiltransferasa.
DOT1:	“Disrupter of telomeric silencing-1”.
EZH2:	“Enhancer of zeste homolog 2”.
EP300:	Proteína p300 de unión a E1A
HAT:	Histona acetiltransferasa.
HDAC:	Histona deacetilasa.
HDMs:	Histina demetilasa.
HMTs:	Histona metiltransferasas.
ISWI:	“imitation SWI”.
JARID1:	“jumonji AT-rich interactive domain 1”.
KAT:	Lisina acetiltransferasa.
LMA:	Leucemia mieloide aguda.
LMMC:	Leucemia mielomonocítica crónica
MBD:	“Methyl-CpG-binding domain proteins”.
MLH1:	homólogo 1 de mutL.
MLL:	“mixed lineage leukaemia “
NCOA2:	Coactivador 2 del receptor nuclear.
NUT:	proteínas nucleares en el testículo.
PHD:	“plan homeodomain (PHD) fingers”
PcG:	“Polycomb”.
RB:	retinoblastoma.
SET:	Dominio “Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax”.
SMD:	Síndrome mielodisplásico.
SWI/SNF:	“Switching defective/sucrose nonfermenting”.
TET:	“Ten-eleven traslocation”.
TSS:	Sitio de inicio de la transcripción.
VHL:	Supresor del tumor de von Hippel-Lindau.
5-mc:	5- metilcitosina.
5-hmc:	5-hidroximetilcitosina.

GLOSARIO

Acetilación: reacción que introduce un grupo acetilo en un compuesto orgánico. La deacetilación consiste en la eliminación del grupo acetilo. La acetilación es una modificación postraducciona de las histonas y otras proteínas como tubulinas o p53.

Bromodominios: dominios proteicos responsables del reconocimiento en histonas de residuos de lisina acetilados, mediando, de este modo, el efecto de la acetilación de las histonas en la transcripción génica.

Cromatina: complejo de DNA y proteínas que compone los cromosomas. La cromatina empaqueta el DNA para adaptarlo al interior del núcleo, permite la mitosis y la meiosis, y controla la expresión génica. La estructura de la cromatina está afectada por la metilación del DNA y las modificaciones de las histonas (modificaciones epigenéticas).

DNA metiltransferasas: familia de enzimas que cataliza la transferencia del grupo metilo al DNA, usando S-adenosilmetionina.

Drogas epigenéticas: fármacos que inhiben o activan proteínas relacionadas con los aspectos epigenéticos asociados a enfermedades con el objetivo de mejorar, curar o prevenir dichas enfermedades.

Epigenética: modificaciones de la cromatina que no afectan a la secuencia de nucleótidos. Estas modificaciones producen cambios en los patrones de expresión génica que pueden heredarse a través de la división celular.

Epigenoma: estado epigenético global de la célula.

Histona: principal proteína de la cromatina. El núcleo de histonas (H2A, H2B, H3, y H4) se ensambla para formar el nucleosoma. Cada nucleosoma se forma por el enrollamiento de unos 146 bp de DNA en torno al núcleo de histonas. La histona de unión H1 fija el DNA a su sitio adecuado y permite así la formación de una estructura de orden superior.

Hidroximetilación del DNA: modificación de la 5-metilcitosina mediante la oxidación del grupo metilo a hidroximetilo y dando lugar a 5-hidroximetilcitosina.

Islas CpG: Regiones en el DNA que contienen numerosos nucleótidos de citosina y guanina adyacentes. La “p” que aparece en CpG hace referencia al enlace fosfodiéster entre la citosina y la guanina. Estas islas son abundantes los promotores de los genes.

Metilación del DNA: adición de un grupo metilo al DNA en el carbono situado en posición 5 en el anillo de citosina que precede a la guanina.

Writers, Erasers y Readers: *Writers:* proteínas que tienen la capacidad de modificar covalentemente el DNA o las histonas y, por lo tanto, generar marcas epigenéticas. *Erasers:* proteínas encargadas de eliminar las marcas epigenéticas. *Readers:* proteínas encargadas de reconocer y unirse a la cromatina modificada con el objetivo de mediar el efecto de las marcas epigenéticas en la transcripción génica.

1. INTRODUCCIÓN

La epigenética hace referencia a cambios heredables en los patrones de expresión génica que no dependen de cambios primarios en la secuencia de DNA. Mientras que el DNA contiene la información para dirigir todas las funciones celulares, la modulación epigenética actúa regulando el empaquetamiento del DNA para determinar los patrones de expresión génica. El control epigenético guía el destino en cuanto a tipo celular durante la embriogénesis, la renovación celular en el adulto y muchos otros procesos celulares [1]. Las modificaciones epigenéticas más importantes son: las modificaciones postraduccionales de las histonas como acetilación y metilación, que afectan tanto a la estructura global de la cromatina como a la activación o represión génica, la metilación del DNA en el dinucleótido CpG como mecanismo silenciador de la transcripción y el remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP, que cambian la estructura, composición y posición de los nucleosomas [2].

A pesar del creciente conocimiento sobre las bases moleculares del cáncer, el progreso en relación al tratamiento es aún insuficiente. La mayoría de los abordajes terapéuticos nuevos se centran en las anomalías genéticas. Recientemente, la secuenciación profunda de genomas en cáncer ha permitido determinar como objetivo mutaciones específicas, que pueden proporcionar respuestas iniciales adecuadas pero frecuentemente tienen una durabilidad corta con desarrollo de resistencias [1]. Hoy en día está aceptado que además de las alteraciones genéticas, la desregulación de mecanismos epigenéticos específicos juegan también un papel importante en la tumorigénesis [3]. Un ejemplo clave de alteración epigenética en cáncer es el silenciamiento anormal de genes supresores de tumores. Un indicador interesante de la importancia de las modificaciones epigenéticas es el hallazgo en prácticamente todos los tipos de cáncer, de mutaciones en genes que codifican muchas proteínas que regulan el epigenoma [1]. Estas incluyen mutaciones somáticas puntuales y traslocaciones en genes directamente involucrados en la metilación de residuos de citosina (TET2, IDH1/2), genes que codifican enzimas que modifican histonas (EZH2, MLL1-3, CREBBP, EP300), así como aquellos que forman parte de los complejos remodeladores de cromatina (SNF5, BRG1)[4, 5]. Descifrar las consecuencias de estos cambios genéticos constituye un objetivo fundamental en la investigación del cáncer [1]. El gran potencial de las terapias epigenéticas recae en el hecho de que, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones genéticas, los cambios epigenéticos son reversibles, permitiendo recuperar la función de los genes afectados cuyas secuencias de DNA normales. Estas terapias van dirigidas a reprogramar las células cancerosas hacia un estado más normal. Los rápidos avances en el conocimiento de la regulación del epigenoma están conduciendo al desarrollo de numerosas drogas epigenéticas [1].

En este trabajo se recogen los avances más actuales sobre la epigenética en cáncer. En primer lugar se hace referencia a la estructura de la cromatina y las principales modificaciones epigenéticas, a continuación se describen las alteraciones epigenéticas más frecuentes en cáncer y, finalmente, las terapias epigenéticas para el tratamiento del cáncer.

2. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

En este apartado se hace un breve repaso a la estructura de la cromatina y los diferentes grados de condensación (figura 1).

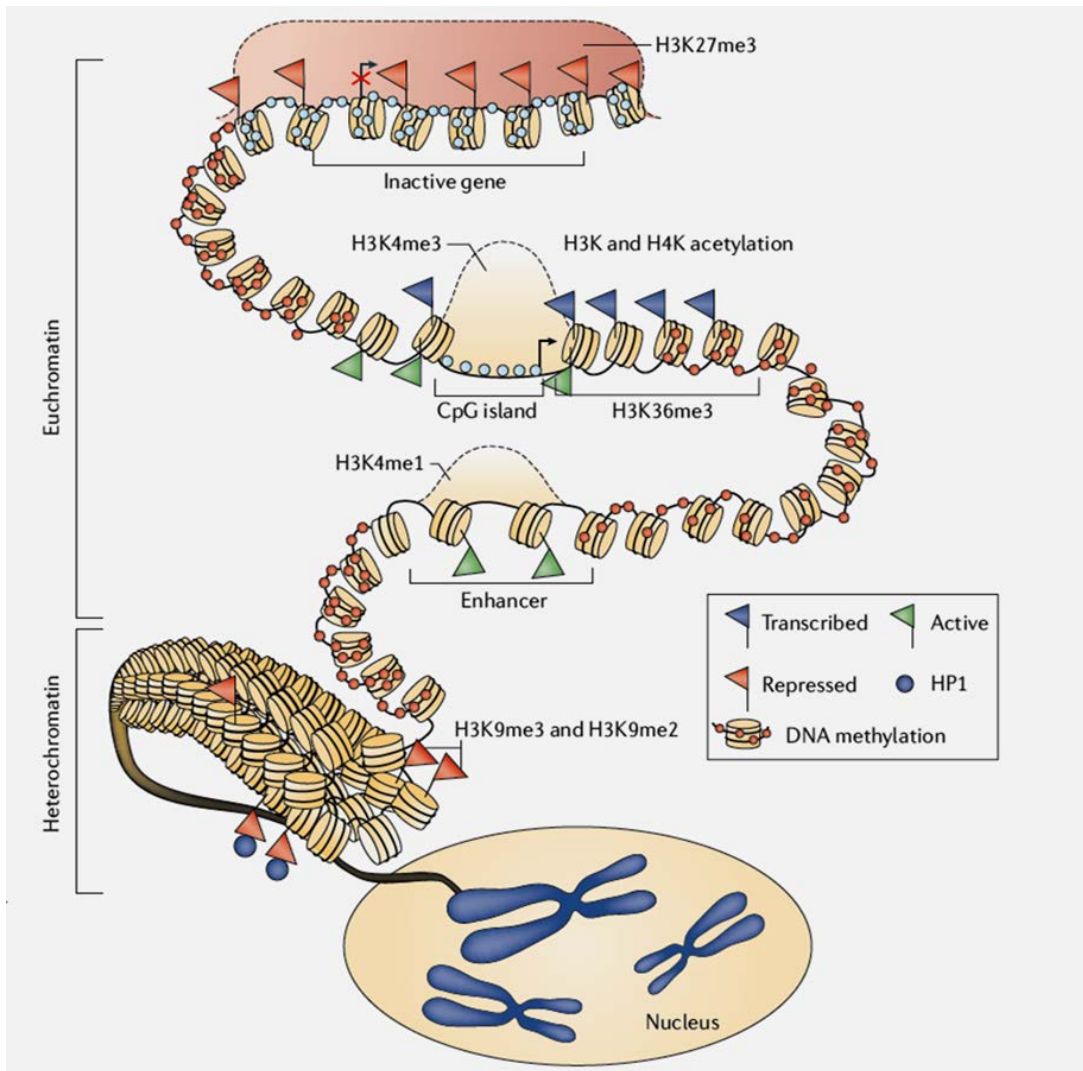


Figura 1. Modelo de la estructura global del epigenoma en la célula normal. Se muestran diferentes estados de la cromatina: la eucromatina, parcialmente descondensada y la heterocromatina, fuertemente compactada. Las diferentes marcas epigenéticas que determinan estos estados se describen a lo largo del trabajo [26].

2.1 LOS NUCLEOSOMAS Y NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA

El DNA se encuentra en el núcleo fuertemente empaquetado formando la cromatina. La compactación de unos 2 m de DNA en un núcleo de 10 μm de diámetro se consigue mediante la formación de complejos de DNA con proteínas específicas de carácter básico denominadas histonas. Esta unión del DNA a las histonas da lugar a la formación del nucleosoma que constituye la unidad estructural de la cromatina. Para su formación, se produce el enrollamiento de 147 pares de bases de DNA dando 1,65 vueltas en torno a un octámero de histonas [2]. Las histonas nucleosomales forman dímeros H2A-H2B y H3-H4 que interaccionan entre sí formando el octámero. Las histonas constan de una hélice- α larga central, flanqueada por 2 hélices- α cortas y un dominio N-terminal poco estructurado denominado “colas de histonas” (figura 2). Este dominio es flexible y sale fuera del núcleo central nucleosoma. Las colas de las histonas sufren diversas modificaciones postraduccionales que afectan a la estructura y función de la cromatina.

Existen diferentes niveles en el empaquetamiento del DNA (figuras 1y 2). Primero el DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas para formar el nucleosoma y, unas 20-60 bp forman un DNA espaciador antes del siguiente complejo nucleosómico. A su vez, los nucleosomas forman un solenoide helicoidal (fibra de 30 nm). Cada vuelta del solenoide incluye aproximadamente seis nucleosomas. Los solenoides se organizan en lazos o bucles de cromatina que están unidos a un esqueleto proteico. Cada uno de estos bucles contiene alrededor de 100000 pares de bases (100 kb) de DNA (fibras de 60 nm-a 130 nm). El resultado final de este enrollamiento y de la formación de bucles es que el DNA, cuando está en su máximo estado de condensación, sólo tiene la diezmilésima parte de la longitud que tendría si estuviera totalmente estirado [6]. Esta asociación también permite el control de la transcripción afectando a sus distintas etapas, desde la unión de los activadores para dar lugar al complejo de preiniciación, hasta la elongación.

El posicionamiento y el número de los nucleosomas juegan también un papel clave en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, la presencia de un nucleosoma en el inicio de la transcripción suele observarse en genes inactivos, mientras que la pérdida de un nucleosoma directamente por encima del punto de inicio de la transcripción resulta en activación génica (figura 1). Esto se debe a que altera el acceso de complejos y factores de transcripción. Se ha demostrado que un número elevado de nucleosomas en el promotor de un gen se asocia con silenciamiento génico.

2.2 HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA

El grado de condensación de la cromatina varía en función de la fase del ciclo celular [7]. En el núcleo interfásico de los organismos eucariotas superiores existen dos tipos de cromatina: una forma que se encuentra altamente condensada, la heterocromatina, y otra menos condensada denominada eucromatina (figuras 1 y 2).

La heterocromatina se encuentra en diferentes regiones del genoma, sin embargo su presencia es más frecuente en zonas específicas como son los centrómeros y los telómeros, caracterizados por contener secuencia de DNA repetitivo [6]. En la interfase, las células no están en período de división y la mayor parte de la cromatina se encuentra en forma de eucromatina, una forma de cromatina muy descondensada que se extiende por todo el núcleo. En este período del ciclo celular los genes son transcritos y el DNA replicado en preparación para la división celular. La mayor parte de la eucromatina en interfase se encuentra en forma fibra de 30-nm, o algo más condensado, en forma fibras de 60-nm a 130-nm. Los genes que son activamente transcritos se encuentran en un estado más descondensado que hace al DNA accesible a la maquinaria de transcripción (figuras 1 y 2).

Cuando las células entran en mitosis, sus cromosomas se condensan para poder ser distribuidos entre las células hijas [7]. La heterocromatina permite la separación de las cromátidas durante la mitosis y además, protege los extremos de los cromosomas. La heterocromatina es rica en secuencias transcripcionalmente silentes. Este silenciamiento génico está relacionado con un alto grado de metilación y bajo grado de acetilación de determinados residuos localizados en histonas como son: histona H3 en las lisinas 9 o 27 (H3K9, H3K27) o histona H4 en la lisina 20 (H4K20), tal como se explica en el apartado siguiente. En la eucromatina, sin embargo, esto no es tan estricto y los genes pueden ser activados o seguir inactivos (figura 1). Asimismo la eucromatina puede ser desempaquetada con el fin de llevar a cabo procesos de replicación o de reparación. Dentro de las modificaciones típicas de la eucromatina están: la acetilación de las histonas H3 y H4, la di- o tri-metilación de H3K4 (figura 1). Estas modificaciones van a alterar el grado de organización de la cromatina [2].

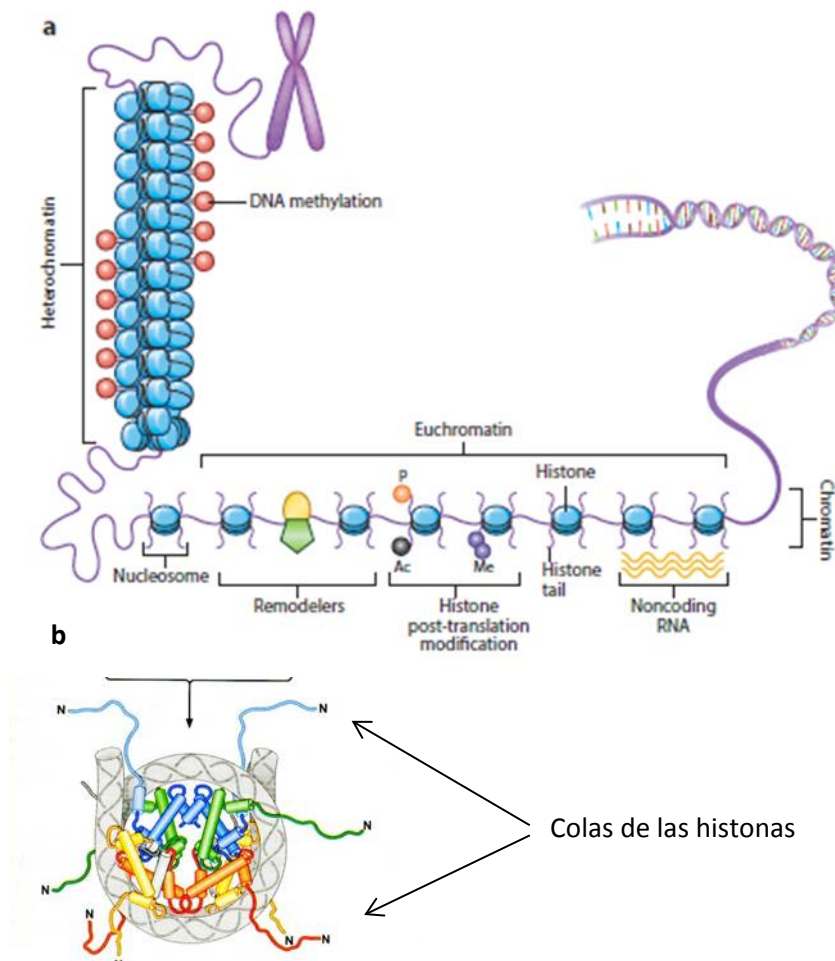


Figura 2. Heterocromatina y eucromatina [1]. a) Los estados de la cromatina van a determinar la activación de la transcripción o el silenciamiento de los genes, permitiendo cambiar estos estados mediante el posicionamiento de los nucleosomas (óvalos azules). Las conformaciones más abiertas dejan el sitio de inicio de la transcripción libre. Las modificaciones de las colas de las histonas (líneas moradas que se extienden desde los óvalos) regulan el proceso, incluyendo la metilación del DNA (círculos rojos), fosforilación de serinas (círculo naranja), acetilación de lisinas (círculo negro) y metilación de lisinas (círculo morado), y complejos remodeladores de nucleosomas (pentágono verde con óvalo amarillo). Además, los RNAs no codificantes (líneas amarillas) pueden participar en estos pasos reguladores. b) Representación del nucleosoma con las colas de las histonas (extremo N-terminal) sobresaliendo del mismo.

3. EL EPIGENOMA EN CÉLULAS NORMALES

Las modificaciones epigenéticas más importantes son: las modificaciones postraduccionales de las histonas como acetilación, metilación y otras que afectan tanto a la estructura global de la cromatina como a la activación o represión génica, la metilación del DNA en el dinucleótido CpG y el remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP.

3.1 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

Se conocen al menos 16 modificaciones de histonas. Como resultado de esta diversidad y de las distintas combinaciones que se pueden realizar, existe un gran potencial de respuestas funcionales (tabla 1). La combinación de las diferentes modificaciones sufridas por las histonas da lugar al denominado “código de las histonas”. Este código va a ser descifrado por proteínas “reader” con dominios específicos de interacción. Estas proteínas van a actuar como efectores siendo responsables de la activación o represión de la transcripción, condensación cromosómica, etc.

Las modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas (figura 3) en ocasiones dan lugar a un cambio en la carga neta de los nucleosomas, afectando a las interacciones DNA-histona. Las modificaciones de las histonas tienen como resultado dos fenómenos: i) alteran la estructura de la cromatina mediante la modificación de interacciones no covalentes en los nucleosomas y entre estos (por ejemplo para “abrir” la cromatina en el caso la acetilación) y ii) interaccionan con proteínas o complejos proteicos efectores o transductores [2, 8]. Como consecuencia, estas modificaciones determinan el estado global de la cromatina y regulan procesos como transcripción, reparación o replicación del DNA.

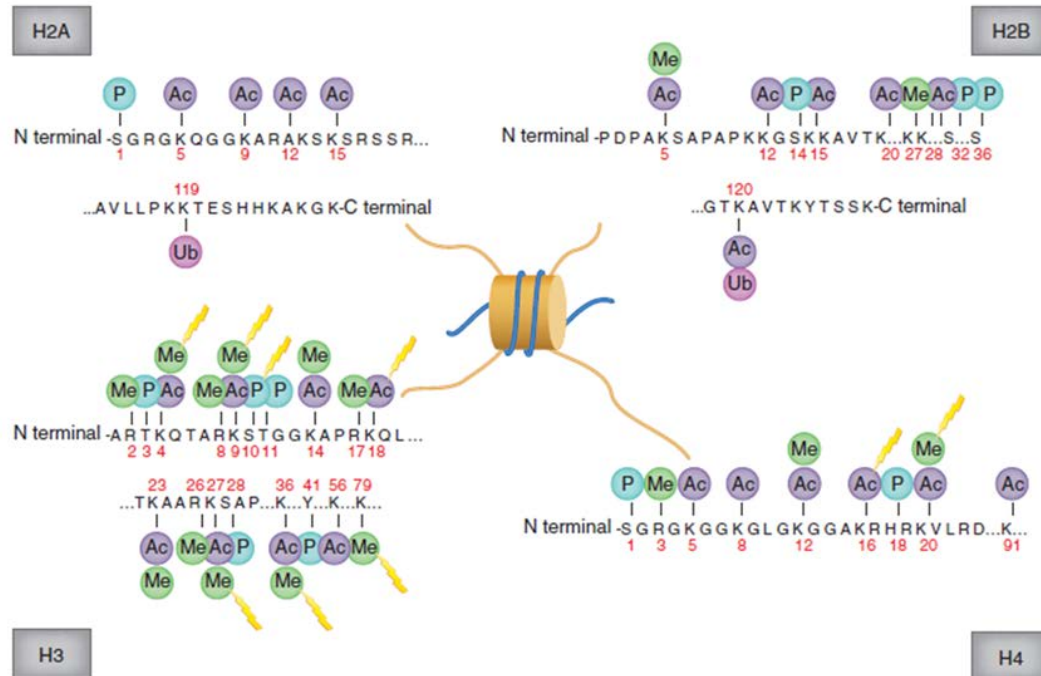


Figura 3. Patrones de modificación de las histonas. La figura muestra las principales modificaciones de las cuatro histonas del core en células normales (tipo y posición en la secuencia de aminoácidos). Además, y debido a su estrecha relación con el desarrollo de cáncer, se han resaltado las modificaciones de las histonas típicamente relacionadas con esta enfermedad (línea amarilla). Ac, acetilación; Me, metilación; P, fosforilación; Ub, ubiquitinación [20].

Las enzimas que dan lugar a las modificaciones de las histonas estableciendo “marcas epigenéticas” son comúnmente conocidas como “writers”, las enzimas encargadas de eliminar estas marcas son conocidas como “erasers” y finalmente, las proteínas que van a leer estas marcas epigenéticas se denominan “readers”. Estos “readers” se unen por medio de dominios específicos como los bromodominios capaces de reconocer residuos de lisina acetilados o los cromodominios, que reconocen residuos metilados (figura 4). Por ejemplo, la metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me2) está implicada en el silenciamiento génico como consecuencia de la unión al promotor de la proteína HP1 que contiene cromodominios que reconocen el residuo H3K9 metilado [8, 9] (ver también figura 1). Estos readers, por otra parte, atraen a su vez a modificadores de la cromatina adicionales y enzimas reguladoras que actúan como efectores de la cromatina que inician respuestas biológicas como la condensación cromosómica, la reparación del DNA o la activación y represión de la transcripción del DNA [8].

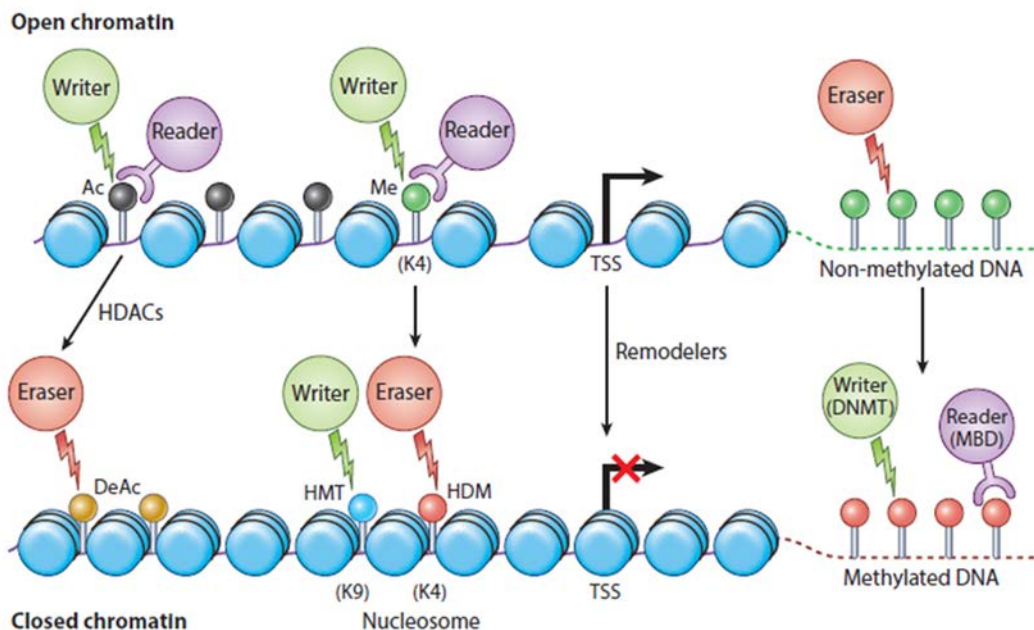


Figura 4. Los cuatro grupos de proteínas que regulan el epigenoma. En la conformación abierta del promotor (arriba) tenemos representados los «writers» (círculo verde), los «readers» (círculo morado) y los «erasers» (círculo rojo), y generalmente sin metilación del DNA en islas CpG (piruletas verdes). Los nucleosomas se encuentran en una conformación abierta en torno al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Los writers histona acetil transferasa (HAT) e histona metiltransferasas (HMTs) son enzimas que añaden el grupo acetilo (Ac) y metilo (Me) a las histonas. En el estado inactivo de la cromatina (abajo) las islas CpG de los promotores están metiladas y esto se asocia con una conformación más cerrada de los nucleosomas; las HDACs eliminan la acetilación de las histonas (piruletas doradas); writers (HMTs) que cambian las marcas activadoras de metilación de las histonas por otras represivas como H3K9me3 (piruleta azul) actuando HDMs como antagonistas de las HMTs; otros writers (DNMT) metilan las regiones CpG en los promotores (piruletas rojas) y readers de esta metilación que son proteínas de unión a la metil-citosina (MBDs) [1].

Tabla 1. Modificaciones de la cromatina, “readers” y sus funciones [8].

Table 1. Chromatin Modifications, Readers, and Their Function			
Chromatin Modification	Nomenclature	Chromatin-Reader Motif	Attributed Function
DNA Modifications			
5-methylcytosine	5mC	MBD domain	transcription
5-hydroxymethylcytosine	5hmC	unknown	transcription
5-formylcytosine	5fC	unknown	unknown
5-carboxylcytosine	5caC	unknown	unknown
Histone Modifications			
Acetylation	K-ac	Bromodomain/Tandem, PHD fingers	transcription, repair, replication, and condensation
Methylation (lysine)	K-me1, K-me2, K-me3	Chromodomain, Tudor domain, MBT domain, PWWP domain, PHD fingers, WD40/ β propeller	transcription and repair
Methylation (arginine)	R-me1, R-me2s, R-me2a	Tudor domain	transcription
Phosphorylation (serine and threonine)	S-ph, T-ph	14-3-3, BRCT	transcription, repair, and condensation
Phosphorylation (tyrosine)	Y-ph	SH2 ^a	transcription and repair
Ubiquitylation	K-ub	UIM, IUIM	transcription and repair
Sumoylation	K-su	SIM ^a	transcription and repair
ADP ribosylation	E-ar	Macro domain, PBZ domain	transcription and repair
Deimination	R $\rightarrow$ Cit	unknown	transcription and decondensation
Proline isomerisation	P-cis $\rightleftharpoons$ P-trans	unknown	transcription
Crotonylation	K-cr	unknown	transcription
Propionylation	K-pr	unknown	unknown
Butyrylation	K-bu	unknown	unknown
Formylation	K-fo	unknown	unknown
Hydroxylation	Y-oh	unknown	unknown
O-GlcNAcylation (serine and threonine)	S-GlcNAc; T-GlcNAc	unknown	transcription

Modifications: me1, monomethylation; me2, dimethylation; me3, trimethylation; me2s, symmetrical dimethylation; me2a, asymmetrical dimethylation; and Cit, citrulline. Reader domains: MBD, methyl-CpG-binding domain; PHD, plant homeodomain; MBT, malignant brain tumor domain; PWWP, proline-tryptophan-tryptophan-proline domain; BRCT, BRCA1 C terminus domain; UIM, ubiquitin interaction motif; IUIM, inverted ubiquitin interaction motif; SIM, sumo interaction motif; and PBZ, poly ADP-ribose binding zinc finger.

^aThese are established binding modules for the posttranslational modification; however, binding to modified histones has not been firmly established.

3.1.1 TIPOS DE MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS

3.1.1.1 ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS

Existen proteínas con actividad lisina acetil transferasa con un importante papel en la regulación génica. Estas proteínas acetilan las colas de las histonas en los grupos épsilon-amino de los residuos de lisina. Este proceso da lugar a la activación de la transcripción al neutralizar la carga positiva de las lisinas que tiene como resultado una reducción de la afinidad de las histonas por el DNA. Esto va a generar nucleosomas empaquetados de forma más débil favoreciendo el acceso de proteínas reguladoras.

El proceso de acetilación se lleva a cabo por varias Histona Acetil Transferasas (HATs). La mayoría de estas HATs se encuentran formando parte de complejos multiproteicos y se agrupan en distintas familias (GNAT, MYST, CREBBP/EP300 etc). Los miembros de la familia Gcn5/PCAF (GNAT) tienen el papel de coactivadores en el proceso de transcripción y contienen un dominio acetil-transferasa y un bromodominio para permitir su unión a los

residuos de lisina acetilados. De estas familias la que ha sido motivo de estudio con mayor profundidad ha sido la EP300/CREBBP que incluye miembros reguladores más globales de la transcripción. Están constituidas por un dominio HAT, un bromodominio y otras regiones implicadas en interacciones proteína-proteína. Varios miembros de esta familia se han visto alterados por translocaciones cromosómicas en diversos procesos malignos (ver más adelante, tabla 2).

Por otra parte, la deacetilación de las histonas va a dar lugar a una compactación de la cromatina inhibiendo la transcripción. Se han identificado al menos 18 genes de histona deacetilasas (HDAC) en el genoma humano [10]. Las histonas deacetilasas también se agrupan en familias:

- clase I: HDAC 1, 2, 3 y 8.
- clase II: HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10.
- clase IV: HDAC 11.
- clase III: NAD-dependiente de la familia SIRT (sir-tuinas).

Las HDAC de clase I se encuentran en el núcleo celular y son ubicuas. Tienen una gran similitud estructural y en su sitio activo contienen zinc que es fundamental para su actividad. Forman parte, junto con co-represores (NcoR, SMRT, MEF, MeCP2, Sin3A, etc) de complejos de represión. Como resultado del grado de actividad de las HAT y HDAC obtendremos diferentes grados de acetilación de las histonas y el equilibrio entre ambas actividades posibilita la regulación celular normal [2].

Además existen proteínas efectoras que contienen bromodominios que tienen como objetivo reconocer estas marcas de acetilación. Dichos bromodominios son módulos proteicos constituídos por una secuencia de 110 aminoácidos perteneciente a la familia BRD que están presentes en diversas proteínas asociadas al DNA, fundamentalmente en las acetil transferasas [11, 12]. El bromodominio se une a grupos de las lisinas de las histonas. Por lo tanto, las proteínas que contienen bromodominios actúan como “readers” de los residuos de lisina acetilados que atraen enzimas “writer” o “erasers” para regular la expresión génica. Dentro de los bromodominios, la subfamilia BET incluye las proteínas BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT que contienen dos bromodominios, uno en el extremo N-terminal y otro en el extremo C-terminal. Además presentan un dominio altamente forforilado, el SEED que interacciona con el dominio C terminal (CTD) de la RNA polimerasa II. BRD4 interacciona con P-TEFb (factor de elongación de la transcripción), una quinasa que fosforila el CTD de la RNA polimerasa II para facilitar la elongación de la transcripción (figura 5) [13]. La expresión aberrante de BRD4 o su traslocación se ha encontrado en diferentes tipos de tumores [10, 14]. Se han desarrollado fármacos inhibidores de la familia BET (figura 5), como se detallará más adelante.

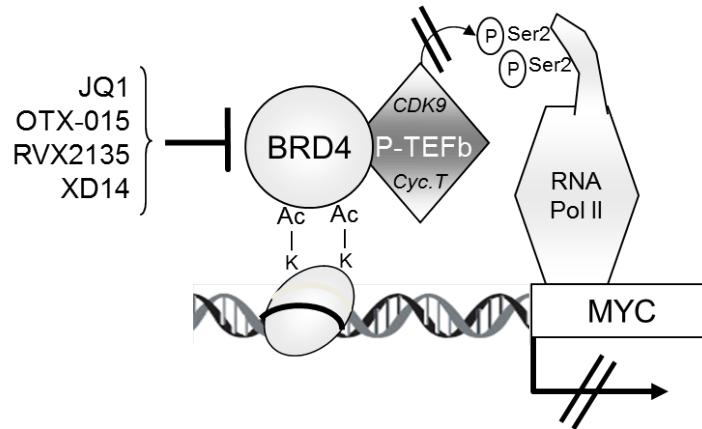


Figura 5. BRD4 es un reader de las histonas acetiladas y promueve la actividad del complejo TEFb, compuesto por CDK9 y ciclina T1. P-TEFb fosforila el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II para desencadenar la elongación. MYC podría ser uno de los genes cuya transcripción depende más de la actividad de BRD4 y P-TEFb (ver detalles en el apartado 5) [13].

3.1.1.2 METILACIÓN DE LAS HISTONAS

La metilación de las histonas tiene lugar en las cadenas laterales de lisinas y argininas de las proteínas [2, 15]. Las enzimas responsables de la metilación en residuos específicos se denominan Histona metil transferasas (HMTs) y se pueden agrupar en:

- Histona metil-transferasas específicas de lisina conteniendo el dominio SET: producen las metilaciones en las histonas H3 (residuos K4, K9, K27, K36) y H4 (K20).
- Lisina metil-transferasas sin dominio SET, que metilan a H3K79.
- Arginina metiltransferasas que metilan distintos residuos de arginina en las histonas H3 y H4.

La metilación en residuos de lisina tiene lugar por enzimas con actividad lisinahistona-metil-transferasa principalmente en las histonas H3 y H4. Las lisinas pueden ser mono, di o tri-metilada generando respuestas diferentes. Esta respuesta puede ser activadora o represora de la expresión. Los lugares implicados en la activación son: H3K4, H3K36 y H3K79. Por otra parte, la metilación de tres residuos de histona: H3K9, H3K27 y H4K20 se ha relacionado con represión transcripcional [2]. La homeostasis de la metilación de las histonas se mantiene por la actividad antagonista de los “writers” y los “erasers” de la metilación que son los encargados de establecer las marcas de metilación y de eliminarlas respectivamente [14] (figura 4).

Por ejemplo, la metilación H3K4 es establecida por SET1 y la familia MLL “mixed lineage leukaemia” de metiltransferasas, y eliminada por la histona demetilasa LSD1 y la

familia JARID1 “jumonji AT-rich interactive domain 1”. En el caso de la histona H3, la metilación aparece en múltiples residuos de lisina incluyéndose entre estos H3K4, K9, K27, K36 y K79 y la adición ascendente de grupos metilo en cada lisina da lugar a un total de cuatro estados de metilación: no metilado, monometilado, dimetilado o trimetilado. Estos estados de metilación muestran una distribución diferente a lo largo del genoma. La trimetilación H3K4me3 se encuentra fuertemente relacionado con la activación transcripcional, observándose su mayor presencia en la proximidad de los promotores de genes con alto grado de expresión (figura 1), mientras que la trimetilación H3K27me3 está frecuentemente asociada a silenciamiento génico, especialmente a la represión de programas de diferenciación no deseados durante el proceso de especialización [5, 15] (figura 1).

La actividad alterada de las lisina metiltransferasas puede contribuir a los patrones de metilación alterados en cáncer, como se explicará más adelante. Por ejemplo, la metilación de las lisinas en la histona H3K9 y H3K27 están normalmente presentes en regiones de la cromatina transcripcionalmente inactivas o zonas de heterocromatina y además, pueden encontrarse en genes que están reprimidos en cáncer de forma aberrante (ver apartado 4) [14, 16].

La marca de metilación H3K4me3 podría ser una señal crucial en la maquinaria de la cromatina, permitiendo que regiones específicas sean reconocidas por los “readers” y/o los efectores asociados. Por ejemplo, la preferencia de TFIID por H3K4me3 a nivel de los promotores se ha sugerido como una forma de ayuda para la unión de TFIID y asociación de la maquinaria para el inicio de la transcripción. Un avance reciente ha sido el descubrimiento de unos readers llamados “plan homeodomain (PHD) fingers” que leen específicamente la H3K4 trimetilada y dimetilada (H3K4me3/2). Aunque muchas PHD se encuentran codificadas en el genoma humano, sólo un subgrupo contiene los residuos aromáticos e hidrofóbicos que son capaces de formar una estructura especializada que se una a H3K4me3. Estos “readers” de las histonas modificadas están implicados en los procesos celulares normales y en oncogénesis [15]. Existen evidencias de que la desregulación en la lectura de H3K4me3 contribuye a la transformación celular y la tumorigénesis. Esto ocurre, por ejemplo, en la leucemia mieloide aguda que es inducida por una traslocación en el dominio PHD finger de PHF23 o JARID1A [15].

A modo de resumen, las principales marcas activadoras y represivas de la cromatina son:

Marcas activadoras	Marcas represivas
H3 y H4 acetilada	H3K9me2/3
H3K4me1/2/3	H3K27me2/3
H3K36me3	H4K20me3

3.2 METILACIÓN DEL DNA

Las enzimas encargadas de la metilación del DNA son las pertenecientes a distintas familias de DNA metiltransferasas (DNMTs) formando 5'-metil-citosina. La metilación se hereda tras la división celular debido a que las DNMTs copian el patrón de metilación de la hebra parental en una hebra hija del DNA durante la fase S [17]. Existen tres DNA metiltransferasas principales:

- DNMT1 cumple una función de mantenimiento de la metilación ya que reconoce DNA hemimetilado generado durante la replicación y posteriormente metila nuevos dinucleótidos CpG, cuyos patrones ya están metilados en la hebra parental.
- DNMT3a y DNMT3b, aunque también son capaces de metilar DNA hemimetilado, actúan primariamente como DNA metiltransferasas de novo para establecer la metilación del DNA durante la embriogénesis [8, 17].

Esta modificación tiene lugar en la posición 5' del anillo de citosina incluido en el dinucleótido CpG. Los dinucleótidos CpG no están distribuidos de forma aleatoria por el genoma humano. Las regiones CpG están concentradas en las denominadas islas CpG, regiones cortas del DNA ricas en CpG localizadas en aproximadamente el 60% de los promotores humanos (figura 6) o en regiones largas de secuencias repetitivas como por ejemplo, centrómeros o retrotrasposones. Aunque en el último caso, la mayor parte de las islas CpG están metiladas para evitar la inestabilidad cromosómica, la mayoría de ellas se han mantenido sin modificaciones durante el desarrollo y la diferenciación de los tejidos.

Las islas CpG de muchos genes están normalmente sin metilar en células normales. Esto se corresponde con la cualidad de los genes con promotores con islas CpG de ser transcritos cuando están presentes los activadores de la transcripción necesarios. En las células cancerosas, el silenciamiento de genes supresores de tumores mediante la hipermetilación de las islas CpG de sus promotores es clave en el proceso de tumorigénesis (figura 6).

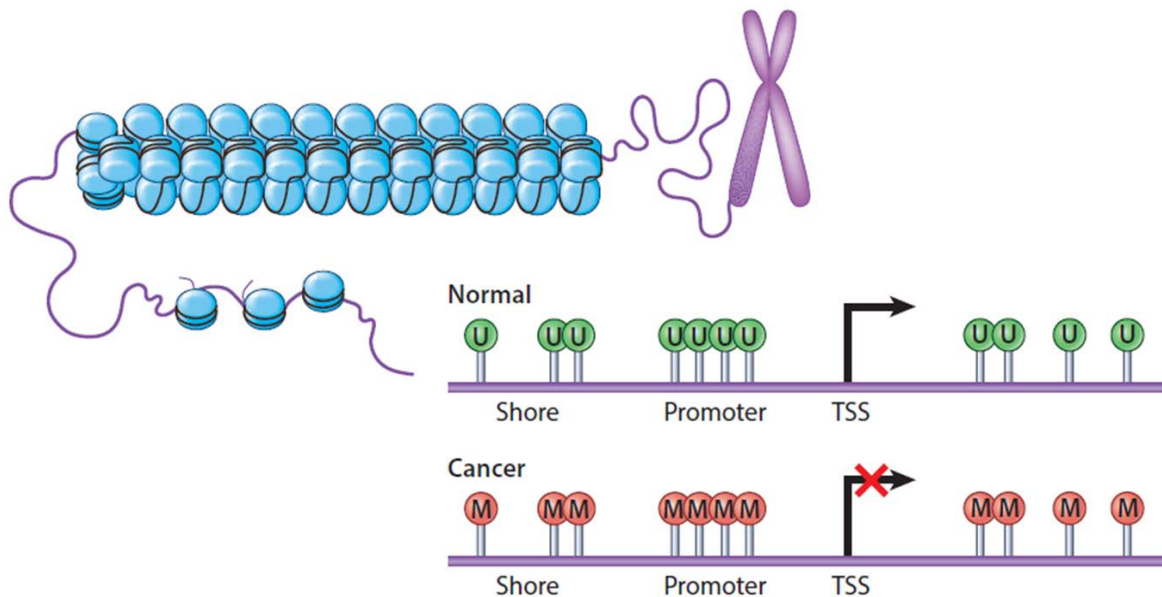


Figura 6. Cambios producidos por la metilación del DNA. Los promotores de las islas CpG en células normales (arriba) generalmente carecen de metilación de DNA en las regiones CpG (círculos verdes). En cáncer (abajo), muchos genes sufren metilación del DNA en las regiones CpG de los promotores, con la consecuente represión de la cromatina y silenciamiento génico anormal (círculos rojos) [1].

La metilación del DNA y las modificaciones de las histonas están relacionadas, ya que hay proteínas de unión al DNA metilado (Methyl-CpG-binding domain proteins, MBD) que atraen a complejos histona deacetilasa e histona metiltransferasas hacia la cromatina. La metilación del DNA proporciona una plataforma para diversas proteínas de unión a regiones metiladas. Entre ellas se incluyen las proteínas “readers” MBD1, MBD2, MBD3 y MeCP2. Estas proteínas tienen como función atraer enzimas modificadoras de histonas para coordinar los diversos procesos que tendrán lugar a nivel de la cromatina [8].

Las islas CpG no metiladas de los promotores son hipersensibles a DNAsas y están relativamente libres de nucleosomas, mientras que las metiladas contienen nucleosomas y son resistentes a las nucleasas (figura 1). Existen, además de los mencionados, dos procesos que son dependientes de la metilación del DNA, la inactivación del cromosoma X y la impronta génica (que permite que solo el alelo materno o paterno de un gen se exprese) [2].

3.2.1 HIDROXIMETILACIÓN DEL DNA

Las enzimas TET1, TET2 y TET3, pertenecientes a la familia de enzimas TET (“ten-eleven traslocation”), son responsables de la oxidación de 5mc a 5hmc (figura 7). Bajo una actividad local moderada de las enzimas TET, 5hmc puede mantenerse como una marca epigenética estable. En contraste con el efecto represor de la metilación del DNA en los residuos de citosina, 5hmc está relacionado con activación de la transcripción, probablemente porque esto da lugar a un diferente patrón de proteínas de unión al presentado por 5mc [18, 19].

Las proteínas TET son DNA hidroxilasas con actividad catalítica de la conversión del grupo metilo en la posición 5 de la citosina del DNA (5-metilcitosina (5mc)) por 5-hidroximetilcitosina (5-hmc) en una reacción que requiere Fe(II) y α -cetoglutarato como sustratos. A continuación, esta familia de enzimas lleva a cabo oxidaciones repetitivas de 5-hmc a 5-formylcytosine (5fC) para luego general 5-carboxylcytosine (5caC) (figura 7). Estos derivados de la oxidación 5mC pueden actuar como intermediarios en la metilación del DNA de manera activa o pasiva. Además podría afectar a la actividad de diferentes proteínas MBD y así modificar su reclutamiento durante la regulación de la cromatina, o por otra parte, tener efectos directos en la transcripción. El mapeo genómico de 5hmc en células embrionarias ha permitido observar que 5hmC está distribuido en los sitios de inicio de la transcripción y en el cuerpo del gen. Además está más presente en exones que en intrones [19, 20].

5hmc podría jugar un papel importante en la progresión del cáncer y en el desarrollo de metástasis, ya que se ha observado que los niveles de 5hmc se encuentran disminuidos en diferentes tipos de tumores (ver más adelante). Hasta el momento se creía que los niveles significativos de 5hmc solo se podían encontrar en las células embrionarios de mamíferos y en el tejido nervioso (0.2% y 1% del total de citosinas respectivamente). Sin embargo, se ha descubierto que 5hmc puede constituir hasta el 1% del total de citosinas en el hígado del adulto [18].

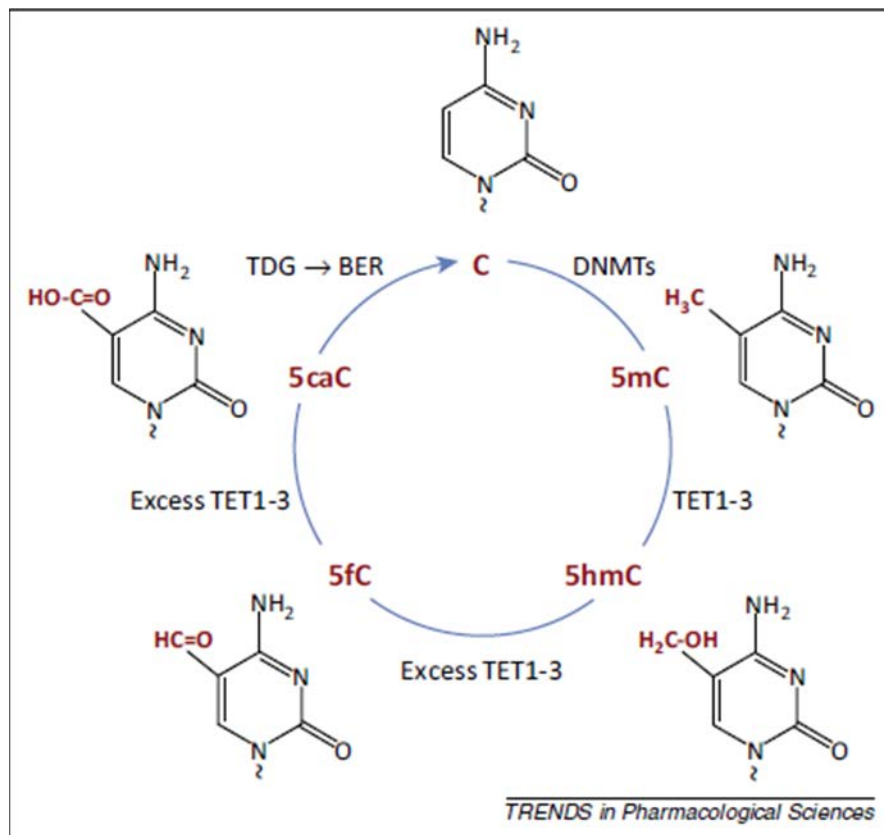


Figura 7. Ciclo de modificación de la citosina. La citosina es metilada mediante la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a la posición C5 de la citosina, generando 5-metilcitosina (5mC). Este proceso es catalizado por las DNA metiltransferasas, las cuales en el mamífero incluye metiltransferasas de novo y de mantenimiento (DNMT1). Después de esto, 5mC puede ser oxidada a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) por las enzimas TET1, TET2, y TET3. Una actividad de TET excesiva puede promover demasiada oxidación de 5hmC a 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). El grupo carboxilo es reconocido y eliminado por la timina-DNA glicosilasa, y la resultante región abásica es regenerada por la vía reparadora de excisión de bases, generando citosina no modificada. Por lo tanto, la abundancia de 5hmc depende del equilibrio entre las actividades enzimáticas de DNMT y TET en un locus dado [18].

3.3 REMODELADORES DE LA CROMATINA

La posición de los nucleosomas constituye un aspecto clave en la expresión génica y se conoce desde hace un tiempo que los responsables de regular ese proceso son los remodeladores de la cromatina [10, 21].

Los complejos remodeladores de la cromatina desplazan a los nucleosomas, permitiendo la unión de factores de transcripción y el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción [8, 22] (figura 8). Las modificaciones covalentes en el nucleosoma frecuentemente proporcionan el andamiaje y contexto para la remodelación de la cromatina ATP-dependiente. Basándonos en su actividad bioquímica y su composición, los complejos remodeladores de la cromatina en mamíferos pueden dividirse en líneas generales en cuatro grandes familias:

- SWI/SNF “switching defective/sucrose nonfermenting”
- ISWI “imitation SWI”
- Mi2/NuRD “complejo de acetilasa remodelador de nucleosomas”
- INO80 “moduladores regulados por inositol”

Estas enzimas están conservadas a lo largo de la evolución y usan ATP como fuente de energía para movilizar, desalojar e intercambiar histonas [8, 10]. Además actúan en el contexto de complejos con múltiples subunidades y cumplen un papel como activadores y como represores de la expresión génica [10]. Aunque los dominios ATPasa son muy similares, los diferentes dominios de unión a la cromatina les confieren especificidad. Estos complejos contienen miembros con dominios de lectura de la cromatina (dominios SANT, bromodominios, y cromodominios) que confieren especificidad regional y contextual a sus actividades de remodelado de la cromatina [8, 10]. Varios miembros de los complejos remodeladores de la cromatina se encuentran mutados o alterados en cáncer (apartado 4.3.).

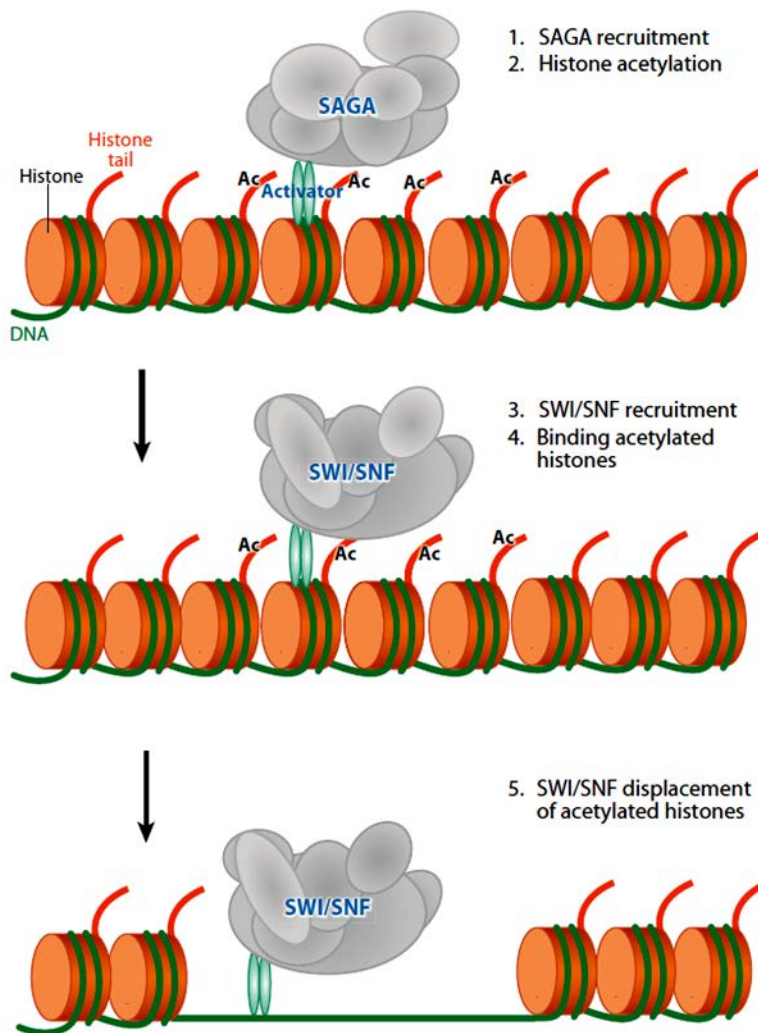


Figura 8. Desarrollo de región libre de nucleosomas a través de la acetilación secuencial de histonas (Ac) y su desplazamiento por complejos remodeladores de la cromatina. Arriba: activadores de la transcripción con secuencias específicas de unión al DNA atraen a las histonas acetiltransferasas SAGA hacia genes donde SAGA acetila una zona de nucleosomas en la región del promotor. Los mismos activadores pueden atraer al complejo remodelador de nucleosomas SWI/SNF al mismo punto. Centro: el bromodominio situado en las subunidades Swi2/Snf2 reconoce a las histonas acetiladas y se une a ellas. Abajo: SWI/SNF utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para desplazar del DNA a las histonas acetiladas y así dar lugar a una región libre de nucleosomas [22].

4. EL EPIGENOMA EN CÁNCER

La desregulación de la expresión génica es una de las principales características de las células cancerosas. Las alteraciones epigenéticas y genéticas colaboran en el inicio y progresión de tumores, como muestran las frecuentes mutaciones en genes que codifican proteínas que regulan el epigenoma [1] (Tabla 2). Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones epigenéticas en cáncer pueden resultar en la activación de oncogenes, silenciamiento de genes supresores de tumores y finalmente en la capacidad de proliferar descontroladamente. Las principales modificaciones epigenéticas responsables de estas alteraciones son: hipometilación global del DNA, hipermetilación de las islas CpG de los promotores y patrones alterados de las modificaciones de las histonas [23]. Los avances en el conocimiento de cómo estas alteraciones tienen lugar durante la tumorigénesis, permitirá el desarrollo y mejora de fármacos cuya diana sean factores responsables de estos cambios, así como el desarrollo de métodos para el diagnóstico de diversas neoplasias [2, 16].

Tabla 2. Modificadores epigenéticos en cáncer [10].

	Gene	Function	Tumor Type	Alteration
DNA methylation	<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase	Colorectal, non-small cell lung, pancreatic, gastric, breast cancer	Mutation (Kanai et al., 2003) Overexpression (Wu et al., 2007)
	<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferase	MDS, AML	Mutation (Ley et al., 2010; Yamashita et al., 2010; Yan et al., 2011)
	<i>DNMT3B</i>	DNA methyltransferase	ICF syndrome, SNPs in breast and lung adenoma	Mutation (Wijmenga et al., 2000) Mutation (Shen et al., 2002)
	<i>MBD1/2</i>	Methyl binding protein	Lung and breast cancer	Mutation (Sansom et al., 2007)
	<i>TET1</i>	5-methylcytosine hydroxylase	AML	Chromosome translocation (De Carvalho et al., 2010; Wu and Zhang, 2010)
	<i>TET2</i>	5-methylcytosine hydroxylase	MDS, myeloid malignancies (AML), gliomas	Mutation/silencing (Tan and Manley, 2009)
	<i>IDH1/2</i>	Isocitrate dehydrogenase	Glioma, AML	Mutation (Figuerola et al., 2010; Lu et al., 2012; Turcan et al., 2012)
	<i>AID</i>	5'cytidine deaminase	CML	Aberrant expression (De Carvalho et al., 2010)
Histone modification	<i>MLL1/2/3</i>	Histone methyltransferase H3K4	Bladder TCC, ALL and AML, non-Hodgkin lymphoma, B cell lymphoma, prostate (primary)	Translocation, mutation, aberrant expression (Gui et al., 2011; Morin et al., 2011)
	<i>BRD4</i>	Bromodomain containing 4	Nuclear protein in testis, midline carcinoma, breast, colon, and AML	Translocation (fusion protein), aberrant expression (Filippakopoulos et al., 2010; Zuber et al., 2011)
	<i>EZH2</i>	Histone methyltransferase H3K27	Breast, prostate, bladder, colon, pancreas, liver, gastric, uterine tumors, melanoma, lymphoma, myeloma, and Ewing's sarcoma	Mutation, aberrant expression (Chase and Cross, 2011; Tsang and Cheng, 2011)
	<i>ASXL</i>	Enhancer of trithorax and polycomb group (EAP) Additional sex combs like 1	MDS and AML, Bohring-Opitz syndrome	Mutation (Gelsi-Boyer et al., 2012; Hoischen et al., 2011)
	<i>BM1-1</i>	PRC1 subunit	Ovarian, mantle cell lymphomas and Merkel cell carcinomas	Overexpression (Jiang et al., 2009; Lukacs et al., 2010)
	<i>G9a</i>	Histone methyltransferase H3K9	HCC, cervical, uterine, ovarian, and breast cancer	Aberrant expression (Varier and Timmers, 2011)
	<i>PRMT1/5</i>	Protein arginine methyltransferase	Breast/gastric	Aberrant expression (Miremad et al., 2007)
	<i>LSD1</i>	Histone demethylase H3K4/H3K9	Prostate	Mutation (Rotili and Mai, 2011)
	<i>UTX (KDM6A)</i>	Histone demethylase H3K27	Bladder, breast, kidney, lung, pancreas, esophagus, colon, uterus, brain	Mutation (Rotili and Mai, 2011)
	<i>JARID1B/C</i>	Histone demethylase H3K4/H3K9	Testicular and breast, RCCC	Overexpression (Rotili and Mai, 2011)
	<i>EP300</i>	Histone deacetyltransferase	Breast, colorectal, pancreatic cancer	Mutation (Miremad et al., 2007)
	<i>CREBBP</i>	Histone acetyltransferase	Gastric and colorectal, epithelial, ovarian, lung, esophageal cancer	Mutation, overexpression (Miremad et al., 2007)
	<i>PCAF</i>	Histone acetyltransferase	Epithelial	Mutation (Miremad et al., 2007)
	<i>HDAC2</i>	Histone deacetyltransferase	Colonic, gastric, endometrial cancer	Mutation (Flopero et al., 2006)
	<i>SIRT1, HDAC5/7A</i>	Histone deacetyltransferase	Breast, colorectal, prostate cancer	Mutation, aberrant expression (Miremad et al., 2007)

Table 1. Continued

	Gene	Function	Tumor Type	Alteration
Chromatin remodeling	<i>SNF5</i> (<i>SMARCB1</i> , <i>INI1</i>)	BAF subunit	Kidney malignant rhabdoid tumors, atypical rhabdoid/teratoid tumors (extra-renal), epithelioid sarcomas, small cell hepatoblastomas, extraskeletal myxoid chondrosarcomas, and undifferentiated sarcomas	Mutation, silencing, loss of expression (Wilson and Roberts, 2011)
	<i>BRG1</i> (<i>SMARCA4</i>)	ATPase of BAF	Lung, rhabdoid, medulloblastoma	Mutation, low expression (Wilson and Roberts, 2011)
	<i>BRM</i> (<i>SMARCA2</i>)	ATPase of BAF	Prostate, basal cell carcinoma	Mutation, low expression (de Zwaan and Haass, 2010; Sun et al., 2007)
	<i>ARID1A</i> (<i>BAF250A</i>)	BAF subunit	Ovarian clear cell carcinomas, 30% of endometrioid carcinomas, endometrial carcinomas	Mutation, genomic rearrangement, low expression (Guan et al., 2011; Jones et al., 2010)
	<i>ARID2</i> (<i>BAF200</i>)	PBAF subunit	Primary pancreatic adenocarcinomas	Mutation (Li et al., 2011)
	<i>BRD7</i>	PBAF subunit	Bladder TCC	Mutation (Drost et al., 2010)
	<i>PBRM1</i> (<i>BAF180</i>)	PBAF subunit	Breast tumors	Mutation (Varela et al., 2011)
	<i>SRAP</i>	ATPase of SWR1	Prostate	Aberrant expression (Balakrishnan et al., 2007)
	<i>P400/Tip60</i>	ATPase of SWR1, acetylase of SWR1	Colon, lymphomas, head-and-neck, breast	Mutation, aberrant expression (Mattera et al., 2009)
	<i>CHD4/5</i>	ATPase of NURD	Colorectal and gastric cancer, ovarian, prostate, neuroblastoma	Mutation (Bagchi et al., 2007; Kim et al., 2011; Wang et al., 2011a)
	<i>CHD7</i>	ATP-dependent helicase	Gastric and colorectal	Mutation (Wessels et al., 2010)

MDS, myelodysplastic syndromes; AML, acute myeloid leukemia; TCC, transitional cell carcinoma; RCCC, renal clear cell carcinoma.

4.1 METILACIÓN DEL DNA Y CÁNCER

En cáncer la metilación del DNA está alterada severamente. Existe tanto una hipometilación generalizada del DNA, como ganancias focales en islas CpG de promotores que normalmente se encontrarían no metiladas. La hipermetilación de islas CpG se asocia con silenciamiento anormal de genes supresores de tumores [1]. La metilación de las islas CpG juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción génica y se altera comúnmente durante la transformación maligna. Reponer el patrón normal de metilación del DNA, especialmente a nivel de los promotores es uno de los principales objetivos de la terapia en cáncer [1].

Un ejemplo clave de alteración epigenética en cáncer es el silenciamiento anormal de genes supresores de tumores no-mutados, como alternativa a las mutaciones genéticas para la pérdida efectiva de la función génica. De hecho, la alteración epigenética más reconocida en cáncer es la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de genes supresores de tumores tales como CDKN2A/p16 y CDKN2B/p15 (inhibidor 2A γ B de quinasas dependientes de ciclina), RB (retinoblastoma); MLH1 (homólogo 1 de mutL), BRCA1 (cáncer de mama 1), implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA y muchos otros procesos [1, 20].

Las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) han proporcionado mapas genómicos de la metilación CpG. Estos han confirmado que entre un 5%-10% de las islas CpG de los promotores que en condiciones normales no se encuentran metiladas se

encuentran anormalmente metiladas en el genoma de varios cánceres. Además se ha visto que la hipermetilación de las islas CpG en los promotores no sólo afecta a la expresión de genes codificantes de proteínas, sino también a la expresión de varios RNAs no codificantes, algunos de los cuales tienen un papel en la transformación maligna [8]. Cabe resaltar también que estos estudios sobre el metiloma del DNA, han descubierto alteraciones en la metilación del DNA en el cuerpo del gen y en las regiones circundantes de las islas CpG (shores) (ver figura 6). La relevancia funcional de estas alteraciones regionales en metilación está por descifrar completamente pero es interesante resaltar que han desafiado el dogma general sobre la metilación del DNA y el silenciamiento génico. De hecho, estos estudios han establecido que muchos genes que se transcriben activamente tienen altos niveles de metilación del DNA a nivel del cuerpo del gen, sugiriendo que la distribución de los patrones de metilación del DNA a nivel del cuerpo del gen es fundamental para la regulación de la transcripción. Un estudio reciente, que compara cáncer colorrectal con su equivalente no neoplásico, sugiere también la existencia de importantes cambios a nivel de las regiones circundantes a las islas CpG [8].

Entender las consecuencias de la metilación del DNA normal y aberrante constituye un área clave de interés, especialmente porque los agentes que actúan como hipometiladores son una de las terapias epigenéticas que ha sido aprobada por la FDA para su uso clínico rutinario (ver más adelante, apartado terapia epigenética) [8].

Finalmente, la hipometilación aberrante del DNA puede también contribuir a la activación de algunos proto-oncogenes y lleva a la pérdida de la “impronta génica” como ocurre en el caso del gen IGF2 (codifica el factor de crecimiento insulínico tipo 2) en el tumor de Wilms.

4.1.1 MUTACIONES EN DNMT3A

Como se ha mencionado anteriormente, se han identificado tres DNA metiltransferasas (DNMTs) en eucariotas superiores. DNMT1 que mantiene los patrones de metilación del DNA tras la replicación y DNMT3A y DNMT3B que se tratan de enzimas de novo que tienen como diana dinucleótidos CpG previamente no metilados [2].

Aunque se sabe que las mutaciones en las DNA metiltransferasas y en las proteínas de unión al DNA metilado (MBD) contribuyen al desarrollo de anormalidades presentes en cáncer (figura 8), hemos sido conscientes de estas mutaciones en genes clave recientemente. Por ejemplo, la reciente secuenciación de genomas en cáncer ha permitido identificar mutaciones en DNMT3A en hasta el 25% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). El porcentaje de mutaciones en DNMT3A varía según el subtipo de LMA, observándose el más alto entre los casos de linaje monocítico (M4, M5) [17]. Cabe resaltar que estas mutaciones son heterocigóticas y su función es alterar la actividad catalítica del enzima. Además su presencia confiere peor pronóstico y disminución de la supervivencia global. La mayoría de las mutaciones de DNMT3A en LMA son mutaciones missense heterocigóticas en el residuo R882 dentro del dominio catalítico, más frecuentemente consistiendo en un cambio de una histidina por una arginina.

Muchas de estas mutaciones producirán haploinsuficiencia de DNMT3A, con alteraciones no significativas en la metilación del DNA. Los mecanismos por los cuales estas mutaciones contribuyen al desarrollo y/o mantenimiento de la LMA están aún por esclarecer completamente [4].

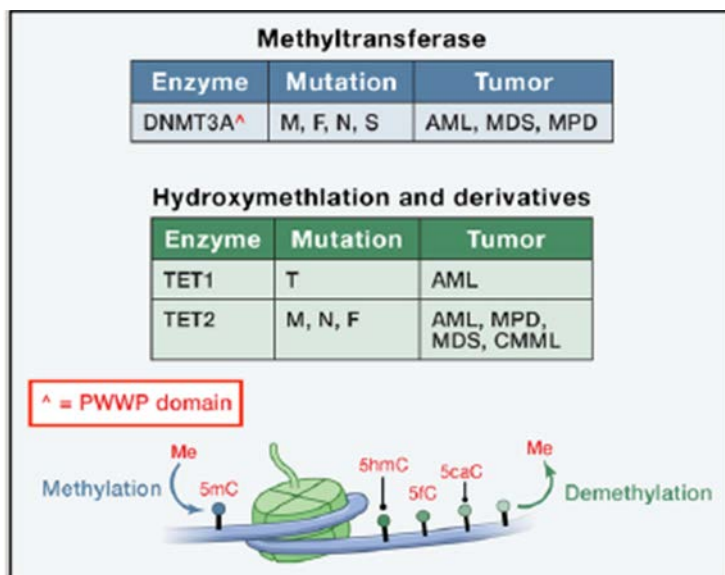


Figura 9. Mutaciones en cáncer que afectan a reguladores de la metilación del DNA [8].

4.1.2 MUTACIONES EN TET

La familia TET (ten-eleven traslocation) consiste en tres proteínas (TET1-3) y ha sido nombrada tras el descubrimiento de la traslocación t(10;11)(q22;q23) en un subconjunto de pacientes con LMA que presentaban TET1 traslocado con MLL1 (figura 9) [4].

La conversión de 5-mc a 5-hmc podría estar también implicada en cáncer, dado que la fusión MLL-TET1 se ha observado en algunos casos de LMA y leucemias linfocíticas. Además, mutaciones anuladoras homocigóticas y deleciones cromosómicas involucrando al locus TET2 se han descrito en varias neoplasias mieloides [20].

En paralelo con los estudios que inicialmente describieron la actividad catalítica de la familia TET, se encontraron mutaciones en TET2 en el 8-23% de los pacientes con neoplasias hematopoyéticas mieloides malignas. Las mutaciones en TET2 están presentes especialmente en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) donde aparecen en el 50% de los pacientes y en LMA citogenéticamente normal donde la frecuencia de mutaciones en TET2 es de 18-23%. Debido a la elevada frecuencia y la importancia clínica de las mutaciones de TET2 en las neoplasias mieloides, se han estudiado los niveles globales y en puntos concretos de 5hmc. A pesar de que diversos estudios han demostrado una

disminución de los niveles globales de 5hmC en pacientes con neoplasias mieloides malignas que presentan mutaciones en TET2, no existen evidencias concluyentes con respecto a los niveles de 5mC en puntos específicos. El efecto de las mutaciones de TET2 en 5mC, 5hmC y la relación de estas bases modificadas con la transcripción génica son un tema importante de investigación [4].

4.2 MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS Y CÁNCER

El establecimiento y el funcionamiento anormal de la metilación del DNA está relacionado con las modificaciones de las histonas en la regulación de la arquitectura de la cromatina. Como se ha mencionado anteriormente la estructura de la cromatina está controlada por proteínas “writers”, “readers” y “erasers” que regulan la acetilación y metilación de residuos de lisina, la metilación de lisinas y argininas y la fosforilación de serinas y treoninas (figura 4). Como ocurre con la metilación del DNA, estas modificaciones de las histonas facilitan a las células mantener una “memoria” de los patrones de expresión génica fundamentales para el adecuado desarrollo embrionario y el correcto equilibrio de los procesos de autorenovación celular y diferenciación en los tejidos adultos [16]. La alteración de los patrones normales de las modificaciones covalentes de las histonas es, también, otro sello de cáncer. Uno de los ejemplos más característicos es la reducción global de la trimetilación de H4K20 (H4K20me3) y la acetilación de H4K16 (H4K16Ac), junto con la hipometilación del DNA en secuencias repetidas en diversos tipos de tumores. Además existen muchos ejemplos de alteraciones/mutaciones en enzimas que añaden, eliminan o reconocen marcas epigenéticas específicas, en muchos tipos diferentes de cáncer [20] (figuras 10 y 11).

Tal como se ha explicado en el apartado 3.1, las modificaciones de las histonas, especialmente la acetilación y metilación de residuos de lisina, facilitan los estados activos frente a los represivos con respecto a la expresión génica. La acetilación de las lisinas, especialmente en los puntos de inicio del gen, está generalmente asociado a una transcripción génica activa y la deacetilación con la represión génica [16]. El estado deacetilado está especialmente relacionado, bien por sí sólo o acompañado de metilación del DNA, con genes anormalmente silenciados en cáncer. Revertir esa deacetilación con inhibidores de la acetilación de las histonas (HDACis) es un objetivo terapéutico que discutiremos en apartados posteriores.

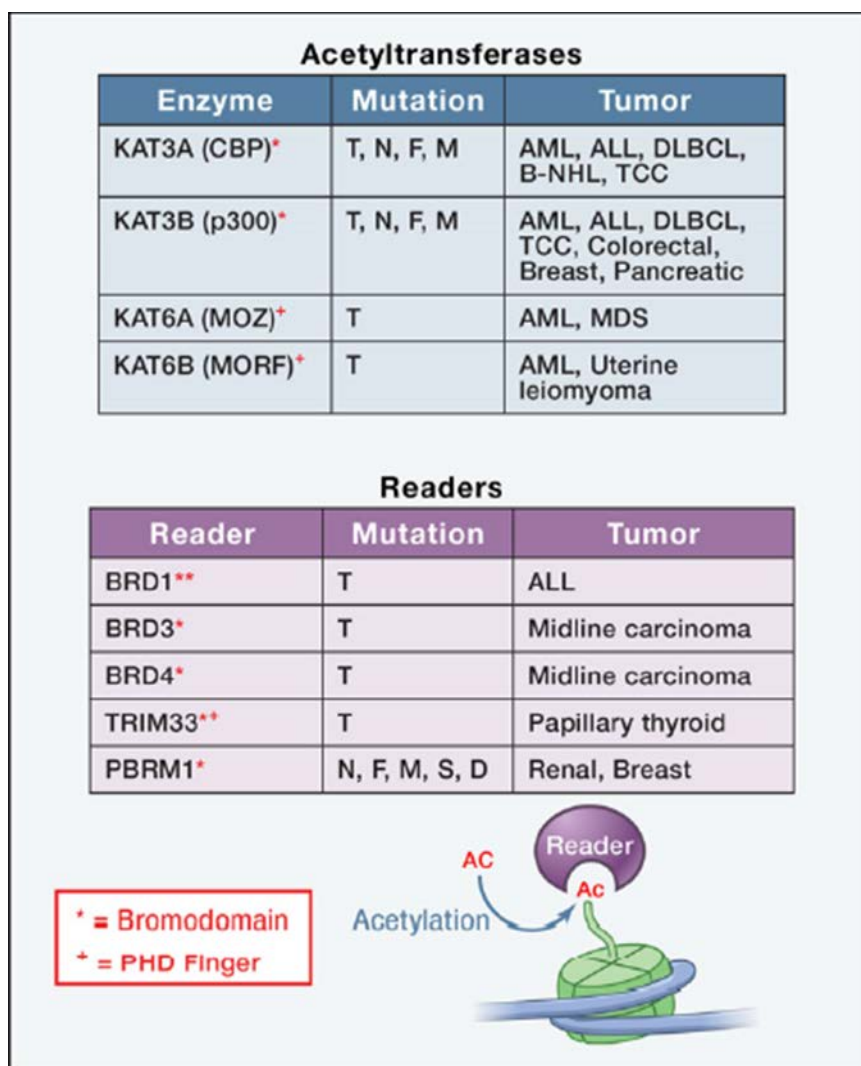


Figura 10. Mutaciones en cáncer que afectan a reguladores de la acetilación de histonas [8].

En relación con la acetilación anormal de las histonas en cáncer, se han identificado traslocaciones que afectan a proteínas con actividad histona lisil transferasa (KATs) como la proteína p300 de unión a E1A (EP300), proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREBBP o CBP), coactivador 2 del receptor nuclear (NCOA2), MYST3 y MYST4, principalmente en neoplasias hematológicas. En tumores sólidos y hematológicos, la unión de las oncoproteínas adenovirales E1A y SV40 a EP300 y CREBBP lleva a la transformación celular a través de la hipoacetilación de H3K18 y a la concomitante activación de genes que conducen al crecimiento y división celular. Finalmente, el cáncer colorectal, gástrico, mamario y pancreático muestran mutaciones missense de EP300 (figura 10).

Por otra parte, la sobreexpresión de histona deacetilasas (HDACs) como HDAC1, HDAC2 y HDAC6, entre otras, ha sido descrita también en tumores. Pero el papel de HDAC2 en la promoción tumoral es controvertido, así como la pérdida de su expresión, dado que las mutaciones truncantes han sido también documentadas en un subconjunto de líneas celulares colorrectales con inestabilidad de microsatélites y en muestras de tumores primarios. Las sirtuinas también se encuentran sobreexpresadas en una gran variedad de tumores. Curiosamente la inhibición de SIRT1 reactivaba parcialmente supresores de tumores, incluso cuando sus promotores se encontraban metilados de forma importante [20].

En cuanto a la metilación de las histonas, como hemos mencionado con anterioridad, el efecto represor o activador dependerá del residuo implicado en la modificación (4). La expresión o actividad anómala de histona metil transferasas (HMTs) e histona demetiladas (HDMs) debido a traslocaciones cromosómicas, deleciones, amplificaciones, sobreexpresión o silenciamiento, han sido también documentados en cáncer [20] (figura 11).

Por ejemplo, las histonas H3K9 y H3K27 metiladas están normalmente presentes en zonas transcripcionalmente inactivas o regiones heterocromáticas pero también en genes que están aberrantemente reprimidos en cáncer [16]. Estas marcas, van a ser interpretadas por el complejo de proteínas Polycomb (PcG), las cuales no son únicamente importantes en embriogénesis sino también en carcinogénesis, ya que se ha observado que dos de los complejos represivos PcG (PRC1 y PRC2) están implicados en varios cánceres [1, 16]. La enzima EZH2, un componente de PRC2 con actividad metiltransferasa sobre la histona H3K27, es el “writer” de H3K27me3 y está aumentada o mutada en diversos cánceres. Además, puede ser mutada como un evento oncogénico que desencadene la tumorigénesis mediante el aumento de la autorenovación de las células madre [1]. RING1, un componente de PRC1 que colabora en la ubiquitilación de la histona H2A en el residuo de lisina 119, está sobreexpresado en cáncer de próstata [1, 16]. EZH2, está sobreexpresada en tumores sólidos como el de próstata, mama, colon, piel y pulmón. Característicamente el aumento de la expresión de EZH2 endotelial promueve la angiogénesis mediante el silenciamiento del gen codificante del vasoinhibidor 1, al menos en cáncer ovárico. Aunque su función oncogénica ha sido el foco de atención, descubrimientos recientes han mostrado también mutaciones inactivadoras de EZH2 en linfomas foliculares y difusos de células B [20, 24]. Existen fármacos inhibidores de EZH2 cuya eficacia está siendo ensayada en tumores (ver apartado 5 terapia epigenética).

La metiltransferasa MLL, responsable de la metilación de H3K4, está involucrada en traslocaciones que llevan a la expresión inapropiada de varios genes “homeóticos” (Hox) que contribuyen a la progresión en leucemias [16]. En el caso del gen MLL1, el más minuciosamente estudiado, su duplicación en tándem (MLL-PTD) y más de 50 tipos de translocaciones están presentes en el 80% de las leucemias infantiles y el 5-10% de las LMA del adulto y leucemias linfocíticas [14, 24] (figura 11). Muchas de las fusiones con MLL parecen activar genes inductores de leucemias mediante el reclutamiento anormal de DOT1L, la HMT para H3K79. Actualmente se están ensayando inhibidores de DOT1L (ver apartado 5). SMYD, otra HMT H3K4, está frecuentemente sobreexpresada en líneas celulares de carcinoma colorrectal y hepatocelular, donde promueve el crecimiento y transformación celular [5, 20].

Methyltransferases		
Enzyme	Mutation	Tumor
KMT2A (MLL1 ^{***})	T, PTD	AML, ALL, TCC
KMT2B (MLL2 ^{**})	N, F, M	Medulloblastoma, Renal, DLBCL, FL
KMT2C (MLL3 ^{**})	N	Medulloblastoma, TCC, Breast
KMT3A (SETD2)	N, F, S, M	Renal, Breast
KMT3B (NSD1 ^{**^})	T	AML
NSD2 ^{**^}	T	Multiple myeloma
NSD3 [^]	T	AML
KMT6 (EZH2)	M	DLBCL, MPD, MDS

Readers		
Reader	Mutation	Tumor
TRIM33 ^{**}	T	Papillary thyroid
ING1 [*]	M, D	Melanoma, Breast
ING4 [*]	D	HNSCC
MSH6 [^]	M, N, F, S	Colorectal

Demethylases		
Enzyme	Mutation	Tumor
KDM5A (JARID1A) [^]	T	AML
KDM5C (JARID1C) [^]	N, F, S	Renal
KDM6A (UTX)	D, N, F, S	AML, TCC, Renal, Oesophageal, Multiple myeloma

^{*} = Bromodomain
^{**} = PHD Finger
[^] = PWWP domain

Figura 11. Mutaciones en cáncer que afectan a modificadores de la metilación de las histonas [8].

La demetilación de las histonas es importante en la regulación transcripcional. La metilación de residuos de lisina en las histonas ha sido considerada como una marca estabilizadora. Sin embargo, el descubrimiento de LSD1, una demetilasa de la histona H3K4 mono- y dimetilada, demostró que estas marcas de cromatina son reversibles. Se han descubierto diversas histonas lisin-demetilasas alteradas en cáncer como LSD1 y las proteínas con el dominio Jumonji C que pueden específicamente demetilar lisinas mono-, di- y trimetiladas [5] (ver Tabla 2).

Se ha observado que las histonas demetilasas cumplen un papel importante en la progresión del cáncer, como demuestran los niveles elevados de JMJD2A, JMJD2B, y JMJD2C, en cáncer de próstata. Curiosamente se ha encontrado asociación de LSD1 con HDACs, por lo tanto, los inhibidores de HDAC pueden potencialmente afectar la función de las demetilasas. Actualmente, las histonas demetilasas descubiertas demetilan tanto marcas activas como inactivas, de ese modo, funcionan como co-represores y co-activadores. La inhibición terapéutica de demetilasas específicas puede ser una posible dirección para el tratamiento del cáncer, aunque, existe aún mucho por investigar sobre las funciones precisas y las asociaciones de las histonas demetilasas [16].

Además de todo lo mencionado con anterioridad, existen otras enzimas modificadoras involucradas en cáncer. La proteína receptor nuclear con unión a dominio SET 1, una HMT para H3K36 y, en menor grado, para H4K20, está implicada en traslocaciones leucemogénicas y silenciado por hipermetilación del promotor en gliomas y neuroblastomas [20].

4.3 REMODELADORES DE LA CROMATINA Y CÁNCER

Se ha observado que diversos miembros de varias familias de remodeladores de la cromatina, como es el caso de SNF5, BRG1 y ARID1A se encuentran mutados en neoplasias (figura 12), y puede ser que actúen como supresores tumorales. Se han obtenido evidencias de esto mediante la secuenciación de genomas en cáncer. La prevalencia de estas mutaciones sugiere que muchos de los miembros de estos complejos están involucrados en el desarrollo y mantenimiento del cáncer. Sin embargo, su implicación desde una perspectiva funcional dentro de los mecanismos de oncogénesis está aún emergiendo [10, 21].

Estas investigaciones han mostrado la existencia de mutaciones en diversos miembros del complejo SWI/SNF en una variedad de neoplasias hematológicas y sólidas [24] (Figura 12). Los complejos SWI/SNF tienen diversas subunidades específicas de linaje que interactúan con factores de transcripción específicos de tejido para regular la diferenciación. También presentan una relación recíproca y antagonista con los complejos polycomb [8]. SWI/SNF es un gran complejo con unas 12 subunidades incluyendo las ATPasas (BRG1 o BRM), las subunidades nucleares (SNF5, BAF155, y BAF170) y otras subunidades accesorias [10]. La subunidad SNF5 se encuentra en el punto de conexión

entre el remodelado de la cromatina y la tumorigénesis. Numerosos tumores teratoideos presentan una inactivación de este gen [24]. La pérdida de SNF5 también se observa en carcinomas renales y melanomas, donde está relacionado con pobre tasas de supervivencia. La pérdida de SNF5 afecta a la expresión de genes asociados con la proliferación celular y el ciclo celular, como RB o p53 y a la vía de Hedgehog-Gli, una vía de señalización clave en el desarrollo temprano de cáncer. También se ha apreciado el antagonismo entre EZH2 y SNF5 durante la tumorigénesis [10]. Una posibilidad, todavía por establecer formalmente, consiste en que las mutaciones en miembros de SWI/SNF potencian la malignización mediante la alteración del balance entre autorenovación y diferenciación. Además de todo esto, existen datos recientes que sugieren un papel de los complejos SWI/SNF en la regulación de la progresión del ciclo celular, la movilidad celular y la señalización hormonal nuclear.

Las mutaciones en las subunidades ATPasa de SWI/SNF, BRG1 o BRM parecen estar implicadas en diversos cánceres entre los que se encuentran el cáncer de pulmón, el meduloblastoma, tumor rabdoide y tumor prostático. A partir de modelos en ratones se han obtenido evidencias genéticas que confirman que la expresión alterada de estos presuntos supresores tumorales puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer. En el caso de BRG1, incluso una haploinsuficiencia puede derivar en un aumento de tumores. Sin embargo, no existen evidencias que demuestren la implicación de un remodelado de la cromatina alterado como consecuencia de una unión aberrante a la cromatina o una pérdida de la actividad de la ATPasa [8].

SWI/SNF		
Gene	Mutation	Tumor
BRG1*	N, M, F, D	Lung, Rhabdoid, Medulloblastoma, Breast, Prostate, Pancreas, HNSCC
BRM*	N, M, F	HNSCC
ARID1A	N, F, M, T	OCC, Endometroid, Renal, Gastric, Breast, Medulloblastoma, TCC
ARID1B	F, M, D	Breast
ARID2	N, F, S	Hepatocellular carcinoma
SNF5	D, N, F, S, T	Rhabdoid, Familial Schwannomatosis, Chondrosarcoma, Epethioloid sarcoma, Meningioma, Chordoma, Undifferentiated sarcoma
PBRM1*	N, F, M, S, D	Renal, Breast
BCL7A	T, M	B-NHL, Multiple myeloma
BAF60A	M	Breast

* = Bromodomain

Chromatin remodeling

Figura 12. Mutaciones en cáncer que afectan a remodeladores de la cromatina [8].

Se han observado con frecuencia mutaciones en ARID1A/BAF250a en carcinoma ovárico de células claras y en el carcinoma endometrial. Más recientemente, también se han identificado estas mutaciones en adenocarcinoma pancreático primario y en carcinoma de células transicionales y además se ha hallado una relación entre baja expresión de ARID1A y un subgrupo específico de cáncer de mama (ER-/PR-/HER2-) [10].

Las subunidades PBRM1/BAF180, BAF200 y BRD7 pertenecen al factor asociado al polycomb BRG1 y facilitan la activación transcripcional mediante receptores nucleares. Se han identificado mutaciones de PBRM1/BAF180 en 41% de carcinomas renales y en cáncer de mama y afecta además a la senescencia en células humanas. Por otra parte se ha descrito la existencia de mutaciones en otra subunidad específica de PBAF, BRD7, en cáncer de mama. Dado que BRD7 interacciona con proteínas como p53 y BRCA1, sus mutaciones podrían ser importantes en tumorigénesis. La aparición de mutaciones en BAF es frecuente en varios cánceres, sin embargo, la relación exacta entre la mutación, la subunidad y el resultado de dicha mutación no está del todo clara. Además de esto, las mutaciones en los componentes del complejo BAF suelen coexistir con mutaciones en oncogenes o supresores de tumores como KRAS, CDKN2A, o p53 sugiriendo un sinergismo en el proceso de tumorigénesis [21].

5. TERAPIA EPIGENÉTICA DE CÁNCER

Hoy en día, está totalmente aceptado que las vías epigenéticas tienen un papel importante en la tumorigénesis, tal como hemos venido describiendo [3]. Investigaciones sobre los elementos fundamentales de la regulación epigenética están contribuyendo progresivamente al conocimiento sobre terapias epigenéticas en cáncer. Las terapias epigenéticas actuales incluyen principalmente a los inhibidores de la demetilación del DNA y la deacetilación de las histonas así como a nuevos agentes (resumidos en la figura 13). La utilización como diana terapéutica de las alteraciones epigenéticas parece ser prometedor en determinados tipos de cánceres principalmente en neoplasias hematológicas. Además, los fármacos epigenéticos están siendo ensayados en tumores sólidos [1, 3].

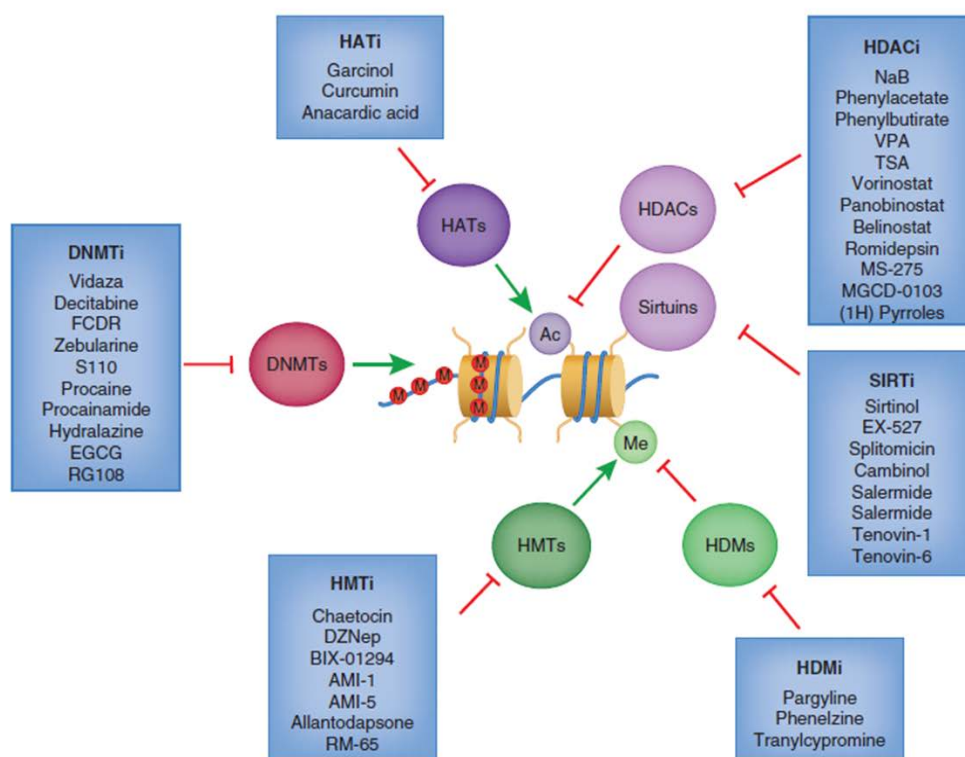


Figura 13. Tratamiento de cáncer mediante la inhibición de elementos de la maquinaria epigenética. Esta figura muestra los fármacos epigenéticos más importantes clasificándolos de acuerdo a su diana terapéutica [20].

5.1 INHIBIDORES DE LAS DNA METILTRANSFERASA

Como se ha mencionado anteriormente, las DNA metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B catalizan la transferencia de un grupo metilo desde el donante de grupos metilo S-adenosilmetionina (SAM) al C-5 de citosina en el DNA [25]. Las drogas demetilantes del DNA son formas modificadas de la citidina que se incorporan al DNA en replicación y se unen covalente a los sitios catalíticos de las tres DNMTs biológicamente activas.

Los inhibidores de las DNA metiltransferasas inhiben irreversiblemente la actividad enzimática de las DNMTs y provocan su degradación en el proteasoma. Existen en la actualidad tres análogos de citidina que están clínicamente disponibles y/o en ensayo clínico para varios tipos de cánceres (figura 14). 5-azacitidina (5AC, Vidaza®) (sintetizado por primera vez en 1964) y decitabina (DAC, Dacogen®) han estado en ensayo clínico durante varios años [1]. En la actualidad, se encuentran en uso clínico y la administración de estas drogas, incluso en pacientes con mal pronóstico, mejora su calidad de vida y aumenta su supervivencia (tasa de respuesta entre 30 y 60%) [3]. Aunque estructuralmente son similares, la azacitidina podría ser algo menos específica y tener más efectos pleiotrópicos debido a su capacidad de afectar varios sistemas de procesamiento del RNA incluyendo la transcripción ribosomal. Más recientemente se ha observado que la azacitidina también parece inhibir la ribonucleótido reductasa [25].

Un componente nuevo, SGI-110, que combina 5-aza-2'-deoxicitidina con guanosina en una sola molécula, esencialmente funciona como una prodroga de DAC, proporcionando una vida media más larga y resistencia a la degradación por la citidina deaminasa. SGI-110 resulta prometedor para tanto el SMD como LMA y está actualmente en fase III de ensayo clínico para estas enfermedades [1]. Resulta interesante el hecho de que SGI-110 ha demostrado tener también una potencial actividad inmunomoduladora con la capacidad de aumentar la expresión de antígenos HLA clase I asociados a tumores. La combinación de inhibidores de la DNMT como SGI-110 con inmunoterapia podría proporcionar otra forma de actuar contra las células cancerosas [25].

Todos los inhibidores mencionados pueden reactivar la expresión de genes implicados en cáncer silenciados por hipermetilación de las islas CpG del promotor.

Los DNMTs fueron sintetizados como agentes potencialmente citotóxicos a finales de los años 60 e inicialmente resultaron tan tóxicos que su eficacia terapéutica no pudo ser asumida. La utilización de dosis más reducidas en los años 90 mostró eficacia para el tratamiento del SMD, llegando a ser aprobado por la FDA para este fin. Estas dosis reducidas podrían comportarse como una verdadera terapia epigenética mediante la reprogramación de las células cancerosas. Dosis nanomolares de 5AC y DAC pueden disminuir a largo plazo las propiedades tumorigénicas de las células de tumores hematopoyéticos y sólidos virtualmente todas las vías de señalización clave que dirigen iniciación y progresión del cáncer [1]. Además la combinación de inhibidores de la DNMT y

la histona deacetilasa (HDAC) podría ofrecer resultados terapéuticos en NSCLC avanzado y otros tumores (ver más adelante)[3].

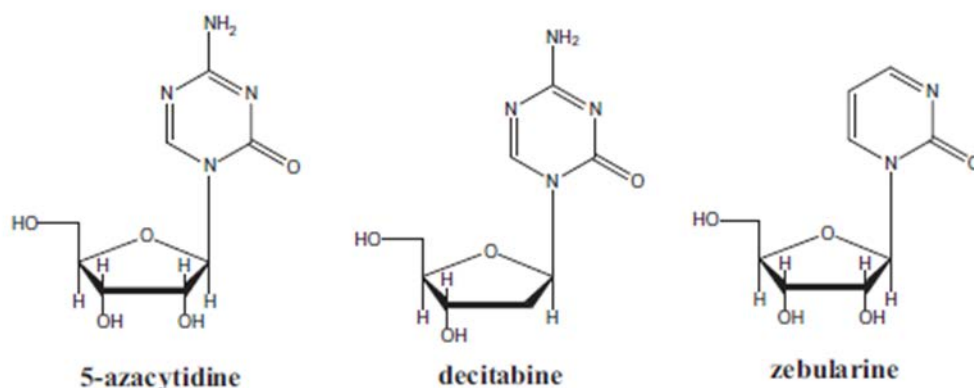


Figura 14. Estructura química de los inhibidores de las DNMTs [25].

5.2 INHIBIDORES DE LAS HISTONAS DEACETILASAS

Las HDACs son enzimas que actúan revirtiendo la acetilación de los residuos de lisina de las histonas. Catalizan la hidrólisis de los residuos de N-acetil lisina en las histonas y actúan de forma opuesta a la acción de las histona acetiltransferasas.

El uso de los inhibidores de histona deacetilasa (HDACis) en ensayos clínicos ha sido estudiado exhaustivamente (ver Figura 13) y varios HDACis como el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA; vorinostat), el depsipeptido (romidepsin) y el Belinostat han sido aprobados por la FDA para ser usado en tratamiento del linfoma cutáneo de células T (figura 15) [1, 3]. Vorinostat contiene un grupo de ácido hidroxámico que quela el átomo catalítico de zinc del enzima. Aunque inicialmente ha sido aprobado para su uso en linfoma cutáneo de células T, estudios posteriores han fracasado en su búsqueda de una mayor utilidad clínica a este compuesto [25].

Los inhibidores de las histonas deacetilasas inducen diferenciación celular y apoptosis de las células tumorales alterando el equilibrio entre la acetilación y la deacetilación de los residuos lisina en las histonas, siendo esta última un componente clave en represión génica anormal en cáncer. Eliminar esta represión es uno de los mecanismos propuestos como causantes de la eficacia de los inhibidores de las HDAC en el tratamiento del cáncer [1, 3]. Existen en general dos tipos de HDACis: los pan-inhibidores o inhibidores generales y los inhibidores que actúan sobre HDACs específicas. Por ejemplo, vorinostat es un pan-inhibidor mientras que romidepsin es una droga específica de HDAC clase I. Sin embargo todos los HDACis carecen de una total especificidad [1].

Preclínicamente, HDACis a altas dosis inducen daño en el DNA como una ruptura de la doble banda del DNA, generando una parada prematura del ciclo celular y muerte celular impidiendo también la reprogramación celular. Esto podría explicar por qué HDACis solos

generalmente no han demostrado efectividad clínica, especialmente en el caso de cánceres humanos comunes y podría responder a su toxicidad en pacientes [1].

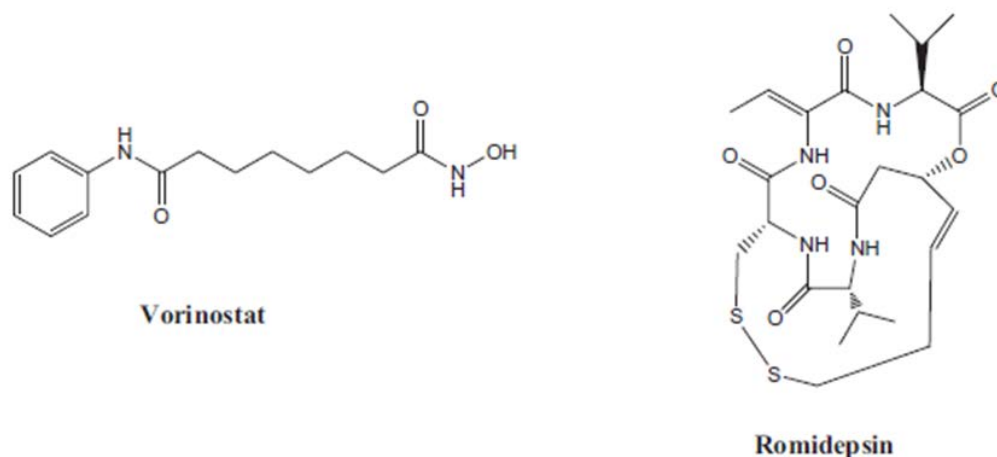


Figura 15. Estructura de algunos inhibidores de histona deacetilasa (HDACi) [25].

5.3 COMBINACIÓN DE DNMTIS Y HDACIS

Excepto los usos previamente aprobados por la FDA para los DNMTis y HDACis como agentes en solitario, su uso más prometedor, especialmente para tumores sólidos, podría ser en combinación entre ellos y/o con otras drogas. Estas combinaciones proceden del desarrollo de trabajos preclínicos realizados con el objetivo de entender sus dosis terapéuticamente relevantes y sus mecanismos moleculares [1].

Los HDACis administrados después de bajas dosis de 5AC o DAC puede aumentar el efecto de reexpresión de genes con hipermetilación del DNA de las islas CpG de los promotores, a pesar de que las HDACis por sí solos no son eficaces en este sentido. Muchos ensayos clínicos están probando esta asociación, la mayoría en el ámbito hematológico, con algunos mostrando una eficacia aumentada para SMD y/o LMA y otros no. Las razones para estas diferencias son aún desconocidas.

Se ha observado un resultado especialmente interesante en carcinoma pulmonar no microcítico avanzado (NSCLC), el cáncer con mayor mortalidad en todo el mundo. Entre un total de 65 pacientes con NSCLC metastásico resistente al tratamiento, la combinación de dosis bajas de 5 AC y del HDACi entinostat indujo una marcadamente profunda y duradera respuesta de 3 a > 4 años. Este número representa solo el 3% del grupo, pero si esta respuesta pudiese predecirse, muchos pacientes con NSCLC podrían beneficiarse del tratamiento combinado [1].

5.4 COMBINACIÓN DE DNMTIS Y HDACIS CON OTRAS TERAPIAS

Un concepto emergente y prometedor consiste en la combinación de terapias epigenéticas con otros tipos de tratamiento de cáncer (Tabla 3). Un hecho que lo apoya

son los datos que relacionan quimiorresistencia a eventos epigenéticos en “células madre” cancerígenas. Se estudió una HDM, JARIDI, que disminuía la marca activadora de la transcripción H3K4me3, y bajas dosis de HDACis revertían las propiedades célula madre y la quimiorresistencia. Otro miembro de la misma familia, JARID2, podría también actuar sobre las células madre del melanoma. Bajas dosis de DNMTis pueden, asimismo, inhibir las propiedades de las células madre cancerígenas, potenciar la apoptosis y bloquear la entrada en el ciclo celular. Estos ejemplos ilustran el gran potencial de la reprogramación inicial de las células cancerosas con terapias epigenéticas para así prepararse para terapias posteriores [1].

Tabla 3. Ensayos clínicos recientes sugieren la utilidad de la terapia combinada [1].

Trial (ClinicalTrials.gov)	Drug	Combination	Target	Study phase	Indication
NCT01034163	Panobinostat (LBH589)	None	Pan-HDAC inhibitor	Phase III	Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma
NCT01023308		Bortezomib, dexametha- sone	Pan- deacetylase inhibitor	Phase III	Relapsed multiple myeloma
NCT00425555		None		Phase II/III	Cutaneous T cell lymphoma
NCT00866333	Eentinostat (SNDX- 275)	None	Class I HDAC inhibitor	Phase I/II	Hodgkin's lymphoma, kidney cancer
NCT01038778		None		Phase II	Clear cell renal cell carcinoma, metastatic renal cell cancer
NCT01349959		Azacitidine		Phase II	Advanced breast cancer
NCT00357032 (Completed)	Belinostat (PXD101)	None	Pan-HDAC inhibitor	Phase II	Relapsed or refractory acute myeloid leukemia or older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia
NCT01310244		Carboplatin, paclitaxel	HDAC inhibitor	Phase I/II	Non-small cell lung cancer
NCT00274651		None		Phase II	Recurrent or refractory cutaneous and peripheral T cell lymphomas
NCT00301756		None		Phase II	Ovarian cancer
NCT01873703	Pracinostat (SB939)	Azacitidine	HDAC inhibitor	Phase II	Myelodysplastic syndrome
NCT01912274		Azacitidine		Phase II	Acute myeloid leukemia
NCT01112384 (Completed)		None		Phase II	Translocation-associated recurrent/metastatic sarcomas
NCT01761968	Givinostat	None	HDAC inhibitor	Phase II	Chronic myeloproliferative neoplasms
NCT01900730	Valproic acid	None	HDAC inhibitor	Phase II	Breast cancer
NCT00477386	Carboplatin	Decitabine	Demethylation	Phase I/II	Platinum-resistant ovarian cancer
NCT00387465	Eentinostat	Azacitidine	HDAC inhibitor	Phase I/II	Recurrent advanced non-small cell lung cancer
NCT01105377	Eentinostat	Azacitidine	HDAC inhibitor	Phase II	Metastatic colorectal cancer
NCT02115282	Exemestane with or without	Eentinostat	HDAC inhibitor	Phase III	Recurrent hormone receptor-positive breast cancer that is locally advanced or metastatic
NCT00091559	Vorinostat	None	HDAC inhibitor	Phase II	Advanced cutaneous T cell lymphoma
NCT00275080	Vorinostat	Decitabine	HDAC inhibitor	Phase I	Advanced solid tumors or relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma
NCT00071799	Azacitidine	None	Demethylation	Phase III	High-risk myelodysplastic syndromes comparing azacitidine versus conventional care
NCT00007345	Romidepsin	None	HDAC inhibitor	Phase II	Cutaneous T cell lymphoma and peripheral T cell lymphoma

Algunos de los resultados de estos ensayos son:

- El HDACi vorinostat combinado con carboplatino y paclitaxel resultó en una mejora de la tasa de respuesta y de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con NSCLC metastásico. En otros casos, el 25% de los pacientes con NSCLC metastásico alcanzó la estabilidad de su enfermedad o respuestas a diversos agentes terapéuticos como consecuencia del tratamiento con 5AC más el HDACi entinostat.
- En casi la mitad de los pacientes en fase I/II del ensayo con 5AC más carboplatino para el tratamiento de cáncer de ovario, se observaron respuestas duraderas y estabilización de la enfermedad. La combinación de DAC y carboplatino podría aumentar la supervivencia en un grupo similar de pacientes, por lo que esta combinación está siendo probada en diversos ensayos.
- El DNMTi SGI-110 reestablece la sensibilidad a irinotecan (fármaco antineoplásico, derivado de la camptotecina, un alcaloide citotóxico aislado del árbol chino *Camptotheca acuminata*) en pacientes con cáncer colorectal que han fracasado a su respuesta.
- Para el mieloma múltiple, la FDA ha aprobado el HDACi panobinostat (Farydak®) en combinación con el inhibidor del proteasoma bortezomib, y un inmunomodulador basándose en la mejoría en cuanto a supervivencia libre de enfermedad en la fase III del ensayo clínico.
- Los ensayos clínicos en fase II mostraron una eficacia positiva en el tratamiento de cáncer de mama cuando entinostat se combina con el inhibidor de aromatasa exemestano y está en marcha una tercera fase del ensayo.
- Los inhibidores de DNMT junto con clorgilina (inhibidor irreversible y selectivo de la monoamino oxidasa A) y un inhibidor de LSD1 han mostrado eficacia en diversas líneas celulares cancerígenas incluídas la vesical, colorectal y leucemia.

5.5 COMBINACIÓN DE TERAPIA EPIGENÉTICA CON INMUNOTERAPIA

Recientemente se ha sugerido la posibilidad de que la terapia epigenética pueda facilitar la inversión de la tolerancia inmunológica en los pacientes. Esta tolerancia es mediada por la interacción crónica entre ligandos definidos en células tumorales y receptores en las células huésped inmunes, que dejan a las células T inmunológicamente inertes [1].

Estos hallazgos han reforzado el concepto de inmunoterapia en cáncer. Los ensayos clínicos usando anticuerpos para CTLA-4, receptor clave para la tolerancia en las células T, muestran respuestas extraordinariamente duraderas en pacientes con melanoma

avanzado. Se está investigando esta molécula como diana en ensayos clínicos para cáncer de próstata y de pulmón. También, el establecimiento como diana el receptor de la célula huésped inmune, PD-1, y su ligando en las células tumorales, PD-L1, está demostrando resultados prometedores. La terapia con Anti-PD-1 está induciendo respuestas duraderas en cánceres metastásicos y especialmente en melanoma. La expresión de PD-L1 en las células tumorales parece ofrecer un biomarcador positivo para predecir mejor las respuestas a anti-PD-1 en pacientes con NSCLC.

Los datos clínicos y preclínicos están sugiriendo que la terapia epigenética podría mejorar incluso más la eficacia de la terapia basada en “puntos de control inmune” (immune checkpoint therapy). En el ensayo clínico realizado con 65 pacientes para NSCLC mencionado con anterioridad (ver Combinación de DNMTis y HDACis), cinco pacientes que progresaron tras la terapia epigenética fueron posteriormente introducidos en ensayos de anti-PD-1 y PD-L1 que incluían pacientes con NSCLC avanzado. Comparado con el 20% de los pacientes que respondieron (o tuvieron supervivencia libre de progresión pasadas 24 semanas) a la última terapia sola, los cinco pacientes que recibieron terapia epigenética previa pasaron de este punto sin progresión de la enfermedad y tres de ellos mostraron elevado grado de respuesta a la inmunoterapia tal como se definió con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST). Estas respuestas han persistido durante más de dos años. Se está desarrollando en la actualidad un ensayo clínico de mayor tamaño para comprobar si estos resultados son directamente atribuibles a la combinación de la terapia basada en puntos de control inmune y la terapia epigenética [1].

Es sabido desde hace tiempo que HDACis y particularmente DNMTis pueden inducir la expresión de componentes individuales de atracción inmune de las células cancerígenas. Estos efectos incluyen la sobreexpresión de antígenos que generalmente son únicamente expresados en células embrionarias y son silenciados epigenéticamente en células maduras. Existen evidencias de que bajas dosis de 5AC y DAC inducen una extraordinariamente coordinada serie de respuestas inmunes en NSCLC y otros tipos de tumores sólidos.

Existe la hipótesis de que las respuestas inducidas por estas drogas epigenéticas constituyen una potencial inversión de la “evasión inmune” de la célula tumoral y puede proporcionar un mecanismo para mejorar las terapias basadas en los puntos de control inmune. Todas estas perspectivas sobre preparar la terapia basada en puntos de control inmune con terapia epigenética esperan la verificación de su eficacia en ensayos clínicos. Los efectos individuales de DNMTis y HDACis deben de ser examinados no sólo para células tumorales sino también para células huésped inmunes [1].

5.6 TERAPIAS EPIGENÉTICAS CON NUEVOS AGENTES

Están apareciendo muchas moléculas nuevas para terapia epigenética, algunas aún en ensayo clínico. Estas moléculas utilizan como diana muchas de las proteínas encargadas del control del epigenoma (figura 16). Especialmente interesantes son aquellas que tienen como diana reguladores epigenéticos cuyos genes están mutados en cáncer [1].

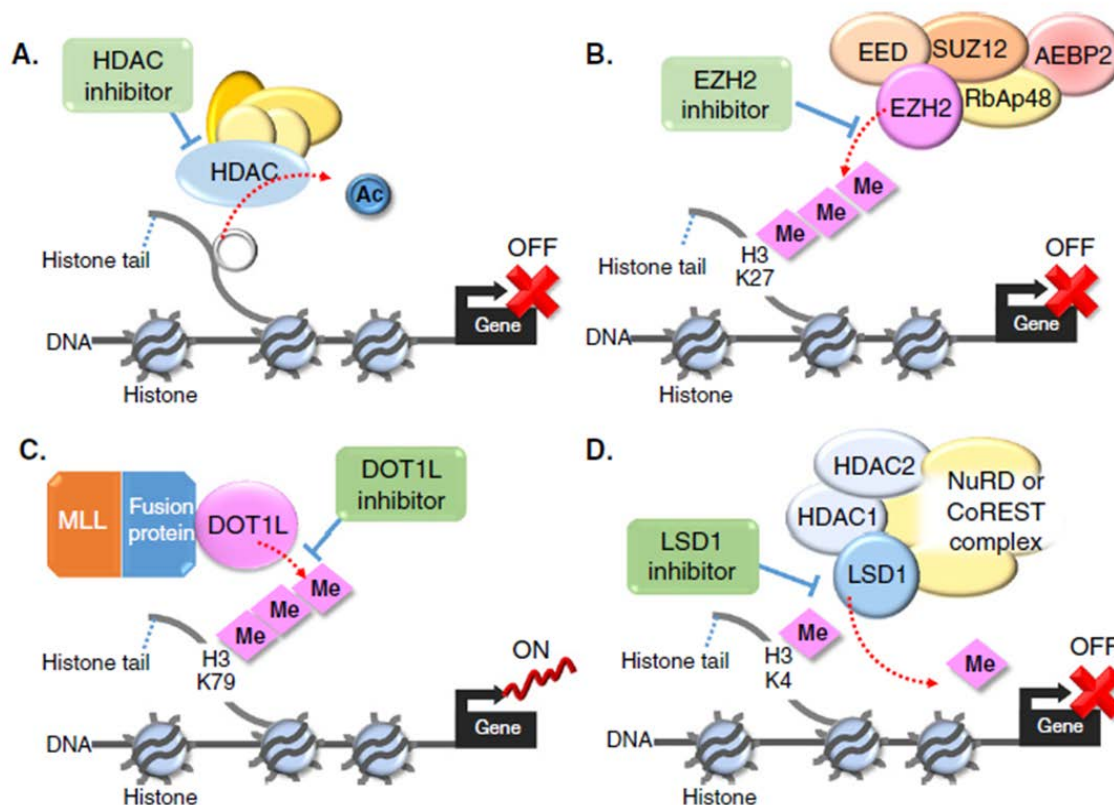


Figura 16. Las modificaciones de las histonas como diana terapéutica. Ac, acetil; Me, metil. A: Las histona deacetilasas (HDACs) eliminan la acetilación del residuo de lisina de las histonas. B: EZH cataliza la dimetilación y la trimetilación de H3K27 y reprime la expresión de genes diana. C: Las proteínas de fusión con MLL atraen a DOT1L, que cataliza la metilación de H3K79. D: LSD1 cataliza la demetilación de H3K4me2 y H3K4me1. LSD1 se encuentra en complejos de cromatina, como el de remodelación de nucleosomas e histona deacetilasa (NuRD) y el co-represor coREST [3].

5.6.1 INHIBIDORES DE IDH1 E IDH2

Un ejemplo clave es el de los genes de isocitrato dehidrogenasa IDH1 e IDH2, frecuentemente mutados en LMA, glioblastomas, y otros diversos tipos de tumores (ver tabla 2). IDH cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), por lo que sus mutaciones bloquean la producción de α -cetoglutarato, un factor clave para múltiples proteínas que regulan el epigenoma, incluyendo las proteínas TET y diversas HDMs [1, 3]. El resultado es un gran aumento de la metilación del DNA en los tumores mencionados anteriormente, en un fenotipo conocido como CIMP (fenotipo de metilación de las CpG). En los gliomas, entre el 50-80% de los tumores pertenecientes al subgrupo proneural tienen mutaciones en IDH1 y la mayoría de ellos se clasifican como G-CIMP, los cuales muestran rasgos clinicopatológicos característicos [1, 3].

Moléculas pequeñas que tienen como diana estas mutaciones de IDH están ahora en ensayos clínicos con resultados prometedores tempranos para LMA [1]. Desde 2014, se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase I con un inhibidor de IDH1 mutado en pacientes con LMA refractaria y mutaciones en IDH1. De entre estos pacientes, 7 de 17 tuvieron respuesta al inhibidor de IDH1, indicando los potentes efectos específicos de los inhibidores de IDH-1 mutado en estos pacientes [3].

5.6.2 INHIBIDORES DE EZH2

Otro regulador mutado en diversos tipos tumorales es EZH2 (ver tabla 2 y figura 16B), una histona metil transferasa para H3K27. Están siendo introducidos en ensayos clínicos inhibidores de EZH2, predominantemente para tumores hematológicos [1]. Diversos grupos de investigación y compañías farmacéuticas han desarrollado inhibidores selectivos potentes de EZH2 (GSK126, EPZ-6438, EI1, UNC1999, y SAH-EZH2). Entre ellos, EPZ-6438 está actualmente en fase I/II de ensayo en pacientes con tumores sólidos avanzados y pacientes con linfoma de células B refractario o que han sufrido recaída [3].

5.6.3 INHIBIDORES DE DOT1L

MLL1 es una histona metil transferasa que cataliza la metilación de H3K4. Las traslocaciones de MLL son frecuentes en LMA, LLA y otros tumores (Tabla 2). Las proteínas de fusión con MLL, actuando a través de la proteína DOT1L (“disrupter of telomeric silencing-1”, una metil transferasa para H3K79), inducen activación génica inapropiada (Figura 16C). Las drogas que bloquean a DOT1L se encuentran en ensayos clínicos para su uso en LMA [1]. Por ejemplo, el inhibidor EPZ-5676 interfiere con los efectos de DOT1L, reduciendo selectivamente los niveles globales de H3K79me₂, reprimiendo los genes diana de la fusión MLL y provocando un efecto antiproliferativo específico en líneas celulares con MLL traslocado (figura 16C) [3, 5].

5.6.4 INHIBIDORES DE LSD1

Como se mencionó en apartados anteriores, otro enzima que está sobreexpresado en muchos tumores y tiene un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la LMA es el LSD1 (figura 16D), una histona demetilasa de H3K4. La tranicilpromina (TCP), un inhibidor general de la monoamino oxidasa, y sus análogos, inducen la diferenciación en

células de LMA. TCP está ahora en fase I/II de ensayo clínico combinado con ácido retinoico (ATRA) para pacientes con LMA refractaria o que han sufrido una recaída. Por otra parte, un inhibidor irreversible de LSD1 (GSK2879552) reprime el crecimiento celular en líneas celulares de LMA y carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) tanto in vitro como in vivo. Se están llevando a cabo ensayos clínicos usando GSK2879552 en pacientes con LMA y con SCLC. El uso de inhibidores de LSD1 también tiene potencial en el tratamiento de otras enfermedades como hipertensión (también en ensayo clínico), depresión e infección por virus herpes [3].

5.6.5 INHIBIDORES DE BET

Las proteínas de la familia BET (bromo y extraterminal), BRD2, BRD3, BRD4, y BRDT, se unen a residuos acetilados de histonas y juegan un papel fundamental en la elongación transcripcional y la progresión del ciclo celular (figuras 5 y 17). Se han encontrado traslocaciones que involucran BRD3 o BRD4 y NUT (proteína nuclear de testículo) en carcinoma de línea media, un carcinoma de células escamosas muy agresivo (figura 17). Inicialmente se descubrieron dos inhibidores de BET: JQ1 y I-BET. JQ1 es eficaz contra este carcinoma. La unión competitiva de los inhibidores de BET desplaza a la oncoproteína de fusión BRD4 de la cromatina, cuyo resultado es la inhibición de la transcripción de oncogenes clave, como BCL-2, c-MYC y CDK6. Los inhibidores de BET también silencian la expresión de MYCN oncogénico en neuroblastoma. Diversos inhibidores de BET están ahora en ensayos clínico para carcinoma de línea media con NUT y otros cánceres incluyendo tumores sólidos con amplificación de MYCN [3, 5]. El mecanismo por el que los inhibidores de BRD4 actúan inhibiendo al oncogen MYC se muestra en la Figura 5 [13].

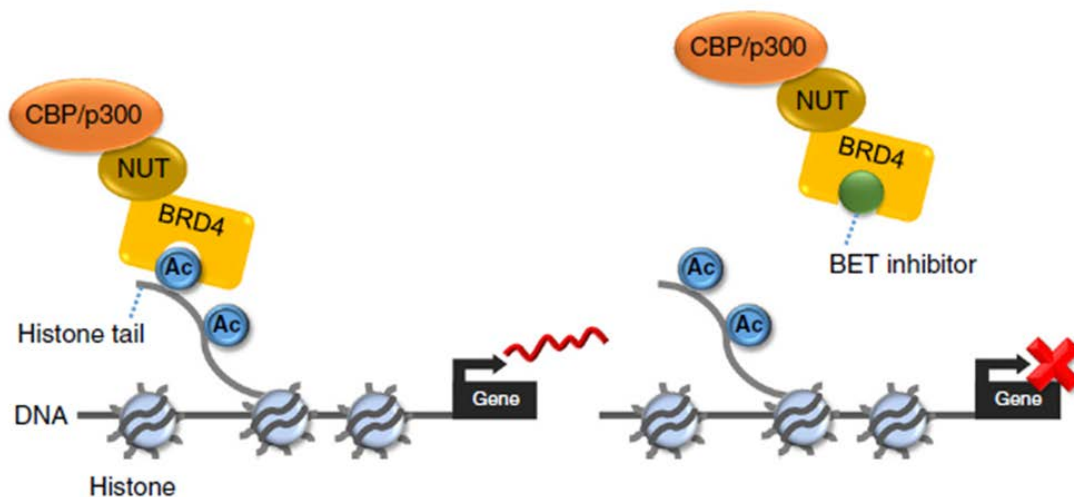


Figura 17. Inhibidores de BET. El bromodominio se une a las lisinas acetiladas, las cuales están asociadas con promotores activamente transcritos. Los inhibidores BET se unen al sitio de reconocimiento de la proteína BET [3].

6. CONCLUSIONES

En las últimas décadas se ha comenzado a descubrir la gran implicación de la epigenética en cáncer [26]. Los nuevos conocimientos al respecto incluyen la identificación de un gran número de mutaciones en genes que regulan el control epigenético. Esta relación entre alteraciones genéticas y epigenéticas está promoviendo el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer (figura 18). Actualmente ya existen evidencias de que esta forma de tratamiento, combinando terapias con una mayor antigüedad y terapias empleando las moléculas nuevas que se están desarrollando, pueden generar un gran cambio en el tratamiento contra el cáncer. La posibilidad de revertir las consecuencias de las alteraciones epigenéticas en el cáncer es una realidad que va en aumento y en los próximos años seremos testigos con toda probabilidad de la eficacia de estas estrategias terapéuticas.

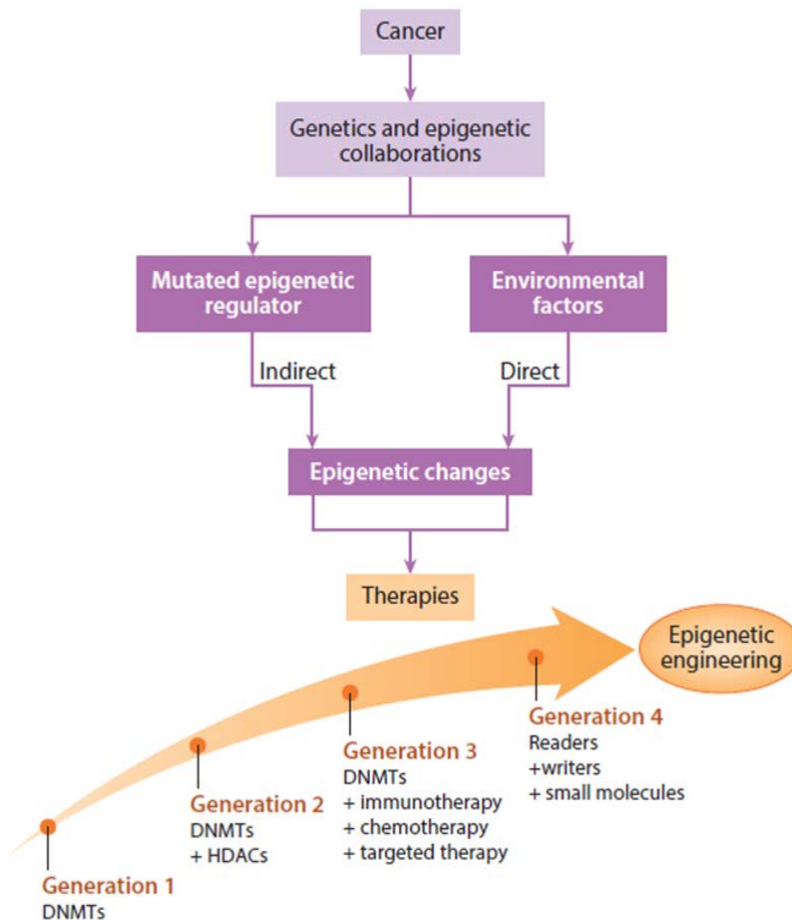


Figura 18. Tratamientos basados en la combinación de eventos mutacionales y alteraciones epigenéticas. Las terapias epigenéticas están evolucionando progresivamente [1].

7. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a mi directora, M. Dolores Delgado Villar, por su dedicación, y su gran ayuda en la realización de este trabajo. Ha sido un placer aprender tanto de ella en esta última etapa.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahuja N, Sharma AR and Baylin SB (2016) Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annu Rev Med* 67:73-89.
2. Delgado MD (2009) Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. Redes de Señalización y estrategias terapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXIV.
3. Shinjo K and Kondo Y (2015) Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 95:56-64.
4. Aumann S and Abdel-Wahab O (2014) Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 455:24-34.
5. Helin K and Dhanak D (2013) Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 502:480-8.
6. Alberts B (2010) *Biología Molecular de la célula*. Ed. Omega.
7. Cooper GM and Hausman RE (2014) *The cell. A molecular approach*. Marban.
8. Dawson MA and Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150:12-27.
9. Scholz B and Marschalek R (2012) Epigenetics and blood disorders. *Br J Haematol* 158:307-22.
10. You JS and Jones PA (2012) Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 22:9-20.
11. Belkina AC and Denis GV (2012) BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:465-77.
12. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Muller S, Pawson T, Gingras AC, Arrowsmith CH and Knapp S (2012) Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149:214-31.

13. Cortiguera MG, Batlle-Lopez A, Albajar M, Delgado MD and Leon J (2015) MYC as therapeutic target in leukemia and lymphoma. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* 5:75-91.
14. Popovic R and Licht JD (2012) Emerging epigenetic targets and therapies in cancer medicine. *Cancer Discov* 2:405-13.
15. Chi P, Allis CD and Wang GG (2010) Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 10:457-69.
16. Cortez CC and Jones PA (2008) Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutat Res* 647:44-51.
17. Esteller M (2011) Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next? *Genes Cancer* 2:604-6.
18. Ivanov M, Barragan I and Ingelman-Sundberg M (2014) Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 35:384-96.
19. Esteller M (2011) Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol Rep* 3:9. doi: 10.3410/B3-9
20. Rodriguez-Paredes M and Esteller M (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17:330-9.
21. Kumar R, Li DQ, Muller S and Knapp S (2016) Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene*.
22. Suganuma T and Workman JL (2011) Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 80:473-99.
23. Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148-59.
24. Brien GL, Valerio DG and Armstrong SA (2016) Exploiting the Epigenome to Control Cancer-Promoting Gene-Expression Programs. *Cancer Cell* 29:464-76. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.007
25. Dhanak D and Jackson P (2014) Development and classes of epigenetic drugs for cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 455:58-69.
26. Baylin SB and Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11:726-34.

