

GENÉTICA

EPIGENÉTICA Y CÁNCER (Revisión Bibliográfica)

Erick Lagos-Sánchez*
Tatiana Soto-Monge**

SUMMARY

Multiple etiologic factors participate in the development of cancer, including environmental and genetic causes. The molecular mechanisms of genetic expression-control have gained an important role in the search for understanding this disease. Epigenetic alterations are now known to contribute to the pathogenesis of cancer. The newer studies have identified molecular patterns that predispose or trigger tumorigenesis. In this article we intend to review the most relevant aspects on cancer, epigenetics and the new targeted-therapies directed at tumor suppressor gene re-expression with clinically proven importance.

INTRODUCCIÓN

Aunque el cáncer es una enfermedad en la que predominan anormalidades genéticas, los estudios moleculares han demostrado que alteraciones epigenéticas comparten un papel protagónico en su desarrollo. La epigenética abarca una serie de alteraciones heredables en la expresión génica que no están causadas directamente por la alteración en la secuencia nucleotídica del ADN, como son las alteraciones de la estructura de la cromatina mediada por metilación de los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG, la modificación de histonas mediante acetilación o metilación y los cambios en la estructuración jerárquica de la cromatina de orden mayor. Se ha observado que una metilación anormal en sitios de transcripción génica

puede dar como resultado un silenciamiento epigenético de los genes cuya función sería, en circunstancias normales, protegernos contra la formación de tumores o reparar el ADN. En esta revisión veremos el resultado de las investigaciones más recientes in vitro e in vivo en terapia epigenética y sus aplicaciones en oncología.

La diferenciación celular y el efecto Epigenético

Durante el desarrollo de organismos multicelulares, un único huevo fertilizado da origen a miles de subtipos celulares, que se reúnen y se diferencian en tejidos. Como todas las células del organismo tienen virtualmente el mismo genoma, existe un patrón de lectura discriminativo que dicta quién se convierte en neuronas, piel o músculo. El programa de expresión genética debe mantenerse, asimismo, a lo largo de las

* Médico Cirujano.

** Médico Cirujano.

generaciones celulares subsiguientes, a través de la división celular. Las investigaciones de los últimos años han dejado claro que el control de la compactación del ADN genómico para formar la cromatina es fundamental para mantener un gen en un estado de expresión “encendido” o “apagado”.(7) La compactación permite que el genoma completo de un individuo, de una longitud aproximada de 2 metros, alcance los 10 μm de diámetro de un núcleo celular normal. De esta forma 147 pares de bases envuelven un octámero de histonas 1.7 veces dando origen a una estructura conocida como nucleosoma. Los nucleosomas que se encuentra conectados a través de 20 a 60 pares de bases forman una configuración similar a las cuentas de un rosario, una estructura conocida como la fibra de 30nm. Esta estructura puede compactarse aún más, formando la fibra de 10 nm. A pesar de que no se conoce con exactitud cómo se realizan estos procesos, existen en la actualidad algunas claves sobre cómo se da esta compactación. El resultado, sin embargo, es una disminución en el espacio físico tridimensional del ADN, haciendo imposible que los factores de transcripción reconocan zonas promotoras para que así los genes contenidos se puedan expresar. Dos grupos de proteínas, el grupo Polycomb (PcG) de genes represores y el grupo trithorax (trxG) de genes activadores se encargan de modular la estructura de la cromatina

(Para una lectura más detallada revisar las referencias(4) A su vez, diversos factores que determinan la interacción histona-histona o histona-ADN, como los patrones de metilación o acetilación, trabajan en conjunto regulando los patrones de expresión génica claves durante el desarrollo y la diferenciación celular y por lo tanto juegan un papel determinante en la génesis de los tumores.

Metilación del ADN y el Silenciamiento Génico

Los cuatro bases de nucleótidos de ADN — citosina (C), adenina (A), guanina (G) y timina (T)— forman un total de 16 posibles pares de dinucleótidos. En uno de estos casos, una citosina esta junto a una guanosina en dirección 5', el dinucleótido CpG. Éste dinucleótido se encuentra a una frecuencia menor de lo esperado a lo largo de la mayor parte del genoma, pero se encuentra en una frecuencia más alta de lo normal en unas porciones del ADN que se conocen como islotes CpG.(7) Es curioso destacar que estos islotes CpG se encuentran usualmente concentrados cerca de los sitios de inicio de la transcripción génica, las regiones promotoras, donde la transcripción de ADN a ARN comienza.(7) La metilación del ADN ocurre en sitios específicos. La ausencia de metilación en un islote CpG es un indicador de que el sitio de transcripción está activado y que es capaz de ser transcrito de ADN a ARN. En las

células cancerosas se pierde el patrón de metilación normal: los islotes CpG de algunos genes muestran un patrón de metilación inusualmente elevado en las regiones promotoras, pero no en las regiones fuera de estas. Estas modificaciones interactúan con factores que modifican la estructura de la cromatina, dando como resultado el silenciamiento del gen. El silenciamiento transcripcional de genes que tienen actividad antitumoral puede resultar en eventos celulares anormales, que contribuyen a la progresión del fenotipo celular tumoral.(11) Por ende, el silenciamiento epigenético de los genes es otro mecanismo mediante el cual se altera la producción efectiva de genes supresores de tumores.(11) Aunque la pérdida de dos alelos donde se encuentren genes supresores de tumores es un evento desastroso para la célula, sea cual sea su causa, esto es relativamente infrecuente: la inactivación de ambos alelos mediante hipermetilación es, en cambio, un evento bastante más frecuente.(7;11) Estudios recientes han encontrado una lista creciente de genes relacionados con el desarrollo del cáncer en los cuales se ha identificado un patrón de metilación del ADN que conlleva al silenciamiento de los mismos (7;11) Los genes afectados pueden participar en múltiples vías del desarrollo celular, controlando procesos como migración, reconocimiento del entorno tisular, diferenciación celular y el balance entre división

celular y apoptosis. Por ejemplo, uno de los genes supresores de tumores más comúnmente afectados en cánceres epiteliales y linfomas es el gen P16INK4a, el cual al ser silenciado permite la acumulación de anomalías cromosómicas y mutaciones genéticas, perdiendo así su capacidad característica de desencadenar la senescencia replicativa o la muerte celular por apoptosis.(5)

El patrón de transcripción genético es aberrante en el cáncer

En algunas formas esporádicas de cáncer de colon, mama y renal, los genes STK11, BRCA1 y VHL, respectivamente, se encuentran silenciados epigenéticamente.(11) El silenciamiento epigenético puede ocurrir en lesiones premalignas involucrando genes de reparación del ADN y por lo tanto predisponiendo a alteraciones en la secuencia del ADN. La pérdida de un gen reparador de ADN, el 06-metilguanina-ADN-metiltransferasa, que previene la transición de una G por una A, ocurre muy temprano en el curso de la aparición del cáncer de colon y desencadena la subsiguiente acumulación de este tipo de transiciones en genes regulatorios importantes como el KRAS y el P53.(11) Del 10% a 15% de los pacientes con cáncer de colon que tienen inestabilidad microsatelital aproximadamente el 70% a 80% muestran silenciamiento epigenético de un gen que procura reparar los errores por

incompatibilidad entre bases, el MLH1.(8;12) Además, la citosina metilada es directamente mutagénica, y sufre transformación C>T de forma espontánea.(3)

La reversibilidad de la metilación aberrante del ADN

Muy en contraste con las mutaciones genéticas, el silenciamiento epigenético es potencialmente reversible.(11) La evidencia experimental sugiere que es posible reactivar genes silenciados epigenéticamente. Algunas drogas que inducen la desmetilación del ADN como la 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabine®), pueden conducir a la reexpresión de genes silenciados, recuperándose así su función original (7; 11). Estos agentes se incorporan al ADN de las células con alto índice mitótico inhibiendo irreversiblemente la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMT) y así previenen la hipermetilación de los islotes CpG. Las DNMT son enzimas altamente conservadas en la evolución que transfieren grupos metilo provenientes de la S-Adenosil-Metionina al quinto carbono de anillo pirimidínico de la citosina.(7) Desgraciadamente, la 5-aza-2'-deoxicitidina tiene limitada solubilidad acuosa y efecto mielosupresor. Otros inhibidores de las ADN metiltransferasas (DNMTi) están en constante desarrollo. En algunos de los estudios más actualizados se han combinado con inhibidores de la desacetilasa de histonas

(HDAC) con resultados importantes (Véase más adelante). Aunque estos hallazgos apuntan a que es posible restaurar el estado transcripcional, también se ha observado que las células en las que la expresión génica es reactivada por agentes desmetiladores pueden eventualmente retornar a su estado de silenciamiento génico una vez que el tratamiento se discontinúa.(7; 11) La azacitidina (Vidaza®) fue el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del Síndrome Mielodisplásico (MDS). El MDS se caracteriza por una hematopoyesis deficiente que cursa con varios tipos de citopenias incluyendo anemia, leucopenia y trombocitopenia. En un 40% la enfermedad progresa a Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Hasta hace poco los pacientes con MDS debían recibir un tratamiento basado en transfusiones múltiples de plaquetas y GRE más antibióticos. La metilación de genes promotores se ha identificado en el 68% de las LMA y en el 35% de los MDS, pero en este último, la densidad de la mutilación aumenta conforme la enfermedad progresa. El tratamiento con DNMTi sólo o en combinación con HDACi como el fenibutirato sódico se ha estudiado en MDS y en otros desórdenes donde se ha demostrado que existe metilación del ADN y silenciamiento génico. En estos ensayos clínicos se ha documentado una mejoría en los parámetros hematológicos y un retraso en la progresión

de la MDS. En un estudio controlado aleatorizado reciente se obtuvo una respuesta total de un 60% con Azacitidina vs. el cuidado estándar y los resultados fueron altamente significativos ($p < 0.0001$). En la actualidad los DNMTi son los mejores agentes activos, como terapia única, para el tratamiento del MDS.

El código de histonas y los patrones de acetilación y metilación

Los extremos amino-terminales de cada una de las cuatro histonas que se encuentran en pares en los nucleosomas, están altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos y realizan una función crucial en la regulación de la estructura de la cromatina. Estos aminoácidos sufren modificaciones covalentes por acetilación, metilación y fosforilación de sus residuos mediante enzimas claramente establecidas, entre otros tipos de modificaciones posibles. La metilación y acetilación de residuos específicos de histonas parece conferir un código de histonas que indica si un gen se encuentra en estado activo de transcripción. Las acetilasas de histonas (HAT) forman parte de un complejo coactivador que son reclutadas en regiones promotoras por factores de transcripción específicos para ciertas secuencias du-

rante la activación de genes. En contraste, las desacetilasas de histonas (HDAC) son reclutadas por represores de transcripción y previenen el inicio de la transcripción génica. Los residuos metilados de citosina en las regiones promotoras se asocian con Proteínas de Unión a Metilcitosinas (MBP) que reclutan otros complejos con actividad HDAC. El balance entre una estructura cromatínica permisiva (encendida) y una inhibitoria (apagada) es ampliamente determinada por la actividad de factores de transcripción que regulan el código de histonas y el status de metilación de los elementos de control genético.(7;11) En el caso particular del cáncer, se ha observado que la acetilación de los extremos amino terminales de las histonas, en especial la H3 y la H4, inducen un cambio conformacional en la estructura jerárquica de la cromatina cuyo resultado final es la promoción del inicio de la transcripción de genes supresores de tumores.(7;11) Uno de los códigos más importantes es la acetilación de la lisina 9 en la histona 3. Éste cambio previene la metilación subsiguiente de esta misma lisina, lo que se traduciría en una señal de silenciamiento transcripcional. La lisina 4 de la H3

al ser metilada se ha asociado, en cambio, con la activación del gen.(7) A su vez, estos cambios se ven influenciados por la metilación de la secuencia del ADN en los islotes CpG. La evidencia actual apunta hacia que los HDACi no son tan importantes en revertir el silenciamiento génico, como los inhibidores de la DNMT, pero un efecto aditivo podría verse al combinarlos. (7;11)

El rol de la acetilación en la fisiología celular y su relación con el cáncer

El grupo de proteínas que sufre alteraciones postranscripcionales por acetilación dio origen al término acetiloma. Las HDAC forman una familia con tres clases relevantes identificadas, cuya homología y conservación no indican otra cosa más que tienen un rol no redundante en procesos biológicos básicos. La experimentación con ratones knocked-out de HDAC1 (clase 1) dio como resultado un fenotipo embrionario letal en su mayor parte debido al arresto celular asociado con un aumento en inhibidores de las CDK, P21 y P27kipl. Las HDAC ayudan a controlar la estabilidad proteica ya que las lisinas también son señalizadas por ubiquitinización para luego ser degradadas por la vía del proteasoma, reduciendo así la vida media de la proteína. La acetilación del factor inducible por

hipoxia (HIF-1) por la ARD1 HAT aparentemente produce un aumento en del complejo ubiquitinado del von Hippel Lindau (VHL) y la degradación mediada por el proteasoma, que juega un rol determinante en la respuesta a los cambios en la disponibilidad del oxígeno y la angiogénesis.(1;9) La importación y exportación de proteínas a través de las importinas en la membrana nuclear está regulada por la acetilación. Chaperonas importantes en el cáncer como la HSP-90 se sabe que se ven afectadas por acetilación. Además la acetilación participa en otros procesos para la formación de los microtúbulos, controlar el estrés interno y externo y participan en las vías de inflamación, apoptosis y necrosis. No son exclusivas de proteínas histonas, en cambio, se cree que evolucionaron antes que éstas por lo que algunas de las actuales HDAC no actúan sobre histonas, ni siquiera actuarían en el núcleo celular, sino que se encuentran en el citoplasma y la mitocondria, donde no hay histonas.(6) La leucemia promielocítica aguda (LPA) fue el primer modelo de enfermedad en el que el rol de las HDAC se logró demostrar. En la LPA se forma un complejo heterocromatinizante en el que participan HDACs, las ADN metiltransferasas DNMT1 y DNMT3a y las metiltransferasas de la K9-H3, SUV39H1 y SUV39H2. Los genes silenciados intervienen en la diferenciación mieloide

dando como resultado un bloqueo en la diferenciación y un aumento la proliferación celular. En cáncer de próstata se ha observado un patrón específico de acetilación/metilación en las histonas H3/H4 que confiere un riesgo elevado de recurrencia de cáncer de próstata de bajo grado. A la fecha, sin embargo, la evidencia más convincente de que las HDAC se comportan de forma anormal en las células tumorales deriva de la manipulación de las HDAC por inhibidores de las HDAC (HDACi).

Los inhibidores de las deacetilasas de histonas y los resultados obtenidos en estudios clínicos

Una consideración conciente del efecto generalizado resultante tras inhibir las HDAC podría indicar que no son los mejores agentes terapéuticos para investigar, ya que podrían intervenir con funciones celulares específicas de suprema importancia. Un creciente número de estructuras químicas tienen actividad inhibitoria contra las HDAC clases 1, 2 y 4, las más relevantes para los mamíferos. Todavía más importante es destacar el hecho de que no existe evidencia de que alguno de estos compuestos sea superior inhibiendo preferentemente una clase específica de HDACi, como tampoco se ha conferido características especiales a

alguna de las HDACi en especial. Algunos HDACi se originan de fuentes naturales como el Tricostatín A (TSA) y otros pueden ser obtenidos por síntesis en laboratorios. Los HDACi inducen en grado variable arresto del crecimiento celular, arresto de la diferenciación e inducen apoptosis tanto en modelos in vitro e in vivo. Sorprendentemente, las células de tejidos normales con considerablemente más resistente al efecto de las HDACi que las células tumorales. Además, los HDACi podrían aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia y a la radioterapia.(10) Otro de los efectos que se le asocia con su actividad selectiva a células tumorales es el hecho de que los HDACi trunca la activación de dos puntos de chequeo del ciclo celular. Como el ADN de estas células continuaría su replicación sin ser reparado la acumulación de defectos llevaría a un desenlace celular catastrófico. Por otro lado, los HDACi también inducen apoptosis a través de vías dependientes e independientes de caspasas, procesos que están aún por esclarecerse.(19) Los resultados obtenidos de estudios fase I/II en pacientes con cáncer indican que la toxicidad de estos fármacos es debida primordialmente a las características específicas de los agentes utilizados y no del efecto inhibitorio generalizado producido por los HDACi.(19) Un problema grave de estos agentes es que se conoce muy poco sobre las propiedades

farmacocinéticas y farmacodinámicas y su relación con la toxicidad observada. Estudios en modelos preclínicos en tumores cuya patogénesis se sabe que está intrínsecamente relacionada con patrones de hiperacetilación (como en algunas leucemias) no han dado resultados tan alentadores. Aunque se observa una respuesta clínica los animales no se curan y tan pronto se termina el tratamiento la enfermedad termina siendo la causa de muerte en un 100% de los casos. Los resultados han sido especialmente buenos para el linfoma cutáneo de células T en el que se documentaron respuestas parciales y completas de hasta un 57% .(2)

C ONCLUSIÓN

Desde hace mucho tiempo se conoce que en la fisiopatología del cáncer interviene la inactivación de genes supresores de tumores, los cuales, en condiciones normales trabajarían evitando que las células acumulen errores. La evidencia actualizada apunta a que en alguna medida la inactivación de estos genes se da mediante un proceso complejo de silenciamiento epigenético. En éste, participan la metilación de dinucleótidos CpG en regiones promotas acompañadas de acetilación y metilación de residuos de amino ácidos específicos de ciertas proteínas histonas. Además, algunos novedosos agentes dirigidos específicamente contra estos procesos anómalos podrían

eventualmente ampliar la batería de tratamientos oncológicos actuales. El estudio de las modificaciones postranscripcionales de las proteínas no histónicas permitirá a un mediano plazo esclarecer los mecanismos moleculares que finalmente conducen a un fenotipo tumoral, para así poder enfrentarla haciendo uso de terapias dirigidas, de baja toxicidad, con efectos secundarios mínimos y con elevadas tasas de respuesta.

R ESUMEN

En la etiología del cáncer participan múltiples factores, tanto ambientales como genéticos. Los mecanismos moleculares de control de la expresión genética han ganado terreno en la búsqueda por explicar las causas de la enfermedad. Ahora se sabe que las alteraciones epigenéticas contribuyen a la patogénesis del cáncer. Los estudios más recientes han identificado patrones moleculares que predisponen o desencadenan los tumores. En esta revisión veremos algunos aspectos relevantes sobre la epigenética, el cáncer y las nuevas terapias dirigidas a la re-expresión de genes supresores de tumores con importancia clínica demostrada.

B IBLIOGRAFÍA

(1) Bilton R, Mazure N, Trottier E et al. Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability

- of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem* 2005; 280(35):31132-31140.
- (2) Byrd JC, Marcucci G, Parthun MR et al. A phase I and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105(3):959-967.
- (3) Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274(5673):775-780.
- (4) Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 2004; 306(5701): 1571-1573.
- (5) Foster SA, Wong DJ, Barrett MT, Galloway DA. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(4):1793-1801.
- (6) Gregoretti IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004; 338(1):17-31.
- (7) Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349(21):2042-2054.
- (8) Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):6870-6875.
- (9) Jeong JW, Bae MK, Ahn MY et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; 111(5):709-720.
- (10) Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(4):287-299.
- (11) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6):415-428.
- (12) Kane MF, Loda M, Gaida GM et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(5):808-811.