

Terapia epigenética en el cáncer. Logros y perspectivas

Víctor Manuel Valdespino-Gómez,* Víctor Edmundo Valdespino-Castillo**

Resumen

Se analizan los principales cambios fisiológicos y fisiopatológicos epigenéticos de las células normales y de las cancerosas; se hace hincapié en los logros y perspectivas de la terapia epigenética en el tratamiento del cáncer.

Las alteraciones epigenéticas globales en el cáncer, corresponden principalmente a la hipermetilación de los promotores de los genes supresores tumorales, hipometilación global del DNA, junto con la sobreexpresión y actividad de las histonas-desacetilasas. El objetivo de la terapia epigenética es revertir las alteraciones epigenéticas causales que ocurren en el cáncer, conduciendo al restablecimiento del "epigenoma normal".

En particular, los blancos epigenéticos en el tratamiento del cáncer se han enfocado a inhibir las DNA-metiltransferasas y a las histona-desacetilasas. La azacitidina, el decitabine, el vorinostat y el romidepsin los aprobó la FDA para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos y linfoma cutáneo avanzado de células T, respectivamente. Algunas modificaciones epigenéticas han demostrado su valor potencial como biomarcadores en detección temprana, pronóstico y predicción en algunos cánceres.

La revolución epigenética ha llegado al campo de la Biología. Los avances logrados en esta disciplina han permitido entender nuevos aspectos de la fisiología y fisiopatología del desarrollo embrionario, del cáncer y de otras enfermedades crónicas. El conocimiento más profundo de las modificaciones epigenéticas en cada tipo de cáncer permitirá diseñar mejores estrategias de tratamiento. El reto para los investigadores en este campo es diseñar fármacos más específicos y con menores efectos colaterales.

Palabras clave: cáncer, terapia epigenética, DNMTs inhibidores, HDACs inhibidores, biomarcadores epigenéticos.

Abstract

In this review, we provide an overview of the physiological and pathophysiological epigenetic changes of normal cells and cancer cells, and emphasize the achievements and the perspectives of cancer epigenetic therapy.

Cancer epigenetic alterations correspond foremost to hypermethylation of tumor suppressor genes promoters, global DNA hypomethylation, and overexpression and activity of histone deacetylases. The purpose of epigenetic therapy is to revert the epigenetic alterations in cancer cells and obtain the "normal epigenome" restoration.

Epigenetic targets in cancer therapy have focused on HDACs and DNMTs inhibition. The azacitidine and the decitabine, the vorinostat and the romidepsin were approved by US-FDA for treatment of myelodysplastic syndrome, and cutaneous T-cell lymphoma, respectively. Epigenetic and epigenomic changes in single or multiple genes have showed potential impact in cancer as early detection, prognosis and predictive marks.

Epigenetic revolution have arrived to the Biology. The significant progress in epigenetic studies have allowed us, to understand new looks in the physiology and pathophysiology of embryonic development, cancer and other chronic diseases. Specific molecular epigenetic alterations in different cancer types, give us new strategies to design improved cancer therapy. The challenge for epigenetic investigators is design more specific epidrugs with lesser side effects.

Key words: cancer, epigenetic therapy, DNMTs inhibitors, HDAC inhibitors, epigenetic biomarkers.

* Departamento de Atención a la Salud, Unidad Xochimilco. Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F. México.

** Unidad Médica de Atención Ambulatoria. Instituto Mexicano del Seguro Social, Campeche, Campeche. México.

Correspondencia:

Acad. Dr. Víctor M. Valdespino Gómez.
Andrés Molina Enriquez 361, Col. Ampliación Sinatel,
Del. Iztapalapa, 09479 D.F. México.
Tel.: (55) 56743439
Correo electrónico: vvaldespinog@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 22-09-2011

Aceptado para publicación: 24-11-11

Introducción

El cáncer es una enfermedad compleja, el progreso de su entendimiento lo ha identificado como un sistema biológico multifactorial. Su paradigma de estudio ha cambiado en las últimas décadas, de un planteamiento reduccionista a holístico; en el que se establece que la totalidad de las propiedades de un sistema biológico no son determinadas o explicadas sólo a partir del análisis de sus partes. En cualquier sistema biológico sus componentes interactúan y dan origen a propiedades emergentes que al identificarse mejoran su com-

presión. El cáncer como muchas enfermedades, implica una gran cantidad y variedad de elementos que interactúan en redes complejas no lineales.¹

Los diferentes tipos de cáncer son causados por la acumulación de alteraciones genómicas y epigenómicas.² El mayor entendimiento del cáncer se ha logrado gracias a la información de la primera secuenciación del genoma humano, y principalmente a la obtenida por la aplicación de tecnologías de secuenciación de segunda generación. Estas últimas han permitido construir mapas de genomas completos de algunas células cancerosas, de resolución elevada sobre alteraciones somáticas (número de copias, re arreglos cromosómicos, etc.), del transcriptoma, del exoma (exones conocidos) y del metiloma.³ Los estudios epigenómicos proporcionan el contexto para comprender el funcionamiento del genoma en diferentes condiciones ambientales témporo-espaciales.⁴

El entendimiento de los sistemas biológicos involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer hará posible formular estrategias terapéuticas más inteligentes, en las que se modulará o se manipularán simultáneamente dos o más interacciones de las principales vías bioquímicas de señalamientos oncogénicos (modelo de genes múltiples).

En la actualidad los dos principales tipos de blancos moleculares a los que se dirigen los tratamientos farmacológicos en el cáncer, corresponden a: blancos moleculares inespecíficos que bloquean la replicación del DNA y la proliferación celular; blancos moleculares cuasi-específicos, con la finalidad de bloquear las vías de señalamientos intracelulares de la proliferación celular, activar la vía de señalamientos de la apoptosis, bloquear las señales extracelulares de proliferación y supervivencia celulares, evitar el silenciamiento en la expresión de genes supresores tumorales, inhibir la destrucción de proteínas supresoras tumorales, favorecer la respuesta inmunológica antitumoral (promoviendo la respuesta Th-1 antitumoral), inhibir la angiogénesis, o evitar la aparición de infecciones crónicas por microorganismos asociados al proceso de la oncogénesis.

La identificación de los medicamentos anti-cancerosos implica un largo proceso farmacológico de búsqueda / evaluación, que se caracteriza inicialmente en ensayos de laboratorio y posteriormente mediante ensayos clínicos, para lograr finalmente su eventual aprobación por organizaciones especializadas del gobierno. Las variables clínico-farmacológicas valoradas en cada uno de estos potenciales agentes terapéuticos, corresponden particularmente a parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. Sin embargo para lograr mejores resultados de especificidad y eficiencia de las drogas anti-cancerosas, convendría que sus parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se relacionen con el perfil molecular del tumor, con la variabilidad genética-polimórfica del paciente y con los biomarcadores predictivos

/ pronósticos de respuesta, o de sobrevida. Los principales grupos de medicamentos indicados contra el cáncer son: quimioterapéuticos, como agentes alquilantes, cisplatino y sus análogos; antimetabolitos, agentes que interactúan con las topoisomerasas, antraciclinas y epipodofilotoxinas; agentes antimicrotúbulos y agentes misceláneos. Hormonoterápicos, como: moduladores de receptores estrogénicos, inhibidores de aromataza, antiandrógenos y otros; medicamentos dirigidos a blancos moleculares selectivos, como inhibidores de tirosina-cinasas (moléculas pequeñas), anticuerpos dirigidos a señales de transducción, otros anticuerpos monoclonales conjugados y no conjugados, inhibidores de histona-desacetilasas y agentes desmetilantes,⁵ inhibidores de proteosomas, agentes de bioterapia, interferones, interleucinas, agentes anti-angiogénicos, vacunas terapéuticas contra antígenos asociados al tumor y vacunas preventivas relacionadas con agentes virales con potencial oncogénico.

Uno de los tipos de tratamiento dirigidos a modificar blancos selectivos, particularmente las alteraciones epigenéticas en las células cancerosas corresponden a los inhibidores de histona-desacetilasas y a los agentes desmetilizantes. Los cambios epigenéticos asociados con el fenotipo celular tumoral son: graduales, progresivos y eventualmente reversibles; corresponden a alteraciones en la expresión de los genes relacionados con la transformación celular, principalmente al silenciamiento de la expresión de los genes supresores tumorales. Estas características hacen que las alteraciones epigenéticas sean un blanco potencial, para la intervención terapéutica y para el desarrollo de estrategias de prevención tumoral, al activar o reprimir la transcripción de genes específicos.

En esta revisión analizamos los principales aspectos fisiológicos y fisiopatológicos epigenéticos de las células normales y de las cancerosas; así como de los logros y perspectivas de la terapia epigenética en el tratamiento del cáncer.

Alteraciones epigenéticas que modifican la expresión de los genes relacionados con el cáncer. Silenciamiento epigenético de los genes supresores tumorales

La mayor parte de las veces, el cáncer se ha visto como una alteración primaria genética (se ha clasificado aproximadamente 15 genes mutados, conductores en cada tipo de cáncer); sin embargo en los últimos años se ha demostrado que diferentes alteraciones epigenéticas colaboran en la inducción de la transformación celular (Figura 1).

Una gran cantidad de datos indica la importancia de las alteraciones epigenéticas en el silenciamiento de genes supresores tumorales, particularmente en el crecimiento y

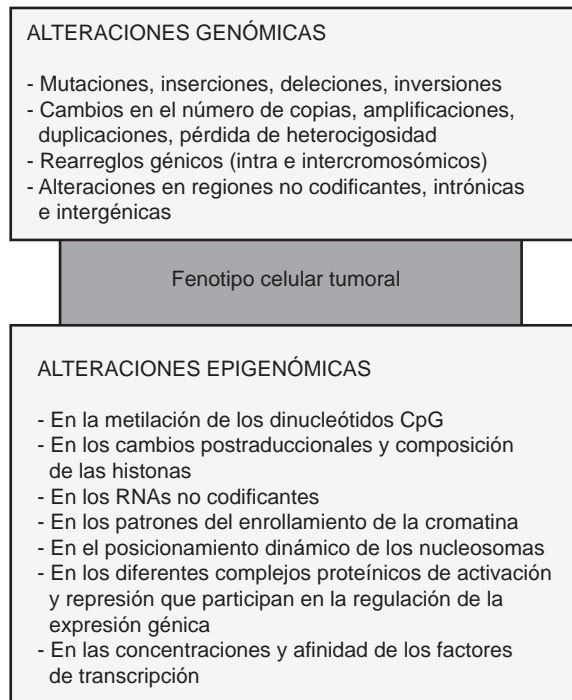


Figura 1. Las principales alteraciones genómicas y epigenómicas identificadas en las células tumorales.

diferenciación de las *stem cells*. Las alteraciones epigenéticas son en la célula cancerosa más predominantes que las alteraciones genéticas. El estudio de la epigenética del cáncer es actualmente prioridad de muchas organizaciones de investigación internacionales. En las células cancerosas se han encontrado numerosos cambios epigenéticos relacionados con el silenciamiento de genes supresores tumorales y con la activación de genes. Las alteraciones epigenéticas en las células pueden ser inducidas por estímulos endógenos y por factores ambientales. Los cambios epigenéticos que ocurren en el cáncer, a diferencia de los cambios genéticos, son de presentación gradual, eventualmente reversibles y con posibilidades de detección; esto hace que las alteraciones epigenéticas sean un blanco atractivo de intervención terapéutica y de prevención secundaria.^{6,7}

El epigenoma o estado equilibrado epigenético de las células normales está alterado en las células cancerosas por tres principales mecanismos: 1) hipermetilación de los promotores de los genes supresores tumorales (GST), e hipometilación global del DNA; 2) sobreexpresión e hiperactividad de las histonas-desacetilasas (HDAC) y 3) alteraciones en el remodelamiento de la cromatina. Estas epi-alteraciones, junto con una gran variedad de alteraciones genéticas, participan de manera importante en el inicio y progresión del cáncer, al inactivar a los GST y activar a los proto-oncogenes.⁸

La actividad de los genes está influida por las modificaciones epigenéticas, alteraciones químicas menores que modifican la expresión del DNA, sin alterar la estructura primaria del DNA o que alteran el soporte del DNA en la cromatina, a través de modificaciones menores en las histonas. Se ha identificado una gran variedad de compuestos carcinógenos epigenéticos (no muestran actividad mutagénica), como: dietilestilbestrol, el hexaclorobenceno, algunos compuestos de níquel y de arsénico.

Las alteraciones epigenéticas en los cánceres humanos provocan cambios en la expresión génica y en la estructura de la cromatina. Aunque la inestabilidad génica se ha considerado una marca del cáncer, no está totalmente aclarado si la desorganización cromosomal es causa o consecuencia de la tumorigénesis; algunos tipos de cánceres muestran mínima inestabilidad genómica, por lo que quizá la tumorigénesis se generó por cambios epigenéticos (metilación del DNA, modificaciones en las histonas, ubicación alterada del nucleosoma, alteraciones de los RNAs no-codificantes).

Las bases moleculares de la epigenética son complejas, involucran las modificaciones menores de la activación de ciertos genes, pero no de la base estructural de DNA. El perfil epigenético celular se hereda parcialmente cuando las células se dividen; sin embargo la mayoría de los cambios epigenéticos en las células diferenciadas, ocurren en el transcurso de las fases G_0/G_1 .

Las histonas constituyen el principal componente de la cromatina (el esqueleto en el cual el genoma eucariote se encuentra empaquetado) y están sujetas a muchos tipos de modificaciones postraduccionales. Éste “código de histonas” puede ser usado para dirigir y leer la información epigenética, a través de módulos complejos que identifican estos cambios postraduccionales de las histonas. El remodelamiento epigenético de la cromatina modifica las propiedades electroquímicas de la interfase DNA-cromatina y cambia la expresión génica; la acetilación de las histonas se asocia con activación de la transcripción, mientras que la metilación del DNA tiende a la desactivación de la transcripción. Al ocurrir múltiples modificaciones simultáneas en diferentes regiones génicas, se pueden provocar cambios significativos en la transcripción de múltiples genes.⁹

El inicio y la progresión del cáncer se desarrolla en un ambiente de anormalidades epigenéticas, junto con alteraciones genéticas. Existe en los cánceres humanos una fuerte relación entre las alteraciones de metilación del DNA y las modificaciones de la cromatina con la inestabilidad genómica. Las células malignas muestran alteraciones importantes en sus perfiles de metilación de DNA, particularmente hipermetilación en las regiones de los promotores génicos, e hipometilación global del DNA. La hipermetilación conduce a la pérdida de expresión génica, particularmente de los genes supresores tumorales reguladores del ciclo celu-

lar, de genes de reparación del DNA, de genes asociados con apoptosis, de regulación hormonal y de detoxificación de carcinógenos. La hipometilación genómica se presenta en diferentes tumores sólidos, que activan oncogenes como H-RAS, BORIS/CTCF, FGFR1, c-MYC, etc. Así, la hipermetilación de genes supresores, la hipometilación de oncogenes y de algunas secuencias repetitivas (por ejemplo: LINE1, Alu, otros transposones) son elementos principales para desarrollar la carcinogénesis.¹⁰

Algunas de las alteraciones en la metilación del DNA y en las modificaciones covalentes de las histonas en el cáncer, empezaron a identificarse desde hace una década^{8,10} por ejemplo la desacetilación y la metilación de lisinas específicas, como la lisina 9 y lisina 27 en la histona H3, participan en el silenciamiento de genes. Asimismo se demostró una asociación entre las modificaciones covalentes de las histonas con la metilación del DNA, encontrando que la metilación del DNA puede atraer localmente histonas-desacetilasas y complejos remodelantes de nucleosomas (junto con otras proteínas que se unen a DNA metilados, como MeCP2) en el proceso de compactación de la cromatina. Se han identificado, mutaciones en los genes que regulan el complejo de inicio del remodelamiento nucleosomal (SWI/SNF) en diferentes cánceres, las cuales favorecen la progresión del ciclo celular, que junto con la pérdida de *p53*, e inactivación de *p21* y *p16*, cooperan en la transformación oncogénica.

Alteraciones en la metilación del DNA en cáncer

De los tres mecanismos epigenéticos alterados en la oncogénesis, la metilación del DNA es el más estudiado. Las células cancerosas se caracterizan por la pérdida masiva global de la metilación en los dinucleótidos CpG del DNA (en islas de CpG, así como en los extremos o bordes de las islas), con disminución del 20-60% (hipometilación) y el aumento (hipermetilación) en algunos promotores. La pérdida de la metilación es debida principalmente a la desmetilación de secuencias repetitivas, de regiones codificantes y de regiones intrónicas. El grado de hipometilación se incrementa a través del proceso de progresión tumoral (menor en una lesión benigna, mayor en un cáncer invasor) y contribuye a la tumorigénesis de diferentes maneras: pérdida de la impronta (LOI) de algunos genes, hipometilación de secuencias repetitivas, activación de proto-oncogenes (los cuales se encuentran normalmente metilados) consecuentemente generación de la inestabilidad cromosomal, traslocaciones, reactivación de transposones y de secuencias virales endoparasitarias. En contraste la hipermetilación de las islas CpG, particularmente de los genes supresores tumorales es un factor causal de los estados iniciales y tardíos de la on-

cogénesis. El gen *Rb* fue el primer gen supresor tumoral identificado que es silenciado como resultado de la metilación de su promotor; condiciones similares fueron posteriormente encontrados en otros GST como MLH1 (cáncer de colon), p16^{INK4a} (cáncer broncogénico), BRCA1 (cáncer mamario), MGMT (glioblastoma) y VHL (cáncer renal).^{8,11} La hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras de los GST es una condición importante del origen de muchos cánceres. La hipermetilación ocurre en diferentes etapas del desarrollo del cáncer y en diferentes vías de señalamientos intracelulares, estos cambios interactúan con las alteraciones genéticas.

Las principales vías de señalamiento celular que se alteran son: la de la reparación del DNA, los señalamientos de RAS, del control del ciclo celular y de la apoptosis. Los perfiles de hipermetilación de las islas CpG son específicos para cada tipo de cáncer (100-400 CpGs en cada región promotora); sin embargo algunos tipos de cáncer, no presentan hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras genéticas.

Más recientemente se ha demostrado que algunos microRNAs, regulan la expresión de GST y de oncogenes, a través de modulación epigenética. La lista de los genes que son metilados y silenciados en los diferentes cánceres es amplia y continua creciendo. El silenciamiento epigenético de genes (epimutación) puede actuar como un primer evento molecular ("hit") o un segundo evento ("hit") en la hipótesis propuesta por Knudson sobre la inactivación de los GST, en la cual el segundo alelo puede ser inactivado por una mutación o eliminado a través de la pérdida de heterocigosidad, o ambos alelos pueden ser inactivados por epimutaciones.¹¹

La hipometilación del DNA en secuencias genómicas conduce a la inestabilidad genómica y favorece la formación de rearrreglos cromosomales anormales, por ejemplo: en pacientes con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), quienes cursan con inmunodeficiencia / inestabilidad de las regiones centroméricas / anormalidades faciales, en el cual la proteína mutada del gen DNMT3B, provoca la hipometilación del DNA y secundariamente la inestabilidad genómica. La hipometilación del DNA puede conducir, a la activación de genes que favorecen el crecimiento en diferentes cánceres como *R-RAS*, *MAP3K* (inhibidor de proteasas), *S-100*, *MAGE*, o provocar la pérdida de su impronta como del gen del factor de crecimiento II parecido a la insulina (*IGF2*, asociado con un mayor riesgo para desarrollar cáncer colorectal); particularmente la sobreexpresión de *IGF2* activa al receptor (EGFR), el cual se autofosforila acelerando las vías de señalamientos PI3K y GRB2 / RAS / ERK. En contraste la hipermetilación de sitios específicos, contribuye a la oncogénesis por el silenciamiento de GST, o genes reparadores de DNA, junto con algunos factores de transcripción.

Asimismo la hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras de los GST, se asocian con patrones de cambios covalentes de histonas represivas, para la transcripción génica (p. ej. metilación de las lisinas 9 y 27 de la H3). La hipermetilación del DNA en las regiones promotoras también puede reclutar complejos de proteínas como HDACs, HMTs, ó proteínas que se unen a las CpG-metiladas (MBD1, MBD2, MB4 y MeCP2, principalmente), las cuales provocan modificaciones epigenéticas en la cromatina. Algunos fármacos epigenéticos pueden parcialmente restaurar esta condición, retirando las marcas de represión e induciendo la presencia de marcas de activación (p. ej. acetilación de histonas).

Cambios en las modificaciones postraduccionales de las histonas en el cáncer

Las células cancerosas se caracterizan por la desregulación de las histonas-metil transferasas, de las histona-metiladas, por la sobre-expresión de las histona-desacetilasas (HDACs) y por la reducción global del nivel de las histonas-acetiladas (HATs). Las modificaciones de las histonas ocurren localmente en vecindad a los promotores génicos, principalmente por alteraciones de las enzimas que las modifican, conduciendo a una inadecuada expresión o represión de genes individuales que participan en la oncogénesis. Las alteraciones de las HATs y de las HDACs en el cáncer se deben a sobre-expresión, mutación o translocación de sus genes; diferentes alteraciones de las HDACs han sido encontradas en neoplasias hematológicas y en tumores sólidos. Avances recientes en el mapeo en los cambios que la cromatina y de las histonas que ocurren en la oncogénesis (determinados por espectrometría de masas) han revelado que la pérdida global de acetilación de la lisina 16 y de la trimetilación de la lisina 20 en las histonas 4 (H4K16ac y H4K20me3) junto con la sobre-expresión de BMI1 (componente represivo del complejo Polycomb-1) y de EZH2 (componente represivo del complejo Polycomb-2) son las alteraciones más comunes.¹¹ Además de la pérdida global de H4K16ac en las células cancerosas, se presentan pérdida de H3K4m3 y ganancia de H3K9me y H3K27m3 (marcas represivas). La actividad anormal y excesiva de las HDACs ocasiona una cromatina muy condensada y silenciamiento genético. Además de la desacetilación excesiva de las histonas, también se han identificado aumento en los patrones de metilación, como en H3K9 y H3K27 debido a sobre-expresión de las HMTs, lo que provoca el silenciamiento de GST.¹⁰

Otros cambios que se presentan durante la carcinogénesis corresponden a la alteración del complejo de proteínas Polycomb (PcG), la sobre-expresión del complejo represor Polycomb-2 (PRC2) se asocia al inicio del silenciamiento

de genes supresores tumorales y de algunos genes de factores de transcripción por medio de metilación del DNA; el PRC2 contiene histona-metiltransferasas (como la EZH2) que metilan la lisina 9 y 27 de la histona H3. Igualmente, el gen BMI1 componente del PRC1 (su proteína silenciosa a *p16*), se encuentra sobre-expresado en varios cánceres. BMI1 y EZH2 y otros miembros del complejo PcG participan en los primeros pasos de la iniciación de la carcinogénesis, afectando en las *stem cells* a los genes de vigilancia y control celular (*gatekeepers*) de la modulación epigenética. Así el silenciamiento inapropiado de estos genes, como APC y p16 en la vía de Wnt en cáncer de colon, bloquea su activación permitiendo la sobrevivencia anormal y la expansión celular clonal; este silenciamiento puede ser provocado por mutaciones de un alelo y por silenciamiento epigenético. Los cambios epigenéticos pueden, como lo hacen las mutaciones genéticas alterar múltiples vías de señalamientos intracelulares y promover la carcinogénesis.¹¹

Modificaciones en el remodelamiento de la cromatina

Las alteraciones del posicionamiento del nucleosoma, por los factores de remodelamiento del nucleosoma dependientes de ATP, también participan en el silenciamiento de GST en el cáncer y junto con la desacetilasa NuRD alteran la regulación del factor de transcripción PML-RARa en leucemias. NuRD también recluta a los complejos Polycomb y a la DNMT3A, lo cual permite mantener la metilación del DNA y con ello, su estado represivo.¹¹

Desregulación de los miRNAs en cáncer

Normalmente en el proceso de transcripción, el silenciamiento de genes involucra la participación de los miRNAs, los cuales controlan la expresión génica de una manera estable. Diferentes estudios que comparan el perfil de expresión de los miRNAs durante la oncogénesis con las células normales, demuestran cambios particularmente en los procesos de proliferación celular y apoptosis. Los cambios en la expresión de miRNA pueden actuar provocando alteraciones cromosómicas, uniones anómalas a diferentes factores de transcripción o alteraciones epigenéticas. Muchos miRNAs que suprimen la expresión de los genes que promueven el crecimiento celular son reprimidos en cáncer, por ejemplo los miR-15 y -16 cuyo blanco es el gen antiapoptótico BCL2, se encuentran hiporegulados en la leucemia linfocítica crónica; igualmente el let-7 cuyo blanco es el oncogen RAS es hiporegulado en cáncer broncogénico. En contraste otros miRNAs suprimen a genes supresores tumorales (miRNAs oncogénicos) y se encuentran sobrerregulados en cáncer, como miR-21 cuyo blanco es PTEN en

glioblastoma, miRNA-155 en cáncer mamario / neoplasias hematológicas y miR-17 –miR-92 en otros cánceres. La hipermetilación de las regiones 5'-reguladoras que expresan miRNA puede explicar la baja expresión de los miRNAs en algunos tumores, por ejemplo el silenciamiento del miR-124a favorece la activación del oncogén *CDK6*. La interferencia de la expresión génica por RNAs no codificantes ha permitido identificar que diferentes miRNAs modulan directa o indirectamente la actividad de la maquinaria epigenética, éstos pueden servir tanto como biomarcadores de procesos biológicos alterados o como blancos para terapias dirigidas. Particularmente la represión epigenética de los miRNAs-supresores tumorales puede ser revertida por el tratamiento con inhibidores de HDACs y de DNMTs (lo cual se ha demostrado por la reactivación de GST en modelos preclínicos).^{12,13}

Modificaciones epigenéticas como biomarcas potenciales en la detección temprana, pronóstico y progresión de algunos cánceres

La identificación de las alteraciones en los patrones de la metilación del DNA, de las modificación postraduccionales de las histonas y de la expresión de miRNAs asociados al desarrollo y progresión del cáncer tienen un potencial uso clínico (Cuadro I). Los patrones de metilación del DNA han sido explorados en clínica y en numerosos estudios de epidemiología molecular como eventuales factores pronósticos / predictivos de respuesta al tratamiento.^{5,8,14} Así por ejemplo el gen de la glutatión S-transferasa (*GSTP1*) se ha encontrado hipermetilado en el 80-90% de los pacientes con cáncer de próstata (pero no en hiperplasia prostática).^{15,16} La hipermetilación de las islas CpG como biomarcador puede ser determinado en células cancerosas no solo en biopsias de tejidos, sino también en fluidos biológicos. La hipermetilación del promotor del gen *p16^{INK4a}* ha sido reportado como una biomarca de detección temprana del cáncer broncogénico, la cual fue determinada en esputo de fumadores, condición similar ha sucedido en cáncer colorectal, cuyo marcador se detecto en heces fecales.^{17,18} La hipermetilación de los promotores de otros GST como DAPK, *p15^{INK4b}*, *HIC1*, *CDH1* y *ER* predicen mal pronóstico en pacientes con diferentes cánceres; por el contrario, en pacientes con glioblastoma, la hipermetilación del promotor del gen *MGMT* se asocia a la respuesta clínica del tratamiento con temozolomida.¹⁹ Determinaciones recientes empiezan a identificar otros genes epigenéticamente alterados en diferentes tumores sólidos, como por ejemplo en cáncer de ovario,²⁰ en el cual 30 genes se encontraron hiporegulados y 6 genes sobrerregulados; en éste estudio los patrones de metilación de algunos genes se asociaron frecuentemente con las ca-

racterísticas moleculares, clínicas e histopatológicas de los subtipos de carcinomas de ovario.

Aunque muchas alteraciones en los patrones de metilación del DNA han sido reportados como biomarcadores en cáncer, también han sido identificados diferentes patrones de cambios postraduccionales en las histonas relacionados, a la predicción de recurrencia tumoral²¹ por ejemplo: el nivel de las isoformas de las HDACs y el patrón de histonas acetiladas ha demostrado un gran potencial en predecir la respuesta clínica al tratamiento, posterior a la utilización de inhibidores de las HDACs como terapia epigenética. Seligson et al.,²² demostraron que algunas modificaciones covalentes específicas de las histonas fueron indicadores clínicos pronósticos en adenocarcinomas de diferentes orígenes; estudiaron colecciones de tejidos tumorales conservados en parafina de carcinomas de pulmón, de riñón y de próstata, por medio de estudios de inmunohistoquímica (anticuerpos anti-histonas, p. ej. antiH3K18ac), encontrando que los niveles bajos de H3K4me2 y de H3K18ac en cánceres de pulmón / riñón y niveles bajos de H3K9me2 en cánceres de próstata / riñón, se asociaron con fenotipos tumorales más agresivos y los pacientes cursaron con menores sobrevividas. En un estudio parecido al anterior de pacientes con adenocarcinomas pancreáticos resecables, Manuyakorn et al.,²³ obtuvieron resultados similares, particularmente en los pacientes que recibieron tratamiento adyuvante con fluorouracilo.

Recientemente se ha investigado la expresión diferencial de miRNAs en relación a la progresión y al comportamiento clínico agresivo en diferentes subtipos de tumores, encontrando que el perfil de la metilación de los genes que expresan miRNAs fueron indicadores pronósticos / predictores de respuesta al tratamiento con quimioterapia y de supervivencia global.²⁴ La superación progresiva de las tecnologías que analizan el epigenoma está conduciendo al establecimiento de asociaciones farmacoepigénicas en diferentes tipos de cáncer; la determinación del perfil epigenético del tumor y los parámetros farmacocinéticos de las epidrogas contra el cáncer en los pacientes, permiten mejorar la selección terapéutica.^{25,26}

Debido a que diferentes estudios han demostrado asociaciones significativas entre algunas modificaciones epigenéticas de genes o grupos de genes específicos relacionados al desarrollo y progresión del cáncer, recientemente han surgido algunas empresas biotecnológicas privadas que exploran esas modificaciones epigenéticas (p. ej. de *MGMT*, *GSTP1*, *p16^{ink4A}*), como Oncomethylome Sciences, Epigenomics AG, Sequenom y otras.⁵ Sin embargo en la actualidad ningún marcador epigenético ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) o la European Medicines Agency (EMA) para aplicación clínica. Se requieren de

Cuadro I. Biomarcas epigenéticas de genes específicos con impacto potencial clínico en la iniciación o progresión del cáncer

Nombre del gen	Cambio epigenético	Tipo de cáncer	Asociación clínica	Referencias
<i>GSTP1, EN1, SCTR</i>	Hipermetilación	Cáncer de próstata (biopsia/orina)	Detección temprana	15, 16
<i>p16INK4a</i>	Hipermetilación	Diferentes tipos de cánceres (en biopsia o fluidos biológicos)	Detección temprana y pronóstico	17, 18
Genes relacionados con apoptosis (<i>DAPK, p73</i>)	Hipermetilación	Diferentes tipos de cánceres	Pronóstico	7, 29
Genes relacionados con la adhesión celular (<i>ADAM 23, ADAM 33</i>)	Hipermetilación	Diseminación metastásica	Progresión	6, 8
Genes relacionados con la reparación del DNA (<i>MGMT, hMLH1, BRCA1</i>)	Hipermetilación	Diferentes tipos de cáncer	Predicción postratamiento	19, 28
<i>MGMT</i>	Hipermetilación	Glioblastoma	Predicción post temozolomida	19
Diferentes histonas	Patrones de acetilación y metilación	Diferentes tipos de cáncer	Predicción postratamiento	22, 23, 36, 40

estudios confirmatorios que demuestren su asociación en series más numerosas de pacientes.

El potencial de la terapia epigenética

El objetivo de la terapia epigenética es revertir las alteraciones epigenéticas causales que ocurren en el cáncer, conduciendo al restablecimiento del “epigenoma normal”, sin embargo una limitante de este enfoque terapéutico es que actualmente tiene baja especificidad.^{5,14,27,28} Las drogas epigenéticas usadas actualmente son inespecíficas y ocasionan efectos colaterales parecidos a los que son provocados por la quimioterapia convencional. En oposición a las lesiones genéticas en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles (a diferencia de las mutaciones) por un grupo de moléculas pequeñas, llamadas epidrogas, cuyo blanco son las enzimas que modifican al DNA y a las histonas. En particular los blancos epigenéticos en el tratamiento del cáncer se han enfocado a las DNA-metiltransferasas y a las histona-desacetilasas (Cuadro II); el empleo terapéutico de ambos tipos de epidrogas ha demostrado un efecto sinérgico y asimismo pueden sensibilizar que las células cancerosas respondan a otras variedades terapéuticas farmacológicas.²⁵

Inhibidores de DNA-metiltransferasas (DNMT)

Las epidrogas aprobadas actualmente de este tipo son la 5-azacitidina (vidaza) y la 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina), inhibidores de DNMT, las cuales son bioquímicamente análogos de nucleósidos pirimidínicos. Estos nucleósidos se incorporan al DNA (el ribonucleósido azacitidina también se incorpora al RNA) de las células en proliferación e inhiben su metilación al bloquear a las DNA-metiltransferasas. Aunque su mecanismo de acción no es totalmente conocido, el tratamiento de los pacientes con estos medicamentos provoca la hipometilación global del DNA. La 5-azacitidina y la 5-aza-2'-deoxicitidina han sido aprobadas por la FDA y la EMEA para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos (condición pre-leucémica, como anemia refractaria), por su efecto supresor del crecimiento y de proliferación de la células mieloides. Los estudios clínicos del uso de la 5-azacitidina y la 5-aza-2'-deoxicitidina demostraron mejorías clínicas (60%) comparadas con los tratamientos convencionales en los pacientes con síndromes mielodisplásicos con alto riesgo para progresión / transformación a leucemia mielóide aguda con sobrevividas esperadas menores a un año.²⁹⁻³² Otros análogos de nucleósidos que se encuentran en evaluación en ensayos clínicos fase I y II son la 5-fluoro-2'-deoxicitidina y el zebularine, ambas son epi-

Cuadro II. Drogas epigenéticas aprobadas por la Food and Drug Administration y la European Medicines Agency para el tratamiento del cáncer

Nombre	Blanco molecular	Tipo de cáncer	Referencias
5-azacitidina* (Vidaza)	Inhibidor de DNA-metil transferasas	Síndromes mielodisplásicos	30,31
5-aza-2'deoxicitidina* (Decitabine)	Inhibidor de DNA-metil transferasas	Síndromes mielodisplásicos	32
Vorinostat* (Zolinza)	Inhibidor de las histonas-desacetilasas (clase I y II)	Linfoma cutáneo de células T	37,38
Romidepsin* (Istodax)	Inhibidor selectivo de las histonas-desacetilasas 1 y 2 (clase I)	Linfoma cutáneo de células T	39

*Actualmente se encuentran en ensayos clínicos fase II-III para el tratamiento de tumores malignos sólidos, combinados con otras estrategias terapéuticas.

drogas probablemente más estables en solución acuosa, menos tóxicas y más selectivas para las células cancerosas. De manera similar drogas no-análogos de nucleósidos, como el hidralazina, la procainamida, la epigalocatecina y la RG108 se encuentran en evaluación. Datos preliminares indican que la combinación secuencial o simultánea de inhibidores de HDACs con agentes hipometilantes que muestran resultados promisorios en pacientes con síndromes mielodisplásicos y con leucemia mieloide aguda.

El mecanismo por el cual los análogos de nucleósidos ejecutan su efecto puede dividirse en aquellos relacionados con la inhibición de las DNMTs y otros no relacionados con la desmetilación del DNA.^{26,33} La vidaza y el decitabine empleados a altas concentraciones forman uniones (aductos) irreversibles entre el DNA y las enzimas correspondientes provocando efectos citotóxicos celulares; al emplear estos análogos a menores concentraciones, desmetilan los GST (particularmente durante la replicación del DNA en la fase S) bloqueando funcionalmente a las enzimas DNMTs. Otros de los efectos biológicos que los análogos de nucleósidos provocan sobre las células tumorales son su diferenciación o su apoptosis, re-expresión de los GST, modulación de la respuesta inmunológica y modulación de algunas vías intracelulares de señalamientos como Wnt y TGFβ.³⁴ La 5-azacitidina induce apoptosis en síndromes mielodisplásicos, mientras que la 5-aza-2'deoxicitidina induce preferentemente la diferenciación en células leucémicas y apoptosis en células de linfoma de Burkitt. Además de que una gran cantidad de genes son hiporegulados posterior al tratamiento con inhibidores de DNMTs, estos inhibidores pueden también aumentar la expresión de microRNAs (como el microRNA-101, el cual reprime la EZH2 y reduce la H3K-27triM) modificando el epigenoma independientemente de provocar solo la metilación del DNA.^{8,28,33}

Inhibidores de histona-desacetilasas (HDACs)

Los cambios postraduccionales de las histonas son condiciones más factibles de modificar, comparativamente a las de metilación del DNA (modificaciones más estables). Los inhibidores de las HDACs modifican la expresión de los genes, en lugar de ejercer un efecto citotóxico directo. El restablecimiento de los patrones normales de acetilación de histonas, ha demostrado su efecto antitumoral al detener *in vitro* el crecimiento, inducir diferenciación y apoptosis, suprimir la angiogénesis y aumentar la respuesta inmunológica antitumoral.^{5,35,36} El efecto antiproliferativo de los inhibidores de HDACs es mediado por su capacidad de reactivar los genes supresores tumorales y por modificar diferentes vías de señalamientos, como la de NF-kB y E2F1. La acción de los inhibidores de las HDACs para alterar la transcripción depende de la modificación en el balance acetilación / desacetilación de residuos específicos en las histonas. En la actualidad una gran cantidad de inhibidores de HDACs se encuentran en evaluación en ensayos clínicos. El primer inhibidor natural de HDACs identificado fue el Trichostatin A, sin embargo clínicamente muestra elevada toxicidad. La FDA ha aprobado solamente dos inhibidores de HDACs como terapia epigenética en el cáncer, el ácido hidroxámico suberoilánilido (SAHA), también conocido como vorinostat y el romidepsin. El vorinostat (SAHA) es un inhibidor de las HDAC1, HDAC2, HDAC3 y de la HDAC6, que mantiene la acetilación de histonas y de otras proteínas como algunos factores de transcripción y secundariamente la expresión de diferentes GST. El vorinostat está indicado a dosis de 400 mg vía oral / 24 horas en pacientes con linfoma cutáneo de células T con enfermedad progresiva, persistente o recurrente; en un estudio fase IIB de 74 pacientes conducido por Olsen et al., el 30% de ellos

presentaron respuesta objetiva.^{37,38} Más recientemente el romidepsin (depsipéptido), también ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma cutáneo de células T avanzado, por haber demostrado tasas significativas de respuesta clínica y de duración, el blanco del romidepsin es más selectivo.³⁹

La mayoría de los inhibidores de HDACs han sido diseñados para interferir en el dominio catalítico de las HDACs, bloqueando el reconocimiento de su sustrato y por esto mantienen a las histonas acetiladas e inducen la expresión génica. Diferentes isoformas de HDACs se asocian a diferentes cánceres, la mayoría de los inhibidores actuales solo afectan las clases I y II de las HDACs. Los inhibidores de las HDACs de acuerdo a sus propiedades químicas pueden dividirse en el grupo parecido a ácidos grasos de cadena corta (p. ej. ácido valproico, butirato de sodio) y el grupo de ácidos hidroxámicos (p. ej. vorinostat, trichostatin A) y en relación al efecto inhibitorio que ejercen sobre una o distintas clases de HDACs pueden dividirse en inhibidores de actividad específica (p. ej. romidepsin), o de actividad múltiple (p. ej. vorinostat).

Combinación de inhibidores de DNMT e inhibidores de HDACs, con medicamentos de quimioterapia

La combinación de inhibidores de HDACs como vorinostat, con inhibidores de DNMTs como decitabine ha demostrado mayor efectividad terapéutica.¹⁰ Su empleo provoca efectos sinérgicos con una gran cantidad de drogas de quimioterapia, como paclitaxel, gemcitabine, cisplatino, etoposido y doxorubicina. Los resultados en diferentes ensayos clínicos muestran mejores resultados al emplear los inhibidores de HDACs antes de la iniciación de la quimioterapia.^{10,29} Vorinostat también logra efectos sinérgicos con imatinib, disminuye el daño agudo / crónico de la piel y la carcinogénesis posterior al tratamiento con radioterapia.

Particularmente la combinación terapéutica de inhibidores de HDACs con inhibidores de DNMTs en pacientes con carcinoma mamario que han desarrollado resistencia al tratamiento antiestrogénico debido a la supresión de la expresión del receptor estrogénico alfa (ER α), ha logrado el restablecimiento de la actividad del ER α .^{10,40-42} Como es conocido, las pacientes con los tumores mamaros que no expresan ER α (y otras biomarcas, como falta de expresión de receptores de progesterona y amplificación de HER-2), presentan un comportamiento clínico agresivo y peor pronóstico, ya que son resistentes a la terapia antiestrogénica y a menudo a la quimioterapia; en cambio aquellas pacientes con tumores que expresan ER α responden generalmente al tratamiento antiestrogénico y presentan sobrevividas globales más prolongadas. Esta estrategia terapéutica induce la ex-

presión de ER α , disminuye parcialmente los señalamientos iniciados por HER-2 y las pacientes mejoran la respuesta clínica. Eventualmente similares estrategias podrían aplicarse en pacientes con carcinomas de próstata y endometrio.

Como hemos mencionado los miRNAs que participan en la regulación epigenética, también representan un blanco potencial en la terapia epigenética. La introducción de miRNAs sintéticos que remeden a los miRNAs-supresores tumorales dentro de la célula tumoral, reprimirían potencialmente oncogenes y activarían GST. Una de las limitantes del uso de miRNAs sintéticos corresponde a su escasa capacidad de penetración celular, por lo que es de suma importancia desarrollar vehículos nanométricos que faciliten la entrega de éstos miRNAs sintéticos a las células tumorales.^{13,43}

Perspectivas

La revolución epigenética ha llegado al campo de la Biología en las últimas décadas. Los mecanismos epigenéticos globales identificados en el desarrollo embrionario y en el cáncer han ayudado a iniciar el entendimiento de nuevos aspectos fisiológicos y fisiopatológicos de la diferenciación celular, transformación neoplásica y de los eventos moleculares que suceden en enfermedades crónicas. El conocimiento más profundo de las modificaciones epigenéticas en cada tipo de cáncer,⁴⁴ permitirá diseñar mejores estrategias de tratamiento. El reto para los investigadores en este campo es diseñar drogas más específicas y con menores efectos colaterales.

Múltiples evidencias han demostrado que las alteraciones de los complejos patrones epigenéticos, que involucran la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas y el balance de los RNAs-no codificantes contribuyen a la iniciación y progresión de diferentes cánceres e igualmente participan en la resistencia al tratamiento farmacológico, por lo que sus perfiles epigenéticos pueden contribuir como biomarcadores indicadores de comportamiento biológico-clínico, o como blancos moleculares en el diseño de estrategias de intervencionismo terapéutico.

La escasa lista de epimutágenos ambientales identificados en la actualidad se incrementará próximamente de acuerdo a los estudios de epidemiología molecular epigenética.⁴⁵ Los epimutágenos son capaces de silenciar los genes supresores tumorales, activar oncogenes, alterar el control del ciclo celular, provocar defectos en la reparación del DNA y alterar la detoxificación de carcinógenos. Será de gran utilidad identificar si los eventos genéticos o epigenéticos, corresponden a los cambios iniciales o secundarios debidos a la exposición de carcinógenos / epimutágenos ambientales, lo cual permitiría establecer nuevas estrate-

gias en la prevención del cáncer. Podría evitarse o reducir la exposición de epimutagenos contenidos en la dieta, en el ambiente o aquellos relacionados a factores específicos de estilos de vida (prevención primaria). Las drogas epigenéticas podrían ser factores determinantes en la prevención secundaria del cáncer en individuos con alto riesgo a desarrollarlo.

El manejo de los estados epigenéticos anormales dirigido a evitar el desarrollo temprano y la progresión del tumor es una estrategia lógica de tratamiento. No hay duda de que la combinación de la terapia farmacológica convencional del cáncer con el uso de la terapia genética / epigenética, logrará un mayor éxito en el tratamiento de las neoplasias hematológicas y sólidas. Dada la importancia de los mecanismos epigenéticos en la iniciación y progresión del fenotipo tumoral, su manipulación podría revertir dichos procesos y aumentar la eficiencia clínica en la prevención y el tratamiento, particularmente provocando menor toxicidad y efectos colaterales. La combinación de la convencional farmacoterapia con la terapia genética / epigenética basadas en el perfil molecular del tumor y del paciente se acercan al objetivo de lograr tratamientos integrales personalizados.

Son necesarios una serie de pasos para lograr una terapia epigenética eficiente en los pacientes con cáncer: disponer de tecnologías epigenómicas de amplia cobertura y elevada reproducibilidad; identificar los patrones epigenéticos en las etapas iniciales, intermedias y avanzadas en cada una de las neoplasias malignas (como biomarcas de cada tipo y estado tumoral comparadas con sus células normales); entender integralmente los diversos mecanismos moleculares que provocan las epidrogas disponibles en la actualidad y superar sus impedimentos (falta de especificidad hacia los genes, actuar solo en células en división, entre otros); determinar los perfiles genómicos y epigenómicos de cada tumor individual, e integrarlos al perfil clínico del paciente, con lo cual se podrán analizar las principales diferencias clínico-moleculares de la relación tumor-paciente y conducir a seleccionar una combinación terapéutica más congruente. Todo ello permitirá emplear combinaciones de tratamientos convencionales, genómicos y epigenómicos más eficientes para obtener mejores resultados.

Conclusiones

El entendimiento de los mecanismos moleculares epigenéticos involucrados en la iniciación y en la progresión tumoral en los diversos tipos de cáncer, tiene un enorme potencial para emplearlos como estrategias de prevención secundaria, como marcadores clínicos y/o como blancos terapéuticos.

Referencias

1. Wang ET. AI road map of cancer systems biology. In Wang E, editor. *Cancer Systems Biology* London: CRC Press;2010 p. 3-22.
2. Van der Brug MP, Wahlstedt C. Navigating genomic maps of cancer cells. *Nat Biotechnol* 2010;28:241-242.
3. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Gen* 2010;11:685-696.
4. Feinberg AP. Epigenomics reveals a functional genomic anatomy and a new approach to common disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1049-1052.
5. Costa FF. Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag Res* 2010;2:255-265.
6. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
7. Lambert MP, Herceg Z. *Epigenetics and cancer*, 2nd IARC meeting, Lyon, France. *Mol Oncol* 2008;2:33-40.
8. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. *Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications*. *Clin Cancer Res* 2009;15:3927-3937.
9. Halušková J. *Epigenetic Studies in Human Diseases*. *Folia Biol (Praha)* 2010;56:83-96.
10. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1409-1420.
11. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
12. Marquez RT, McCaffrey AP. Advances in MicroRNAs: implications for gene therapists. *Human Gene Ther* 2008;19:27-38.
13. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic MicroRNA strategies in human cancer. *AAPS J* 2009;11:747-757.
14. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 2009;100:571-577.
15. Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC, Nelson D, Walk EL, Tangrea JA. The Usefulness of the Detection of GSTP1 Methylation in Urine as a Biomarker in Diagnosis of Prostate Cancer. *J Urol* 2008;179:508-511.
16. Daveney J, Stirzaker C, Qu W, Song JZ, Statham AL, Patterson KI, et al. Epigenetic Deregulation Across Chromosome 2q14.2 Differentiates Normal from Prostate Cancer and Provides a Regional Panel of Novel DNA Methylation Cancer Biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:148-159.
17. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res* 2006;66:3338-3344.
18. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Carlsson G, Gustavsson B. p16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol Med* 2008;14:412-421.
19. Hegi ME, Diserens AC, Gorilla T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
20. Asadollahi R, Hyde CA, Zhong XY. Epigenetics of ovarian cancer: from the lab to the clinic. *Gynecol Oncol* 2010;118:81-87.
21. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005;435:1262-1266.
22. Seligson DV, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, et al. Global levels of histone modifications Predict Prognosis in Different Cancers. *Am J Pathol* 2009;174:1619-1628.
23. Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, Dawson NA, Tze S, Cheung-Lau G, et al. Cellular Histone Modification Patterns Predict Prognosis

- and Treatment Response in Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: Results From RTOG 9704. *J Clin Oncol* 2010;28:1358-1365.
24. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13556-13561.
 25. Loss LA, Sadanandam A, Durinck S, Nautiyal S, Flaucher D, Carlton VEH, et al. Prediction of epigenetically regulated genes in breast cancer cell lines. *BCM Bioinformatics* 2010;11:305.
 26. Roukos DH. Novel clinico-genome network modeling for revolutionizing genotype-phenotype-based personalized cancer care. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:33-48.
 27. Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2009;625:131-142.
 28. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones P. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 2010;28:1069-1078.
 29. Stresemann C, Bockelmann I, Mahlkecht U, Lyko F. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2998-3005.
 30. Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 2005;11:3604-3608.
 31. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom JT, Beach CL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006;24(24):3895-3903.
 32. Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1472-1481.
 33. Bonifer C, Bowen DT. Epigenetic mechanisms regulating normal and malignant haematopoiesis: New therapeutic targets for clinical medicine. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e6.
 34. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res* 2011;21:502-517.
 35. Stimson L, Wood V, Khan O, Fotheringham S, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Annals Oncol* 2009;20:1293-1302.
 36. Ma XJ, Ezzeldin HH, Diasio RB. Histone deacetylase inhibitors. Current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* 2009;69:1911-1934.
 37. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:3109.
 38. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 2007;12:1247-1252.
 39. Whittaker SJ, Demierre MF, Kim EJ, Rook AH, Lerner A, Duvic M, et al. Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28:4485-4491.
 40. Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ. Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009;15:3958-3969.
 41. Dalvai M, Bystricky K. The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:19-33.
 42. Thomas S, Munster PN. Histone deacetylase inhibitor induced modulation of anti-estrogen therapy. *Cancer Lett* 2009;280:184-191.
 43. Nicolas FE, Lopez-Gomollon S, Lopez-Martinez AF, Dalmay T. Silencing Human Cancer: Identification and Uses of MicroRNAs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2011;6:94-105.
 44. van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1381-1391.
 45. Ulrich CM, Gracy WM. Linking epidemiology to epigenomics—where are we today? *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3:1505-1508.