Epigenética en el cáncer humano (clase impartida por Manel Esteller)

Por Mauricio Lema Medina MD

"The causal interaction between genes and their products, which bring the phenotype into being"

CH Waddington, 1939

Sugiero la lectura de la revisión del mismo autor en: **Esteller, M. Epigenetics in Cancer. N Engl J Med 2008;358:1148-59**. En azul se escribe lo que NO fue dicho explícitamente en la clase, y que fue extractado del artículo que acabo de mencionar. En este color escribo anotaciones propias, no referenciadas. En negro escribo lo que dijo el ponente en la clase.

La **epigenética** es la herencia de la actividad genética que no depende de la secuencia nucleotídica. Puede ocurrir en los gametos, o en las células somáticas.

La epigenética (junto con los polimorfismos, que son genéticos) ayuda a explicar las diferencias entre los diversos individuos de una misma especie. Las diferencias epigenéticas, adquiridas durante la vida, entre los gemelos monozigóticos explican diferencias en el fenotipo, así como diferencias en la susceptibilidad a enfermedades como el cáncer. Mientras más alejados estén los gemelos monozigóticos, mayor va a ser la diferencia en su epigenoma. Hay varios niveles de modificación epigenética: **metilación de DNA, modificación de histonas** y **RNA no codificante**.

Metilación de DNA

El marcador epigenético más conocido es la metilación de DNA. La metilación de DNA cumple funciones críticas en el control de la actividad génica y en la arquitectura del núecleo de las células normales. En humanos, la metilación de DNA ocurre en las citosinas que preceden a las guaninas; estos dinucleótidos se denominan CpGs. Los CpG están distribuidos en grupos denominados islas CpGs, concentrados en los extremos 5' de las regiones reguladoras de varios genes. La mayoría de las islas CpGs NO están metiladas en las células normales. La metilación de DNA es importante para el control de ciertos genes tejido-específicos como MASPIN (un inhibidor de proteasa sérica), MAGE (que sólo se expresan en tejidos tumorales); así como en el imprinting genómico y en la inactivación de una parte del cromosoma X en mujeres. La hipermetilación de secuencias genómicas repetitiva probablemente evita inestabilidad cromosomal, translocaciones y etc. De hecho, las células que no tienen actividad de las enzimas que producen las metilaciones (DNMTs) exhiben abnormalidades nucleares prominentes. La investigación epigenética requiere de poderosas técnicas para el estudio de la metilación del DNA como PCR asociada a modificación de bisulfito de sodio.

Metilación de DNA y cáncer

Dos anormalidades caracterizan la metilación de DNA y el cáncer: **hipometilación global** y la **hipermetilación de las islas CpG de los genes supresores de tumores (TSG).**

Hipometilación global de DNA en cáncer

Inicialmente, se identificó una hipometilación global en los tumores humanos. Los genes hipometilados incluyen secuencias repetitivas de DNA, de regiones codificantes e intrones., así como mRNA alternativos a los que normalmente se transcriben. La hipometilación de DNA favorece la formación de cáncer al fomentar la inestabilidad cromosomal (a través de recombinación y translocación), reactivación de trasposones, y la pérdida del imprinting. Ejemplo de genes hipometilados en cáncer con relevancia, incluyen el PAX2 y el miRNA let-7a-3 que son importantes en cáncer de endometrio y colon.

Inactivación de los TSG

Otro hallazgo frecuente en cáncer es la hipermetilación de las islas CpG que inactivan los TSGs. La metilación de los promotores causan el silenciamiento de los genes. Se ha visto que este es un mecanismo importante para genes como el Rb, VHL, p16, hMLH1, BRAC1, MGMT etc. Las metilaciones aberrantes son cáncer específicas (ca mama es diferente a gliomas, etc). No se sabe el mecanismo por el que unas islas son hipermetiladas y otras no en cáncer. Se conoce un mecanismo por el que las histonas marcan a un gen para la metilación al unirse al EZH2 en su promotor. Este mecanismo también explica el silenciamiento del p16 en cáncer de colon. La hipermetilación de GSTP1 (Glutatión S-Transferasa) en presencia de incremento del PSA puede útil para diferenciar cáncer de próstasta de hiperplasia prostática. El 80-90% de los pacientes con cáncer de próstata tienen hipermetilada esta proteína, en tanto que su hipermetilación es rara en pacientes con hiperplasia prostática benigna (Rodriguez-Paredes and Esteller, Nature Medicine, 2011).

Modificación de Histonas

Las histonas permiten la compactación de los 2 metros de DNA que tiene cada célula. Dicha compactación es tejido específico. Las histonas no son proteínas inertes sino que cumplen funciones biológicas importantes que son moduladas por modificaciones como metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, etc. Además, las metilaciones pueden ser mono-, di- o trimetliaciones. La acetilación y metilación de histonas pueden afectar diversos procesos, que incluyen la transcripción, reparación de DNA, replicación de DNA y la organización de los cromosomas. En general, **la acetilación de histonas implica la activación transcripcional**. En cambio, la metilación de histona tiene efectos que dependen de residuo de aminoácido y la posición en la cadena de histona donde ocurre. La hipermetilación de las islas de CpG en los promotores de TSG en cáncer se asocian a una particular combinación de marcadores de histonas: desacetilación de las histonas H3 y H4, pérdida de la trimetilación de la H3K4, ganancia en la metilación de la H3K9 y trimetilación de la H3K27. Cuando las histonas H3 y H4 son hipoacetiladas e hipermetiladas se produce el silenciamiento de TSG

como el p21, aún en ausencia de hipermetilación en su isla CpG. Es frecuente observar en cáncer la pérdida de la monoacetilación y la timetilación de la histona H4 en los residuos Lys16 y Lys20, respectivamente. Se han observado en cáncer de mama y hepatocarcinoma. Otros cambios similares se observan en cáncer de próstata. Desde el punto de vista metodológico las modificaciones de histonas requieren de técnicas sofisticadas como espectrometría de masas.

Factores epigenéticos y miRNA

El RNA no codificante es cada vez más importante en la biología. Los miRNA son genes cortos (22-nucleótidos) que no se traducen y que hibridizan con mRNAs silenciando su traducción. Los miRNA pueden estar hipoexpresados en cáncer por hipermetilación de sus reguladores en el extremo 5'. Es así como los miRNA tienen funciones de TSGs. Por ejemplo, una disminución en la expresión de los let-7 y miR-15/miR-16 que afectan los mRNAs de RAS y BCL2, respectivamente. Además de RNA no codificantes, existen muchos otros genes no codificantes de función compleja. En el cáncer de colon la DNMTs están afectadas con frecuencia causando hipometilación de miRNAS supresores de tumores. Otro ejemplo es el silenciamiento epigenético del miR-124a que culmina con la activación del oncogen CDK6 en varios tumores.

Los PIWIL2 y los TRD1 se encuentran casi exclusivamente en los testículos. La infertilidad masculina puede ser explicada por metilación aberrante del promotor de PIWI. No sé que función cumple esta aseveración en el discurso global de la conferencia.

Epigenética y cáncer

Gran variedad de ejemplos llevan al Dr. Esteller a postular que muchos de los tumores se originan en daños de la maquinaria epigenética como los genes que remodelan la cromatina (ARID1A), modificadores de histonas, TET2, EZH2, DNMT3A, PBRM1, etc. Las alteraciones de estos genes van a causar modificaciones en el epigenoma que pueden ser de importancia patogénica para el fenotipo oncológico.

A continuación, se describen algunos ejemplos de alteraciones epigenéticas puntuales de gran relevancia en oncología.

06-MGMT (Metil guanina metil transferasa)

La MGMT es un gen reparador de DNA, que específicamente es capaz de reparar el daño causado por los agentes alquilantes (como la Temozolomida o Dacarbazina). En 30-40% de pacientes con Glioblastoma se ha observado que hay hipermetilación del promotor del MGMT que causa su sileneciamiento. Se ha observado que el silenciamiento del MGMT es un factor predictor de respuesta mayor a terapia con Temozolomida en Glioblastomas. Pero la hipermetilación del promotor del MGMT no es exclusiva de los gliomas. Se observa también en: cáncer testicular (más de 40%), cáncer de colon (30-40%), retinoblastoma (30-40%), cáncer de cabeza y cuello (30-40%), y en casi un cuarto de pacientes con cáncer de cérvix uterino (20-30%), linfoma (20-30%), cáncer de pulmón (20-30%), esófago (20-30%), y estómago (10-20%), etc. Curiosamente, el cáncer de testículo es el tumor con más alta respuesta a la

quimioterapia. Se ha observado que pacientes con cáncer de colon avanzado con respuesta a dacarbazina son los que tienen hipermetilación del 06-MGMT.

BRCA1

El gen BRCA1 es importante para la reparación de rupturas de DNA de doble cadena por recombinación homóloga (como ya fue visto en otros apartes del curso). La mutación (inactivante) del BRCA1 en la línea germinal explica una gran cantidad de cánceres hereditarios de mama y ovario. Sin embargo, en cánceres de mama esporádicos es frecuente encontrar la pérdida de la heterozigocidad que incluye el locus del gen (cromosoma 17q21). Sin embargo, RARA vez se encuentra mutación en alelo BRCA1 que queda. Se ha observado que hay silenciamiento epigenético del mismo por hipermetilación del promotor. Esta hipermetilación del BRCA1 es frecuente en cáncer de mama triple negativo. El expresión disminuida de BRCA1 es predictor de mejor respuesta a inhibidores de PARP1 y explica las respuesta espectaculares al platino en pacientes con cáncer de ovario. De hecho, las líneas celulares de cáncer de ovario que responden a platino son las que tienen inactivación epigenética del BRCA1 (Stefansson et al Epigenetics, 2012).

Perfiles de metilación de DNA en cáncer Caso de la leucemia linfoblástica aguda (ALL)

El 80% de los niños con ALL se curan. Los que tienen **perfil bajo de metilación son los que progresan y mueren**. Las células hipometilados se parecen a las células madres. Se especula que como las células madres responden menos a la quimioterapia, las células hipometiladas son también menos susceptibles a la misma.

Caso del cáncer de células del pulmón de célula no pequeña (NSCLC)

El 70% de los cánceres estadío I resecados se curan. ¿Cómo diferenciar el agresivo, del más indolente? El grupo de NSCLC pequeños que son hipometilados son más agresivos, y tienen una peor supervivencia. Al igual que en la ALL, son los tumores más pobremente diferenciados que recuerdan las células madres.

Caso de resistencia adquirida a quimioterapia en cáncer de colon

Los pacientes de cáncer de colon con silenciamiento epigenético del gen SRBC (un partner del BRCA1) son más sensibles a la quimioterapia con oxaliplatino y exhiben mayor supervivenia. (no me queda claro si es así, o al revés, la diapositiva parece indicar lo que escribo, pero la nota que tomé fue opuesta, ya estoy fatigado... Nota de MLM)

Caso de cáncer metastásico de primario desconocido

Los patrones de metilación son diferentes para diferentes tumores. Esto se puede utilizar para el estudio de un carcinoma de primario desconocido.

Terapias epigenéticas

Hay agentes demetilantes de DNA como la decitabina, azacitidina que se utilizan en mielodisplasia y leucemia mieloide aguda. También hay inhibidores de histona deacetilasa (HDAC) como el vorinostat en uso clínico para linfoma cutáneo de células

T. El vorinostat induce diferenciación, bloqueo del ciclo celular y apoptosis. En fase preclínica hay otros agentes como: inhibidores de metiltransferasas de histonas; inhibidores de histona demetilasas; inhibidores de quinasas de histona que evita la mitosis, similar a los inhibidores de Aurora Kinasa; inhibidores de histona acetiltransferasa, inhibidores de bromodominio, inhibidores del sirtuin y compuestos relacionados a los miRNA. El CHR-6494 inhibe la kinasa haspin que se encarga de forsforilar la histona H3T3. El 3-deazaneplanocin/DZNep inhibidores de Histona Metil Transferasa (EZH2) que estimulan los TSG. Otra estrategia de terapia epigenética es buscar el incremento en la expresión de los miRNAs. La Enoxacin es una molécula que aumenta la expresión de los miRNA, con actividad antitumoral en estudios preclínicos (Melo et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011).

Marcadores genéticos de los medicamentos epigenéticos

Ya no soy sujeto (y se nota). HDAC2 (no entendí bien el tema del HDAC2, pero se puede leer para las personas hipermotivadas en Ropero et al., Nature Genetics, 2006. Nota de MLM). DNMT3B amplificado actúa como un oncogén, y predice refractariedad a agentes demetilantes como Azacitidina y Decitabina. MYST4 inhibidos son más susceptibles a las histonas desacetilasas. SETDB1 (Histona metiltransferasa) amplificada causa tumorogénesis, más sensible a la mitramicina C.

Futuro: Metiloma completo.

A medida que envejecemos se va hipometilando el DNA con el consecuente incremento en la inestabilidad genómica y el riesgo de infección. Simultáneamente hay hipermetilación de los islas CpG de los TSG. Se va a poder establecer la edad biológica de un individuo por su epigenoma.

Cool Trivia

¿Cómo no aprovechar para listar algunas epigenopatías que se mencionan en el artículo y en la clase? Da para una conversación escalofriante.

Progeria

Hutchinson-Gilford Progeria y el síndrome de Werner son causados por defectos severos en la metilación del DNA cursando con un evejecimiento y muerte prematuros. Sus epigenomas a los 10 años son similares a los de una persona de 90.

Beckwith-Wiedemann

Sindrome caracterizado por exomphalos, macroglosia y gigantismo que ocurre por pérdida del imprinting del gen IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2) por hipometilación. Estos pacientes tienen una mayor susceptibilidad al cáncer. La pérdida del imprinting del IGF2 es un factor de riesgo para cáncer de colon. La pérdida generalizada del imprinting es un factor de riesgo para el desarrollo del tumor Wilms.

Infertilidad masculina

La disrupción epigenética de la vía PIWI explica la falla espermogénica con ausencia completa de células gérminales en varones infértiles (PloS One, October, 2012).