

ACTUALIZACIÓN

DEL CÓDIGO GENÉTICO AL CÓDIGO EPIGENÉTICO: NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

José Ignacio Neissa¹, Carlos Guerrero²

1. MD, Candidato a Magíster en Bioquímica

2. MD, MSc. PhD Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

* Correspondencia: jineissa@excite.com

Resumen

El papel crítico del remodelamiento de la cromatina en la expresión de los genes se halla bajo la influencia de los cambios epigenéticos que conforman un lenguaje inesperado en el DNA y las histonas. Este trabajo actualiza el conocimiento sobre la metilación del DNA y la acetilación de las histonas, con especial interés en su aplicación clínica. Se ha propuesto, la identificación de los patrones heredables de metilación como herramienta útil en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Los inhibidores de las DNA-metil-transferasas y de las desacetilasas de histonas que actúan como reprogramadores de la expresión génica, han generado una nueva y promisoría aproximación terapéutica.

Palabras clave. Metilación de DNA, DNA metiltransferasa (DNMT), código de histonas; histona desacetilasas (HDAC), inhibidor de histona desacetilasas (HDACI),

terapia biológica, terapia anticancerosa.

Summary

The critical role of chromatin remodeling in gene expression is influenced by epigenetic changes that conform an unexpected language on DNA and histones. This review concerns DNA methylation and histone acetylation focusing on its clinical use. Identification of inheritable DNA methylation patterns has been proposed like a useful marker for the early detection and prognosis of cancer. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors can act as genic expression reprogrammers and have opened up a new and promising therapeutically approach.

Key words. DNA methylation; DNA methyltransferase, histone code, histone deacetylases, histone deacetylase inhibitor, cancer therapy.

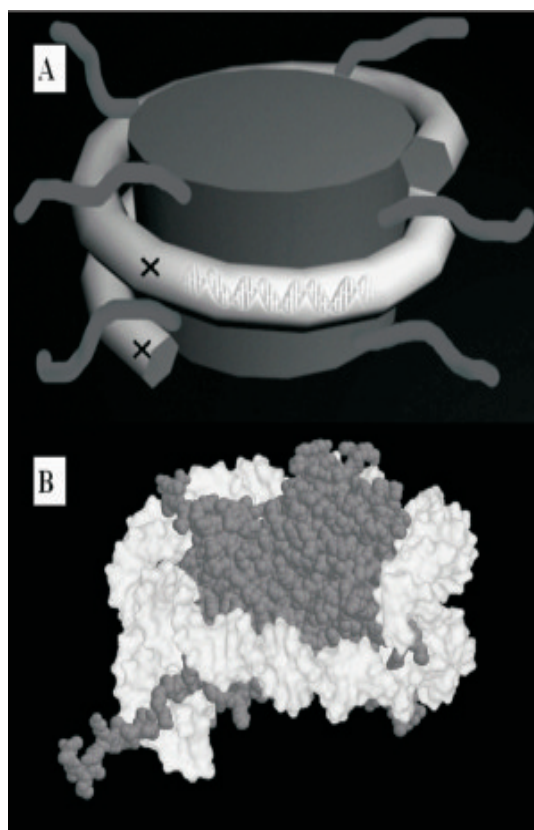


Figura 1. El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina. (A) Representación esquemática de un nucleosoma, la doble hélice de ADN da 1.75 vueltas alrededor del octámero de histonas. El símbolo X demarca sitios que en la estructura lineal son distantes pero quedan cercanos al formarse el nucleosoma, esto podría generar nuevas áreas de reconocimiento para las proteínas de unión al ADN. (B) Estructura de un nucleosoma de acuerdo al patrón de difracción de rayos x. En la parte inferior izquierda se aprecia la cola N-terminal de una histona H3 que aflora en medio del ADN. Estas colas son las más susceptibles a modificaciones como acetilación o metilación. Modelo realizado utilizando el programa Chemscape Chime, basado en los datos suministrados por el Protein Data Bank.

Introducción

Hace 60 años se demostró por primera vez, que aquella molécula por entonces conocida como principio transformante y que correspondía al material genético, era ADN (1). 17 años después nos sería revelado el lenguaje cuya lectura permite la fabricación de proteínas, el código

genético (2). Pero la belleza de la naturaleza nos escondería, por más años, otro lenguaje que subyace tras el primero: el código epigenético.

Epigenética: es el estudio de la epigénesis, o cambios en un organismo a causa de alteraciones en la expresión de la información genética sin modificación génica (3). Los cambios epigenéticos influyen en el fenotipo sin alterar el genotipo (4). Igualmente, epigenética es una palabra que se refiere a las características **heredables** y que no pueden explicarse única y directamente a partir de la secuencia de ADN. Éste nuevo código, se nos presenta como modificaciones covalentes por adición de grupos funcionales (metilos, acetilos, fosfatos) o proteínas (ubiquitina, SUMO) al ADN o algunas de sus proteínas asociadas, con repercusiones en la regulación transcripcional como activar, inhibir o modificar la expresión de genes, contribuyendo a patologías como el cáncer, la esquizofrenia y el asma, entre otras. Aunque aún no se descifra completamente este lenguaje, la empresa farmacéutica no ha dado espera para diseñar y utilizar medicamentos que modifiquen este código en beneficio de su interés primordial y también, de la salud.

La estructura del ADN y de la cromatina determinan su expresión

El ADN es un polímero de desoxinucleótidos unidos por enlaces de tipo 3'-5' fosfodiéster. Dos cadenas antiparalelas se entrelazan por enlaces de hidrógeno, a través de las bases nitrogenadas **adenina, guanina, timina y citosina**, constituyendo así, una doble hélice (5). Nuestra especie contiene aproximadamente 3×10^9 pares de bases (pb) y en cada giro de la doble hélice se avanzan 10 de ellos ocupando 34 nm de longitud, por tanto, si colocáramos cada molécula de los 46 cromosomas una detrás de otra, la extensión alcanzaría 2,04 metros. Una longitud que

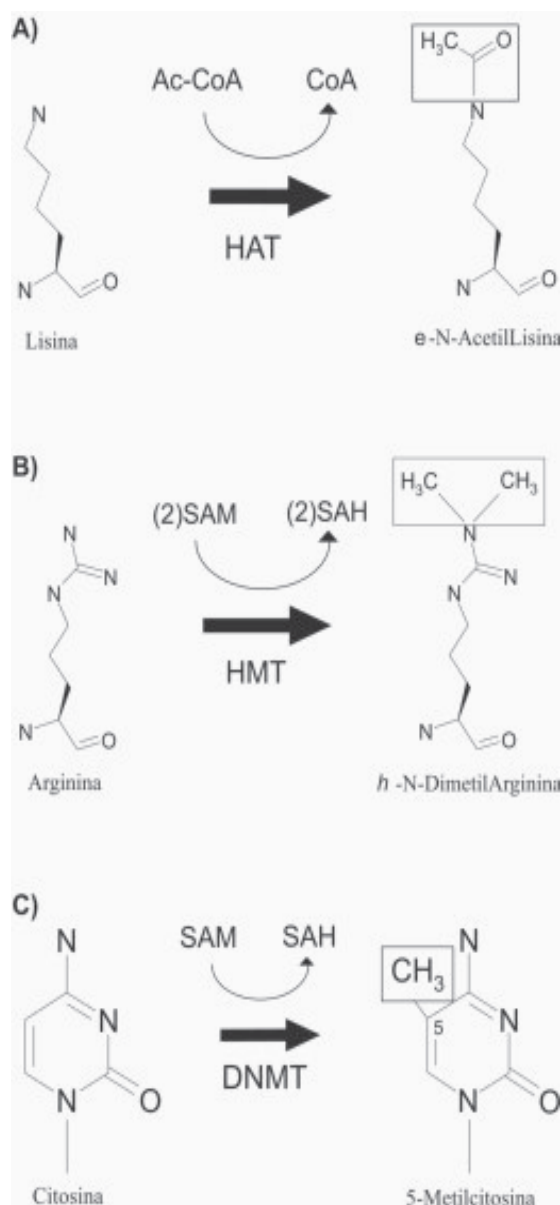


Figura 2. Algunas modificaciones covalentes del código epigenético. (A) La acetilación de histonas se realiza sobre residuos de lisina. (B) Ejemplo de dimetilación sobre una arginina. (C) La metilación del ADN suele ocurrir sobre el carbono 5 de la citosina. Clave: Ac-CoA: Acetil coenzima A (Donador del grupo acetilo). SAM: S-Adenosil metionina (Donador del grupo metilo). SAH: S-Adenosil Homocisteína. HAT: Histona-Acetil transferasa. HMT: Histona-metiltransferasa. DNMT: ADN Metiltransferasa.

es ¡68000 veces superior al diámetro de una célula típica (30 μ m)! Para que una célula eucariote logre contener su propio material

genético, la evolución ha seleccionado unas proteínas **básicas**, altamente conservadas, llamadas histonas, que se organizan en octámeros (2 de H2A, 2 de H2B, 2 de H3 y 2 de H4) alrededor de los cuales enrolla el **ácido** desoxirribonucleico, convirtiéndolos en *verdaderos carreres*. Cada uno de ellos conforma lo que se denomina un **núcleosoma** (Figura 1) (6). Éstos a su vez se disponen en una estructura solenoidal compacta llamada **cromatina**, que se ancla a proteínas de la lámina nuclear, permitiendo así el empaquetamiento del ADN en un espacio reducido (Figura 3D).

Por otro lado, el flujo de la información genética: ADN a ARN y de éste a proteínas, requiere en algún momento que, algunos genes empaquetados deban desempaquetarse para poder ser transcritos (paso de ADN a ARN), lo cual implica el desensamblaje de los nucleosomas. Las histonas juegan un papel que va más allá de su simple función estructural, en realidad se convierten en verdaderas reguladoras de la transcripción, a través de modificaciones postraduccionales (después de la síntesis de proteínas), como la metilación y la acetilación de algunos de sus aminoácidos (Figura 2A y 2B). En general, se puede afirmar que la metilación se relaciona, la mayoría de las veces, con el empaquetamiento de los nucleosomas, en términos prácticos, con la **represión del gen**, mientras que la acetilación, se relaciona con los procesos contrarios: desempaquetamiento y transcripción, es decir, **expresión del gen**. Sin embargo, esto no puede tomarse como una regla simple, ya que los cambios sutiles en cuanto al número, sitios específicos y combinaciones específicas de modificaciones, son los que determinan el remodelamiento final de la cromatina y por ende la represión o expresión génica. Este patrón de combinaciones realizadas en el extremo amino terminal de algunas histonas, es lo que

Tabla 1. Código de histonas*

HISTONA	TIPO DE MODIFICACIÓN	SITIOS(S)	EFEECTO	REFERENCIA
H2B	Ubiquitinación	Lys 123	Metilación de Lys 4 y Lys 79 de H3. Silenciamiento telomérico	10, 18, 113
H3	Fosforilación	Ser 10	Acetilación de Lys 14 de H3	114
H3	Fosforilación /acetilación	Ser 10/Lys14	Activación génica	9
H3	Metilación (no específica)	Lys 9	Silenciamiento del cromosoma X. Represión génica por unión de HP1. Metilación de ADN en <i>Neurospora</i>	28, 31, 115, 116
H3	Dimetilación	Lys 4	Actividad génica potencial	16
H3	Trimetilación	Lys 4	Expresión génica manifiesta	16
H3	Metilación /fosforilación	Lys 9/Ser10	Disminuye afinidad por HP1. expresión génica?	16
H3	Metilación	Lys 79	Heterocromatina. Silenciamiento telomérico	113, 117
H4	Acetilación	Lys5/Lys12 ó Lys8/Lys16	Unión del doble bromodominio de TAF _{II} 250. Expresión.	119
H4	Sumoilación	?	Represión génica	118
H4	Acetilación	Lys12	Silenciamiento	119

*Sólo se muestran algunos ejemplos. Los efectos pueden ser dependientes de la especie. Se desconocen los efectos de las combinaciones entre modificaciones múltiples. Los aminoácidos que rodean el sitio señalado también pueden ser necesarios para la lectura del código. Lys: lisina. Ser: serina. HP1: proteína de heterocromatina

define el llamado **código de histonas**, que indudablemente extiende la información potencial del código genético (7) (Tabla 1).

El complejo código epigenético de las histonas y su relación con el de ADN

El papel modulador de las histonas en los procesos de replicación, transcripción y recombinación depende de sus modificaciones postraduccionales. El proceso de acetilación como regulador, fue propuesto por primera vez en los años 60 (8) y se ha convertido, junto con la metilación, en la modificación más estudiada hasta el momento. La interpretación de la información alcanzada hasta el 2000, condujo a Strahl y Allis a proponer en ese año la hipótesis del “código de histonas”, mencionada atrás (9) (Tabla 1).

Los principales actores en la formación del có-

digo de histonas son las enzimas encargadas de fijar o remover los grupos funcionales añadidos. Dentro de éstas se encuentran: las acetiltransferasas de histonas (**HAT**) o acetilasas, que adicionan grupos acetilo; las desacetilasas de histonas (**HDAC**), que remueven dichos grupos; las metiltransferasas de histonas (**HMT**) o simplemente metilasas, que son enzimas metilantes; las quinasas, que adicionan grupos fosfato y las fosfatasas, que los remueven. Al igual de lo que ocurre con el ADN, la metilación de histonas parece ser un proceso más estable y aún no se conocen desmetilasas. Así mismo, las histonas pueden sufrir, glicosilaciones, ADP-ribosilaciones, ubiquitinaciones y sumoilaciones. Estas dos últimas también se han correlacionado con una función en la regulación de la transcripción (10-12).

El lenguaje oculto tras los adornos covalentes que

consienten las histonas es complejo y aunque algo conservado entre las especies, no parece tan universal como el genético. La acetilación ocurre sobre lisinas, de las cuales, sólo 14 se han identificado como sitios diana (13). La metilación, en cambio, ocurre sobre algunas argininas y lisinas, pero su interpretación es más confusa, por cuanto las lisinas pueden sufrir mono, di o trimetilación y las argininas mono o dimetilación (14) (Figura 2B). Dichas sutilezas parecen tener repercusiones funcionales diferentes (15,16) (Tabla 1). Si consideramos que hasta el momento se conocen ocho sitios diana para la metilación de lisinas (13), las combinaciones serían de 4^8 , 65536 posibilidades que nos dan una idea de la complejidad a la que nos enfrentamos, aunque en realidad, la gran mayoría de combinaciones no provoca ningún efecto en la estructura de la cromatina. También se ha determinado que existe una relación secuencial entre algunas modificaciones de la región N-terminal de las histonas, por ejemplo, la ubiquitinación puede preceder a la metilación (10,17) y la fosforilación puede secundar la metilación antes de advertirse un efecto que, funciona como un interruptor (Tabla 1).

La acetilación no es exclusiva de las histonas y se sabe que algunas proteínas como p53, α -tubulina, Hsp90, MyoD y GATA-1 también lo presentan en su proceso de regulación funcional (18). En el caso de p53, la acetilación aumenta su unión al ADN y su transactivación (19). También se conoce que tanto las HAT como las HDAC forman complejos con otras proteínas involucradas en la transcripción y el remodelamiento de la cromatina (18,20). Interesantemente, las DNMTs (ADN Metiltransferasas) así como algunas de las proteínas de unión a ADN metilado como MeCP2, se asocian con HDACs y HMTs sugiriendo una correlación funcional entre la metilación del ADN y la metilación o desacetilación de histonas para causar un remodelamiento de la cromatina y la consecuen-

te represión génica (21-23) (Figura 3). Del mismo modo, la proteína aberrante de fusión PML-RARA, que se expresa en la leucemia promielocítica aguda, induce la hipermetilación de ADN mediante el reclutamiento de DNMT1 y DNMT3A y la desacetilación por reclutamiento de HDAC en el promotor del gen *RAR* β 2 (24).

La lectura del código de histonas corre por cuenta de unas proteínas que comparten un dominio de unión a las lisinas metiladas llamado **cromodominio** (25-27) y por proteínas con dominios de unión a acetilaciones llamados **bromodominios** (28). Curiosamente, algunas proteínas que contienen cromodominios son en ellas mismas HMTs (30) y algunas de las que contienen bromodominios son HATs (22), sugiriendo que un evento primario de metilación o acetilación puede extender una reacción en cadena que modifica las histonas vecinas. La proteína ESET de humanos, además de ser una HMT, tiene un cromodominio y un dominio de unión a ADN metilado (29), sugiriendo que la lectura del código epigenético involucra tanto las modificaciones de las histonas como las del ADN al mismo tiempo.

La metilación del ADN y su relación con procesos fisiológicos y patológicos

La metilación del ADN suele ocurrir en el carbono 5 de las citosinas (Figura 2C) y con mayor frecuencia en citosinas que hacen parte de dupletes CpG, agrupados en varias zonas a lo largo del ADN formando las llamadas **islas de CpG**, algunas de las cuales se encuentran en las regiones promotoras de varios genes. La metilación de dichas secuencias se asocia con la represión génica y a su vez con la desacetilación de histonas (30).

Un lenguaje requiere de dos contrapartes, quien lo escribe y quien lo lee. La metilación de las

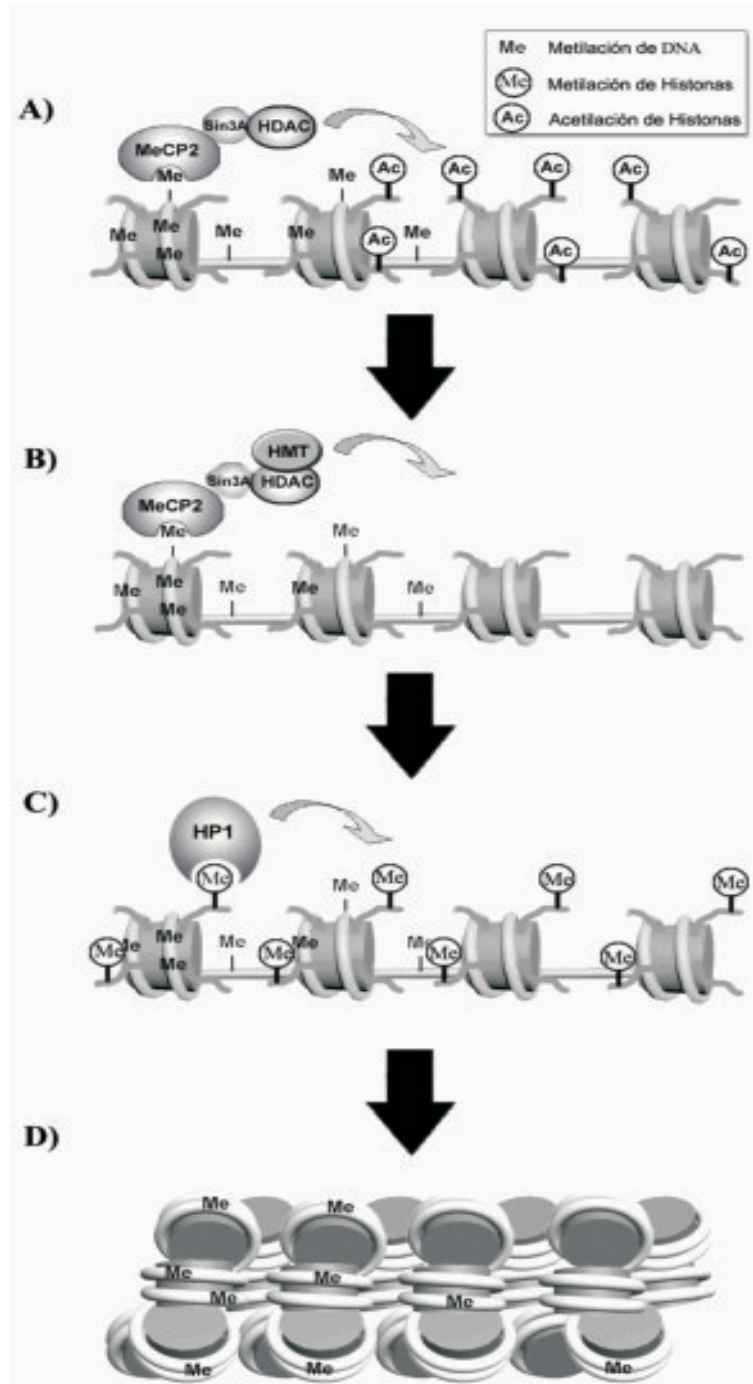


Figura 3. Modelo que correlaciona los cambios epigenéticos del ADN y los de las Histonas. (A) El ADN metilado es «leído» por proteínas como la MeCP2. El correpresor Sin3A sirve de «puente» entre MeCP2 y las HDACs. (B) Las HMT también se unen al complejo y metilan las histonas después de su desacetilación. (C) La metilación de la lisina 9 de la histona H3 es reconocida y permite la unión del cromodominio de la proteína HP1 (Heterocromatin Protein). (D) La HP1 induce la formación de heterocromatina y por ende, la represión génica. Se omiten las colas de las histonas para mayor simplicidad. [No siempre se requiere la metilación del ADN para la metilación y/o acetilación de las histonas. (119). La metilación de ADN puede depender de la metilación de histonas, y no al revés, en algunos genes y/o especies. (116)]

citiosinas, como pilar de su escritura, es realizada por las enzimas **ADN metiltransferasas (DNMT)**, de las cuales se han caracterizado varios miembros: DNMT 1, DNMT 1o, DNMT1p, DNMT 2, DNMT 3a, DNMT3b, DNMT 3L (31). La lectura de este código, corre por cuenta de una familia de proteínas que poseen un dominio de reconocimiento y unión al ADN metilado, **MBD (Methyl-binding domain)**, dentro de la cual destacan **MeCp2**, MBD2 y MBD3 (Ver figura 3A) (31). Una tercera participante, la desmetilasa de ADN, podría estar encargada de deshacer y modificar la escritura del código antes de su lectura, pero la existencia de tales enzimas es aún controversial, el candidato en potencia es el mismo MBD2 (32,33).

La asociación de la metilación del ADN con la represión génica fisiológica se sugirió por primera vez hace casi 30 años (34); su participación en procesos patológicos fue demostrada en 1990 con base en que la inactivación de genes, en líneas celulares derivadas de cáncer, se asociaba con la metilación de las islas CpG (35). Dentro de los procesos fisiológicos involucrados se encuentran: la regulación transcripcional, el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, la modulación de la estructura de la cromatina, la inactivación de uno de los cromosomas X en mujeres, la impronta genómica y el silenciamiento de retrotransposones (30,36). Por ejemplo, en el caso de la impronta, la metilación de ADN como patrón hereditario, puede determinar cual de los alelos, el proveniente de la madre o el del padre, se expresa, o si finalmente lo hacen ambos (37,38). La expresión de un solo alelo supondría una menor actividad de la proteína relacionada y la expresión de ambos una actividad aumentada, lo que lleva a manifestaciones fenotípicas diferentes que podrían ser patológicas. En el caso del gen del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), la copia materna se halla inactivada por

su hipermetilación, sólo 10% de las personas no ocurre así. En el cáncer esporádico de colon, el defecto se halla presente en el 30% de los pacientes (39,40).

Estas variaciones en la impronta podrían explicar las características fenotípicas que desaparecen y reaparecen al cabo de varias generaciones, también aclararía las diferencias registradas en algunas enfermedades como la Diabetes tipo 2, que se manifiesta en diferentes edades en los miembros de una misma familia; igualmente, explicaría las enfermedades de gemelos idénticos, como la esquizofrenia, que pueden afectar a sólo uno de ellos. Recientemente, se ha propuesto que en la esquizofrenia, la reducida expresión de la proteína Reelina, necesaria para la migración neuronal y la sinaptogénesis, pueda deberse a una hipermetilación en su promotor (41,42).

Otras patologías asociadas con procesos de metilación de ADN son: el síndrome ICF, (“**I**mmunodeficiency, **C**entromere instability, **F**acial anomalies”) causado por una mutación que inactiva el gen de la ADN metiltransferasa 3b (DNMT3b) (8); el síndrome de Rett, causado por la mutación de MeCP2 (43); y los síndromes de Prader-Willi y Angelman causados por la misma delección en el cromosoma 15, pero con manifestaciones diferentes dependiendo de si el cromosoma afectado es el materno o el paterno; por el fenómeno de impronta (44). En el caso del cáncer, la investigación se encuentra ante una paradoja, por un lado, se ha demostrado que hay una **hipermetilación restringida** a determinadas regiones del ADN; por otro lado, existe una **hipometilación generalizada** del genoma en presencia de un aumento de la actividad de DNMTs (45,46). La interpretación de estos hallazgos constituye un reto a la hora de generar un modelo de carcinogénesis, los mecanismos por los cuales se adquieren estos pa-

trones, aberrantes y contradictorios de metilación, se desconocen. La hipermetilación de las islas CpG ha sido el fenómeno más estudiado y asociado con el cáncer. La hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores como *p16/CDKN2*, *Rb*, *p21*, *BRCA1*, genes de reparación de ADN como *hMLH1*, y otros como *el receptor de estrógeno* á, produce su represión en tejidos cancerosos (47). Se ha propuesto que la hipometilación generalizada podría desestabilizar el genoma al activar las secuencias transponibles de ADN, coloquialmente denominadas “genes saltarines”. El descontrol de estos elementos puede causar mutaciones de tipo insercional inactivando genes de control de la proliferación y el crecimiento (36,48). La hipometilación podría generar una inestabilidad cromosómica como la observada en el síndrome ICF (36).

Utilidad diagnóstica y terapéutica de la metilación del ADN

La importancia clínica del papel de la hipermetilación en el cáncer, quedó al descubierto, cuando se halló ADN metilado en lesiones hiperplásicas premalignas en determinados promotores de genes. La detección de dichas regiones metiladas se ha propuesto como herramienta de diagnóstico temprano o de clasificación para varios tipos de lesiones pre y malignas en próstata, pulmón, seno, adenocarcinoma esofágico, carcinoma gástrico y cáncer colorectal entre otros (40, 49-56). La posibilidad de contar con estos hallazgos paraclínicos ha aumentado, gracias al desarrollo de un tipo de reacción encadena de la polimerasa (PCR) que es capaz de discriminar ADN no metilado del metilado, el MSP (Methylation specif PCR), sumado al uso de microarrays (57,58). Además, la toma de muestras puede provenir cómodamente de suero, esputo, lavado bronquial, orina o nódulos linfáticos,

dependiendo de la localización de la lesión en estudio. El patrón de metilación de algunos genes también podría usarse para determinar el pronóstico como en el caso de los meduloblastomas (45,59).

Una aproximación farmacológica razonable al patrón de hipermetilación encontrado en el cáncer, es el uso de compuestos que hoy se conocen genéricamente como agentes hipometilantes, pero que en realidad son inhibidores de las **DNMTs**. Dos de ellos se han utilizado desde los años 60, *in vitro* e *in vivo* como antileucémicos, mucho antes de que se conociera su mecanismo de acción, son la 5-azacitidina (azaC) y la 5-aza-2'-desoxycitidina (DAC), este último también conocido como decitabina (24). Estos compuestos son análogos del nucleosido citidina y por ello se incorporan a los ácidos nucleicos. La decitabina, en particular, es un desoxinucleosido y por lo tanto se incorporará al ADN durante la replicación y no al ARN (32), como sí es el caso de la azacitidina, esperando que con ello disminuyan los efectos adversos. Existe evidencia que sustenta la hipótesis de que la decitabina, una vez incorporada en el ADN, se une covalentemente a la DNMT1 bloqueando su función (60). Aunque el modelo actual supone el riesgo de la hipometilación generalizada y la aparición de efectos tan graves como los vistos en el síndrome ICF, intrigantemente, los experimentos preclínicos y clínicos no ha mostrado tal toxicidad y han avanzado rápidamente. Además, a dosis altas, estos análogos producen citotoxicidad y a dosis bajas promueven la diferenciación, así, su efecto parece mediado por dos mecanismos diferentes. También se ha sugerido que el silenciamiento de la DNMT1 puede inducir la expresión génica pero por un mecanismo independiente de su actividad metiladora (61).

Actualmente, la decitabina (Dacogen®) es el análogo más potente y se perfila como una droga

prometedora en el tratamiento de varios tipos de cáncer hematológicos, como los síndromes mielodisplásicos de alto riesgo en pacientes ancianos y en pacientes jóvenes sin donante compatible. (Para una revisión de los ensayos clínicos en enfermedades hematopoyéticas véase la referencia 24). Su principal efecto secundario ha sido la mielosupresión prolongada (62-66), sin embargo, su aprobación por la FDA podría estar próxima dependiendo de los resultados de los ensayos clínicos de fase III en curso. La combinación con otros antineoplásicos podría permitir la disminución de las dosis tanto de decitabina como de AzaC y así evitar su toxicidad. Ensayos de este tipo se encuentran en fase II.

Un medicamento con una amplia trayectoria en el mercado, usado principalmente como antiepiléptico, ha demostrado recientemente tener una actividad hipometilante de ADN. Se trata del ácido valproico, cuyo mecanismo de acción puede estar relacionado con su conocida actividad como inhibidor de las enzimas desacetiladoras de histonas (67). La ventaja de éste medicamento, además de la confianza que inspira su antigüedad, es que su efecto hipometilante no depende de la replicación como en el caso de los análogos de nucleósidos y por ello, puede utilizarse en células que no sufren mitosis como las neuronas. Este mecanismo podría explicar el alivio de síntomas psicóticos y su efecto como modulador del ánimo, si llegasen a depender de la expresión génica (41). Los ensayos clínicos que combinan ácido valproico y decitabina como tratamiento de varias lesiones malignas, ya han comenzado (68).

Otra estrategia farmacológica naciente, es la construcción de oligonucleótidos antisentido. El MG-98 es un antisentido de segunda generación, construido por la empresa canadiense MethylGene, que se une a la región 3' del mRNA de la DNMT1 inhibiendo su traducción

a proteína. Los experimentos en células tumorales han demostrado que induce desmetilación y expresión de los genes supresores de tumores p16 y p21 e inhibe el crecimiento tumoral en ratones (69,70). Los primeros resultados de ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de tumores sólidos han mostrado efectos indeseables a dosis altas (71), pero han recomendado la dosis necesaria para ensayos de fase II (72), del primero de ellos se espera una publicación de resultados (73).

La utilidad de todos estos inhibidores de DNMTs en tumores sólidos, parece depender del tipo de tumor (74-77). El tratamiento de la anemia de células falciformes y de las talasemias también podría beneficiarse de los inhibidores de DNMT1, al parecer por medio de la inducción de la producción de hemoglobina fetal, dado que el promotor de este gen se encuentra regulado por metilación (78-81).

El hallazgo relevante de la diversidad de dominios entre las DNMTs y su patrón de expresión tejido específico, las convierte en potenciales blancos de selectividad farmacológica en el futuro (61). Por otro lado, hasta hace poco no se conocían fármacos que corrigieran la baja metilación del genoma que ocurre en el cáncer. *In vitro* se ha ensayado la S-adenosilmetionina (SAM), donador natural del grupo metilo y es probable que sirva para este efecto (82).

La desacetilación de histonas: un blanco terapéutico actual

La proposición de modelos que explican los procesos de modificación epigenética, en particular la acetilación, ha sido posible gracias al advenimiento de inhibidores de las proteínas desacetiladoras de histonas **HDACIs** (**h**istone **d**ea**a**cetylase **i**nhibitors), los cuales también han

demostrado tener un uso potencial como medicamentos. La inhibición de la desacetilación puede incrementar el número de histonas acetiladas causando un desempaquetamiento de la cromatina y que facilita la expresión de ciertos genes, hasta entonces reprimidos; como por ejemplo, el gen supresor de tumores e inhibidor de la proliferación celular, p21. La clasificación y una lista de los principales HDACIs se puede observar en la Tabla 2.

El uso de HDACIs supondría la activación masiva de genes que hacen parte de la heterocromatina, sin embargo, la expresión parece ser más específica de lo esperado y afecta solamente al 2% de los genes (81, 83). La razón de esta limitada inducción se desconoce.

Los HDACI parecen ejercer su acción inhibitoria por ocupación directa del sitio activo de las HDAC, según el modelo propuesto desde la cristalografía de rayos X (84). No obstante, existe evidencia que sugiere un mecanismo de acción independiente de su efecto hiperacetilador y remodelador de la cromatina (85,86). Los efectos celulares de los HDCAIs incluyen: detención del ciclo, inducción de la diferenciación y promoción de la apoptosis (83,87-90).

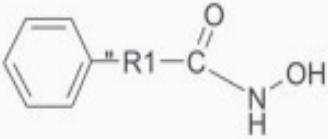
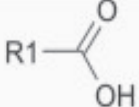
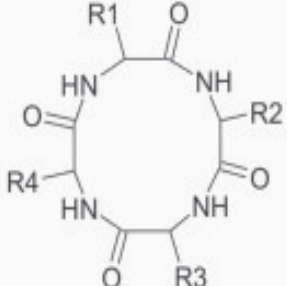
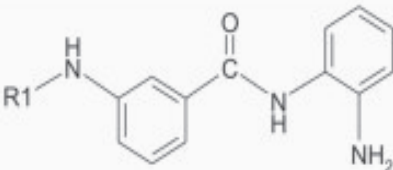
El ácido valproico y el fenilbutirato (Buphenyl®) son los dos únicos HDACIs aprobados por la FDA, aunque, la autorización de su prescripción se limita a la tradicional gama de patologías para el primero y como tratamiento de desórdenes relacionados con el ciclo de la urea para el segundo. Los resultados de los ensayos clínicos de fase I para varios HDACI ya se han publicado. Los efectos secundarios más críticos han sido la trombocitopenia y la arritmia cardíaca (91,92). El futuro puede ser especialmente promisorio para el depsipéptido, en el tratamiento de los linfomas de células T, si se corroboran los resultados obtenidos en un caso (93).

Si la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas juegan un papel concomitante en la represión de genes supresores de tumores, entonces, el uso conjunto de inhibidores de DNMTs y de HDACI debería mejorar los resultados. En efecto, se ha demostrado una acción sinérgica en líneas celulares derivadas de leucemias incluyendo la promielocítica aguda (24, 94, 95), de carcinoma pulmonar (96) y de carcinoma de seno entre otras (97). Los ensayos clínicos de fase I, realizados en pacientes con síndromes mielodisplásicos ratifican estos datos (24). Actualmente, se lleva acabo una gran cantidad de estudios clínicos de fase I y II, que combinan estos dos fármacos entre si o con algún otro antitumoral reconocido, como tratamiento para mieloma múltiple, varios tipos de linfomas y leucemias, cáncer de colon, riñón, tiroides y pulmón (68).

El butirato, que actúa como un HDACI, es un ácido graso de cadena corta, producido naturalmente por las bacterias que colonizan el intestino y ha demostrado tener un efecto antitumoral a concentraciones relativamente elevadas (milimolar). La fibra de la dieta podría incrementar su producción y se postula este mecanismo como uno de los relacionados con la prevención del cáncer de colon, sin embargo, no todos los estudios confirman este papel protector (98).

Otros usos propuestos para los HDACI son: tratamiento de la esquizofrenia, trastorno afectivo bipolar (20), malaria (99), enfermedad de Huntington (100) y la hipertrofia cardíaca. (101). No se conocen inhibidores o inductores de HATs; en cambio, se ha propuesto que la teofilina, clasificada usualmente como broncodilatador, ejerce parte de su acción al inducir la actividad de las HDAC y con ello disminuiría la expresión de los genes involucrados en la inflamación (102). Hasta el momento, se han descrito 18 tipos de HDACs, divididas en tres clases en razón a su homología

Tabla 2. Algunos inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACI)*

Grupo	Estructura	Compuestos	Rango CI_{50} <i>In vitro</i>
Ácidos Hidroxámicos		Tricostatinas SAHA y derivados Oxamflatin CBHA Piroxamida Scriptaid	nM μM nM μM μM μM
Ácidos Grasos de Cadena Corta		Butirato Fenilbutirato (PB)Acido Valproico	mM mM mM
Tetrapéptidos Cíclicos		Depsipéptido (FR901228) Trapoxina Apicidina Clamidocina	nM-μM nM nM-μM nM
Benzamidas		N-acetildinalina (CI-994) MS-275	μM μM

*Adaptada de las referencias 71, 83, 103, 104 y 120

con algunos genes de levadura. Su expresión en diversos tejidos y localización subcelular son diferentes (71, 103, 104), lo que apunta hacia un necesario refinamiento en la fabricación de HDACIs para alcanzar mayor especificidad terapéutica

Conclusiones y perspectivas

La metilación del ADN junto con la metilación y desacetilación de las histonas parecen procesos correlacionados entre sí, implicados en la represión génica. Otros procesos como la fosforilación, la ubiquitinación y la sumoilación

de histonas también ejercen un papel regulador en la remodelación de la cromatina y la transcripción. Algunos patrones de metilación y acetilación son heredables, aunque se desconoce el mecanismo de esta transmisión de información entre generaciones, a su vez, se desconoce por qué ciertos genes presentan este patrón, fisiológica o patológicamente, y otros no. El descubrimiento de que los errores en el patrón epigenético, y no las mutaciones, sean los implicados en la etiología molecular de algunas patologías, ha impactado la concepción que se tenía después del hito que supuso el advenimiento de la era postgenómica, tras el secuenciamiento

de la totalidad del ADN humano. Nos es ahora claro, que en la conquista de los secretos del funcionamiento celular debemos incluir otra etapa más, que sin mayores pretensiones de la anterior, bien podríamos llamar, era epigenómica. Es por eso, que compañías como Wellcome Trust Sanger Institute, Epigenomics y The Centre National de Génotypage se han asociado para ejecutar el proyecto Epigenoma Humano, que pretende mapear todas las secuencias de ADN metiladas. (www.epigenome.org). La universidad de Otago en Nueva Zelanda tiene una base de datos que registra los genes sometidos a la impronta genética. Al momento de la redacción de este manuscrito se habían identificado 224 (www.otago.ac.nz/IGC).

El lenguaje epigenético que modula la cromatina parece muy complejo y muchos de los efectos de represión o expresión, endógenos o provocados farmacológicamente, podrían deberse a las modificaciones sobre los factores de transcripción y no sobre las histonas o el ADN (86), o por inhibición de estructuras que regulan la vida media de las proteínas como el proteosoma (105). La disposición espacial del ADN dentro de la estructura del nucleosoma, que se distingue en la figura 1, también podría jugar un papel importante al crear nuevos puntos de reconocimiento entre secuencias distantes para proteínas aún no identificadas. Un trabajo reciente sustenta esta hipótesis, al recalcar la necesidad de la arquitectura total del promotor y no de sus secuencias discretas (106). Considerando la importancia clínica del código epigenético, sorprende la escasez de trabajos que estudien el mecanismo de acción de sus modificadores farmacológicos; pero como su ignorancia no impide el empleo en la práctica clínica, la línea de investigación que le apuesta al desarrollo de medicamentos que inhiben las HDACs, no se ha detenido y ha tomado la delantera junto con algunos inhibidores de DNMTs, creando una serie de

compuestos que se comportan como verdaderos reprogramadores de la expresión génica y cuya principal utilidad, aunque no la única, radica en el tratamiento de patologías malignas y tumorales. La combinación de ellos entre si o con otros antitumorales conocidos, se advierte como práctica común, por su mayor eficacia y menor riesgo para el paciente. Algunos de estos medicamentos se encuentran en ensayos clínicos de fases II y III. El portal www.clinicaltrials.gov, amparado por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, mantiene una actualización de los ensayos próximos a realizarse o que están reclutando pacientes. La especificidad del blanco molecular y el desarrollo de inhibidores e inductores de HMTs y HATs son un desafío para superar en los próximos años.

Aunque estos nuevos medicamentos no suponen ser la panacea, dada la complejidad y variabilidad de los mecanismos involucrados en patologías como el cáncer, sí brindarán nuevas expectativas a pacientes adecuadamente seleccionados. Una aplicación previsible, pero aún no examinada, es la de poder correlacionar el diagnóstico molecular con una terapia específica y personalizada. Por ejemplo, si se detecta por técnicas como la MSP (Methyl Specific PCR) que un paciente presenta inactivación de un gen trascendental en la inhibición de la proliferación como *p21*, debida a la hipermetilación de su promotor, entonces se favorecería de un tratamiento con inhibidores de DNMTs; pero si este gen no está inactivado o su inactivación se debe a otro mecanismo como la mutación, no tendría sentido darle este tratamiento. Por ello, resulta útil identificar todos los genes sometidos a metilación y determinar su verdadera importancia en la carcinogénesis. La Universidad de Missouri en Estados Unidos tiene un portal donde se citan los genes afectados por la hipermetilación de su promotor y relacionados con el cáncer, actualmente son 82 (107). Este mismo

planteamiento también aplica para otro tipo de enfermedades. La utilidad de los procesos de metilación como pronóstico y aún como diagnóstico, podría verse desvalorada en pacientes ancianos, considerando que la metilación es un proceso que aumenta en ciertos genes y disminuye en otros con la edad. (108, 109). La mayor incidencia de enfermedades genéticas en hijos de personas mayores también podría deberse, en parte, a este efecto (110). Interesantemente, se ha observado que ratas con una alimentación deficiente en metionina (aminoácido que hace parte de SAM) y folato, presentan una hipometilación genómica generalizada y un mayor riesgo de hepatocarcinoma (111,112). El probable papel comentado del butirato aumentado por la fibra, en el cáncer colorectal; también resulta intrigante. El estudio detallado de estos fenómenos, podría definir esquemas de manejo o prevención nutricional en el futuro.

Agradecimientos

A la Dra. Eva Amanda Gallego por su lectura crítica del manuscrito. Las imágenes fueron realizadas con los programas Blender y Gimp bajo el sistema operativo Linux.

Referencias

1. **Avery OT, MacLeod CM, McCarty M.** Studies on chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1944; 98: 451-460.
2. **Crick, FHC, Barnett, L, Brenner S, Watts-Tobin RJ,** General Nature of the genetic code for proteins. *Nature* 1961; 192: 1227-1232.
3. **Real academia de ciencias exactas, físicas y naturales.** Diccionario esencial de las ciencias. Madrid: Espasa Calpe; 2001: 335
4. **Lewin B.** Genes VIII. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall; 2004: 987
5. **Watson JD, Crick FHC.** A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953; 171: 737
6. **Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251-260
7. **Jenuwein T, Allis CD.** Translating the Histone Code. *Science* 2001; 293: 1074-1080
8. **Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE.** Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *PNAS* 1964; 51: 786-794
9. **Strahl BD, Allis CD.** The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45
10. **Sun ZW, Allis CD.** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002; 418: 104-108
11. **Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S.** Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2001; 2: 202-210.
12. **Daniel JA, Torok MS, Sun ZW, Schieltz D, Allis CD, Yates JR 3rd, Grant PA** Deubiquitination of Histone H2B by a Yeast Acetyltransferase Complex Regulates Transcription. *J Biol Chem* 2004; 279: 1867-1871
13. **Fischle W, Wang Y, Allis CD.** Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 2003; 425: 475-479
14. **Bottomley MJ.** Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO reports* 2004; 5: 464-469
15. **Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, et al.** Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma* 2004; 112: 308-315
16. **Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, et al.** Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 2002; 419: 407-411
17. **Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A.** Methylation of Histone H3 by COMPASS Requires Ubiquitination of Histone H2B by Rad6. *J Biol Chem* 2002; 277: 28368-28371
18. **Marks PA, Miller T, Richon VM.** Histone deacetylases. *Curr Opin Pharm* 2003; 3: 344-351
19. **Gu W, Roeder RG.** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 1997; 90: 595-606
20. **Roth SY, Deunu JM, Allis CD.** Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120
21. **Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A.** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-38940

22. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 2305–2312
23. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 4035–40
24. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 2003; 17: 1870–1881
25. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9 Methylated Histone H3 Tail. *Science* 2002 295: 2080–2083
26. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. *Nature* 2001; 410: 120–124
27. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 1999; 399: 491–496
28. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 286–298
29. Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002; 21: 5361–5379
30. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538–6547
31. Szyf M. DNA methylation and cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 2003; 6: 341–353
32. Bhattacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni, N., Szyf M., A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579–583.
33. Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *PNAS*. 1977; 74: 2725–2728
34. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62: 503–514
35. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Exp Rev Mol Med* 2002; 4 March, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004222h.htm>
36. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6–21
37. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 493–525
38. Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from monoallelic to biallelic human *IGF2* promoter methylation during aging and carcinogenesis. *PNAS* 1996; 93: 11757–11762
39. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DE, Kafonek DR, Brandenburg S, et al. Loss of *IGF2* Imprinting: A Potential Marker of Colorectal Cancer Risk. *Science* 2003; 299: 1753–1755
40. Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, Shafa R, Stone W, Glatt SJ, Tsuang MT. Methyloomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet* 2004; 127B: 51–59
41. Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 2930–2939
42. Ausió J, Levin DB, De Amorim GV, Bakker S, Macleod PM. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin Genet* 2003; 64: 83–95
43. Nicholls RD, Saito S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 1998; 14: 194–200
44. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042–2054
45. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neo-plasms. *Science* 1985; 228: 187–190
46. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica* 2002; 87: 1324–1341
47. Yuan Y, Mendez R, Sahin A, Dai JL Hypermethylation Leads to Silencing of the SYK Gene in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5558–5561
48. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature Rev Gen* 2002; 3: 370–380
49. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *PNAS* 1998; 95: 11891–11896
50. Kanai Y, Hui AM, Sun L, Ushijima S, Sakamoto M, Tsuda H, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1999; 29: 703–709
51. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic pat-

- terms in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 3410-3418
52. Issa JJ, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA, et al. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61: 3573-3577
 53. Kang GH, Shim Y, Jung H, Kim WH, Ro JY, Rhyu M, et al. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
 54. Umbrecht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S, et al. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3348-3353
 55. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 531-536
 56. Jubb AM, Quirke P, Oates AJ. DNA Methylation, a Biomarker for Colorectal Cancer Implications for Screening and Pathological Utility. *Ann NY Acad Sci* 2003; 983: 251-267
 57. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *PNAS* 1996; 93: 9821-9826
 58. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 3735-3742
 59. Fruhwald MC, O'Dorisio MS, Dai Z, Tanner SM, Balster DA, Gao X, et al. Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas—implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene* 2001; 20: 5033-5042
 60. Jutterman R, Li E, Jaenisch R.. Toxicity of 5-aza-2'-deoxy-cytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *PNAS* 1994; 91: 11797-11801
 61. Milutinovic S, Brown SE, Zhuang Q, Szyf M. DNMT1 knock down induces gene expression by a mechanism independent of the two epigenetic silencing mechanisms: DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem* 2004. Aceptado Abril 15. En prensa.
 62. Issa JJ, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, et al. Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635-1640
 63. Ravandi F, Kantarjian H, Cohen A, Davis M, O'Brien S, Anderlini P., et al. Decitabine with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in the therapy of leukemia relapse following a prior transplant: results of a phase I study. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1221-1225
 64. Wijermans P, Lübbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravvoet C, Andre M, Ferrant A. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 956-962
 65. Kantarjian HM, O'Brien SM, Keating M, Beran M, Estey E, Giralt S, et al. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1617-20
 66. Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LE, Dionne J, Belanger K, Ayoub J. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* 1997; 8: 358-368
 67. Detich, N., Bovenzi, V., Szyf, M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 27586-27592
 68. www.clinicaltrials.gov
 69. Fournel M, Sapieha P, Beaulieu N, Besterman JM, MacLeod AR. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5)methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1999; 274: 24250-24256
 70. Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, Hofe E, Szyf M. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *PNAS* 1997; 94: 684-689
 71. Davis AJ, Gelmon KA, Siu LL, Moore MJ, Britten CD, Mistry N, et al Phase I and pharmacologic study of the human DNA methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks. *Invest New Drugs* 2003; 21: 85-97
 72. Stewart DJ, Donehower RC, Eisenhauer EA, Wainman N, Shah AK, Bonfils C, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly. *Ann Oncol* 2003; 14: 766-774
 73. www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00003890?order=1
 74. Chan ATC, Tao Q, Robertson KD, Flinn IW, Mann RB, Klencke B, et al. Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1373-1381.

75. **Pohlmann P, DiLeone LP, Cancelli AI, Caldas AP, Lago LD, Campos O Jr, et al.** Phase II trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA hypomethylating agent, in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Oncol.* 2002; 25: 496-501.
76. **Abele R, Clavel M, Dodion P, Brunsch U, Gundersen S, Smyth J, et al.** The EORTC Early Clinical Trials Cooperative Group experience with 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in patients with colo-rectal, head and neck, renal carcinomas and malignant melanomas. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987; 23: 1921-1924.
77. **Schwartzmann G, Schunemann H, Gorini CN, Filho AF, Garbino C, Sabini G, et al.** A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2000;18: 83-91
78. **Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, Molokie R, Dorn L, Bressler L, et al.** Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2003; 102: 3865-3870.
79. **DeSimone J, Koshy M, Dorn L, Lavelle D, Bressler L, Molokie R, Talisch N.** Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia. *Blood* 2002; 99: 3905-3908.
80. **Atweh GF, Schechter AN.** Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 123-130.
81. **Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA** Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J Biol Chem.* 2004. Aceptado May 18. En prensa
82. **Van Lint C, Emiliani S, Verdin E.** The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 1996; 5: 245-254.)
83. **Marks PA, Richon VM, Rifkind RA.** Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1210-1216
84. **Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al.** Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999; 401: 188-193
85. **Kim YK, Han JW, Woo YN, Chun JK, Yoo JY, Cho EJ, et al.** Expression of p21(WAF1/Cip1) through Sp1 sites by histone deacetylase inhibitor apicidin requires PI 3-kinase- PKC epsilon signaling pathway. *Oncogene* 2003; 22: 6023-6031.
86. **Mulholland NM, Soeth E, Smith CL.** Inhibition of MMTV transcription by HDAC inhibitors occurs independent of changes in chromatin remodeling and increased histone acetylation. *Oncogene* 2003; 22: 4807-4818
87. **Butler LM, Webb Y, Agus DB, Higgins B, Tolentino TR, Kutko MC, et al.** Inhibition of Transformed Cell Growth and Induction of Cellular Differentiation by Pyroxamide, an Inhibitor of Histone Deacetylase 1. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 962-970,)
88. **Sambucetti LC, Fischer DD, Zabludoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, et al.** Histone Deacetylase Inhibition Selectively Alters the Activity and Expression of Cell Cycle Proteins Leading to Specific Chromatin Acetylation and Antiproliferative Effects. *J Biol Chem* 1999; 274: 34940-34947
89. **Atadja P, Gao L, Kwon P, Trogani N, Walker H, Hsu M, et al.** Selective Growth Inhibition of Tumor Cells by a Novel Histone Deacetylase Inhibitor, NVP-LAQ824. *Cancer Res* 2004; 64: 689-695
90. **Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, et al.** The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *PNAS* 2001; 98: 10833-10838
91. **Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, et al.** Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3578-88.
92. **Sandor V, Bakke S, Robey RW, Kang MH, Blagosklonny MV, Bender J, et al.** Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 718-728
93. **Piekarz RL.** Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 2001; 98: 2865-8
94. **Lemaire M, Momparler LF, Farinha NJ, Bernstein M, Momparler RL.** Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by phenylbutyrate on L1210 leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 147-54
95. **Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler RL.** Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-

- deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res.* 2003; 27: 437-444
96. **Boivin AJ, Momparler LF, Hurtubise A, Momparler RL.** Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 869-874
 97. **Primeau M, Gagnon J, Momparler RL** Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003; 103: 177-184
 98. **Lupton JR.** Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy. *J Nutr* 2004; 134: 479-482
 99. **Andrews KT, Walduck A, Kelso MJ, Fairlie DP, Saul A, Parsons PG.** Anti-malarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. *Int J Parasitol* 2000; 30: 761-768
 101. **Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth LM, Zhang CL, Schreiber K,** et al. Dose-dependent Blockade to Cardiomyocyte Hypertrophy by Histone Deacetylase Inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 28930-28937.
 100. **Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B,** et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 2003; 23: 9418-9427
 102. **Ito K.** A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *PNAS* 2002; 99: 8921-8926
 103. **Thiagalingam S, Cheng K, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A. Ponte JF.** Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic code. *Ann NY Acad Sci* 2003; 983: 84-100
 104. **De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP.** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370: 737-749
 105. **Mitsiades CS, et al.** Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *PNAS* 2004; 101: 540-545
 106. **Dehm SM, Hilton TL, Wang EH, Bonham K.** SRC Proximal and Core Promoter Elements Dictate TAF1 Dependence and Transcriptional Repression by Histone Deacetylase Inhibitors *Mol Cell Biol*, 2004; 24: 2296-2307
 107. http://www.missouri.edu/~hypermet/list_of_promoters.htm
 108. **Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP.** Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5489-5494
 109. **Zhang Z, Deng C, Lu Q, Richardson B.** Age-dependent DNA methylation changes in the *ITGAL* (CD11a) promoter. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 1257-1268
 110. **Oakes CC, Smiraglia DJ, Plass C, Trasler JM, Robaire B.** Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats. *PNAS* 2003; 100: 1775-1780
 111. **Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Feo F.** Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol* 2002; 27: 193-198
 112. **Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M.** Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutation Research* 2004; 548: 53-59
 113. **Ng HH, Xu R, Zhang Y, Struhl K.** Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 Is Required for Efficient Dot1-mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *J Biol Chem* 2002; 277: 34655-34657.
 114. **Kurdistan SK, Grunstein M.** Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature rev mol cell biol* 2003; 4: 276-284
 115. **Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.** Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001; 410: 116-120
 116. **Tamaru H, Selker EU.** A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; 414: 277-283
 117. **Iizuka M, Smith MM.** Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Gen Dev* 2003; 13: 154-160
 118. **Shiio Y, Eisenman RN.** Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS* 2003; 100: 13225-13230
 119. **Rice JC, Allis CD.** Code of silence. *Nature* 2001; 414: 258-260
 120. **Henderson C, Brancolini C.** Apoptotic pathways activated by histone deacetylase inhibitors: implications for the drug-resistant phenotype. *Drug Resistance Updates* 2003; 6: 247-256