

## Epigenética del cáncer

Victoria Gonzalo, Sergi Castellví-Bel, Francesc Balaguer, Maria Pellisé, Teresa Ocaña y Antoni Castells

Servicio de Gastroenterología. Institut de Malalties Digestives i Metabòliques. Hospital Clínic. CIBERehd. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

### RESUMEN

La patogenia del cáncer incluye mecanismos genéticos y epigenéticos. Se entiende por «epigenética» cualquier alteración de la expresión génica, potencialmente hereditaria, que no se acompaña de ninguna modificación en la secuencia del ADN. Las consecuencias de los cambios epigenéticos incluyen la alteración de la transcripción del ADN, la activación aberrante de determinados genes, la predisposición a la inestabilidad génica a través de la alteración en el control de la replicación cromosómica y la silenciación de genes implicados en la cascada de iniciación y progresión del cáncer. Entre las diversas alteraciones epigenéticas que comportan una expresión génica alterada, la metilación es el principal mecanismo epigenómico implicado en el cáncer, ya sea a través de un fenómeno de hipometilación global o de hipermetilación localizada en el promotor de determinados genes.

### EPIGENETICS OF CANCER

The pathogenesis of cancer includes both genetic and epigenetic mechanisms. The term «epigenetic» refers to any alteration of gene expression, potentially hereditary, which is not accompanied by a modification in the DNA sequence. The effects of epigenetic changes include alteration of DNA transcription, aberrant activation of specific genes, predisposition of genetic instability through alteration of the control of chromosome replication and silencing of the genes implicated in cancer initiation and progression. Among the various epigenetic alterations that lead to altered gene expression, methylation is the main epigenomic mechanism implicated in cancer, whether through a phenomenon of overall hypomethylation or hypermethylation localized in the promoters of specific genes.

Correspondencia: Dr. A. Castells.  
Servicio de Gastroenterología. Hospital Clínic.  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.  
Correo electrónico: castells@clinic.ub.es

Recibido el 8-5-2007; aceptado para su publicación el 14-5-2007.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer supone hasta el 13% de las causas de mortalidad mundial, y es la tercera tras las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades infecciosas (Globocan, 2002)<sup>1</sup>. Sus múltiples manifestaciones, complicaciones e implicaciones con valor pronóstico hacen necesaria una exhaustiva y continua reevaluación de su etiología, fisiopatología, diagnóstico, tratamiento y prevención.

Desde hace años se sabe que diferentes tipos de cáncer participan de diversos carcinógenos, exógenos y endógenos, y que comparten mecanismos moleculares comunes cuya disfunción permite la proliferación celular incontrolada, así como la pérdida, la disregulación o la mutación de genes que influyen positiva o negativamente en la regulación de la proliferación, la migración y la diferenciación celular.

Obviando los mecanismos exógenos, que no constituyen el objetivo de la presente revisión, los endógenos se dividen en genéticos y epigenéticos. En relación con los primeros, la naturaleza de las mutaciones es muy diversa, aunque, a grandes rasgos, pueden dividirse en mutaciones cromosómicas y alteraciones en la secuencia de nucleótidos de un gen. A su vez, las mutaciones cromosómicas incluyen la pérdida de uno o más cromosomas, alteraciones en el ADN (translocación, inversión) o estructurales (amplificación, delección). Respecto a las alteraciones de nucleótidos, la sustitución de un nucleótido por otro puede dar lugar a un cambio de aminoácido en el código genético (*missense mutation*) o a la formación de un codón stop en la secuencia de ADN, que generalmente no se plasma en una proteína truncada por ser inestable el ARN portador de esta mutación (*nonsense mutation*). Si la mutación afecta a un grupo de bases, en forma de pequeñas inserciones o delecciones, según el número, puede conllevar cambios significativos en el código genético y, por supuesto, en la síntesis de proteína. Es importante señalar que, si bien el término *genético* induce a pensar en el cáncer como una enfermedad hereditaria, ello tan sólo ocurre en un pequeño porcentaje. En la mayoría de tumores, las alteraciones descritas son únicamente somáticas y, por tanto, no pueden ser transmitidas a la descendencia.

Por otro lado, desde hace tiempo se sabe que estos mecanismos mutagénicos no explican la totalidad de los casos de cáncer. Así, desde el punto de vista etiopatogénico se han visto implicados un segundo grupo de alteraciones endógenas, denominadas epigenéticas, las cuales han comportado un cambio radical en la forma de entender el cáncer.

Se define como epigenética a toda alteración de la expresión génica, potencialmente hereditaria, que no se acompaña de ninguna modificación en la secuencia del ADN<sup>2</sup>. La potencial heredabilidad de estos cambios implica que pueden participar en el desarrollo del cáncer y sufrir los mismos procesos selectivos que las alteraciones genéticas. En este sentido, está bien establecido que las alteraciones epigenéticas aparecen en estadios precoces del cáncer<sup>3</sup> sin necesidad de mutaciones previas a su desarrollo, aunque tampoco es incompatible la existencia de ambos procesos simultáneamente.

Las consecuencias de los cambios epigenéticos incluyen la alteración de la transcripción del ADN<sup>4</sup>, la activación aberrante de determinados genes<sup>5,6</sup>, la predisposición a la inestabilidad génica a través de la alteración en el control de la replicación cromosómica<sup>7-10</sup> y la silenciación de genes cuyo papel es importante en la cascada de iniciación y progresión del cáncer<sup>11-13</sup>. Esta última consecuencia tiene una especial relevancia, ya que puede afectar a múltiples genes entre los que destacan los supresores de tumor, los factores de transcripción, los genes encargados de la remodelación de tejidos, los reparadores del ADN, los que controlan el ciclo celular, los antiapoptóticos y los que previenen la activación anómala del desarrollo tumoral.

Entre las diversas alteraciones epigenéticas que comportan una expresión génica alterada, la metilación está considerada por muchos autores como el principal mecanismo epigenómico implicado en el cáncer, ya sea a través de un fenómeno de hipometilación global o de hipermetilación localizada en el promotor de determinados genes<sup>14,15</sup>.

## METILACIÓN

La metilación representa una unión covalente entre un grupo metilo y una citosina (fig. 1), habitualmente ubicada en regiones del ADN ricas en este nucleótido: islas CpG, es decir, citosinas seguidas de guaninas. Estas islas CpG están incluidas o cercanas al 40% de los promotores de genes de mamíferos, y en el 70% en el caso de promotores de genes humanos. Esta unión covalente entre un grupo metilo y una citosina está catalizada por unas enzimas denominadas metiltransferasas. La mayoría de las islas CpG están localizadas en secuencias repetitivas del ADN, que incluyen regiones centroméricas, secuencias satélite y genes repetidos, generalmente en el extremo 5' de los genes implicados<sup>16</sup>. Sin embargo, la metilación no sólo afecta al ADN, sino que engloba una multitud de procesos, como la modificación de histonas, la formación de ARN no codificante y los cambios en el nucleosoma, y constituye lo que actualmente se conoce como «código

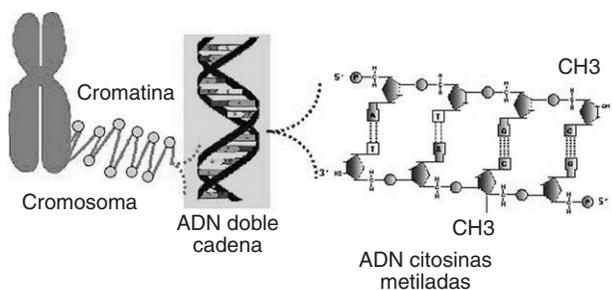


Fig. 1. Organización estructural del material genético. El ADN que contiene regiones CpG metiladas está envuelto en histonas, formando parte de la cromatina que compone la estructura del cromosoma.

epigenético». Se denomina código por su potencial heredabilidad y capacidad de transmisión de célula a célula, y epigenético dado que se modifica la estructura del ADN sin alterar su secuencia<sup>17</sup>.

## Bioquímica de la metilación

Tras el conjunto de modificaciones covalentes que se da en las histonas de cada nucleosoma tiene lugar la metilación de algunas CpG localizadas en las regiones promotoras de determinados genes. Esto ocurre mayoritariamente en posición 5'-CG-3' y, en ocasiones, en 5'-CA-3' o 5'-CT-3'. El producto resultante, la metilcitosina, es relativamente inestable y a través de una pérdida espontánea del grupo amina se convierte en timina; desde este punto de vista, la metilación actúa como un agente mutagénico endógeno<sup>18</sup>.

El 70% de las CpG dispersas por todo el genoma humano están metiladas. El 30% restante se encuentra en lo que previamente hemos definido como islas CpG, secuencias de aproximadamente 200 pares de bases (pb) ricas en citosinas seguidas de guaninas, no metiladas, que mayoritariamente se encuentran en la región promotora de más del 60% de los genes humanos.

## Mecanismos implicados en la metilación del ADN

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que consta de una hebra de ADN de 146 pb rodeada de un octámero de histonas. Las modificaciones covalentes (acetilación, metilación, fosforilización y ubiquitinilación) de ciertos aminoácidos en estas histonas alteran el estado de la cromatina, desde heterocromatina compacta e inactiva a eucromatina laxa y accesible, y viceversa, lo que permite la aparición de modificaciones en el ADN de las que se deriva una expresión génica positiva o negativa (fig. 2).

Diversas enzimas regulan este proceso bajo lo que se conoce como «código de histonas», cada una con una estrategia determinada, de la que se deriva una consecuencia diferente sobre el ADN. Así, las histona-acetiltransferasas (HAT) actúan acetilando lisina, sobre todo las histonas 3 y 4, lo que facilita el acceso de factores de transcripción a

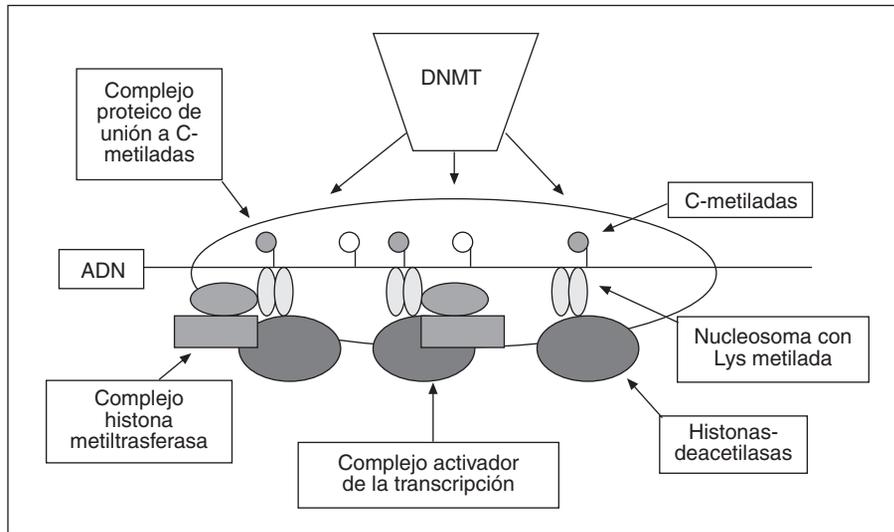


Fig. 2. Configuración de la cromatina en regiones pericentroméricas afectadas por la silenciación de la transcripción de un gen. Las regiones CpG están rodeadas por proteínas de unión MBP que incluyen histonas-deacetilasas. Las histonas deacetiladas en el nucleosoma permiten la entrada de histonas-metiltransferasas que metilan el residuo 3 de lisina y, a su vez, atraen a las metiltransferasas del ADN, dando lugar a la supresión de la transcripción. DNMT (DNA methyltransferase, ADN metiltransferasa).

regiones promotoras de la cromatina, y se plasma en una mayor expresión génica<sup>19</sup>. Las histona-deacetilasas (HDAC) producen una represión en la transcripción génica mediante un complicado mecanismo en el que interactúan otras enzimas denominadas histona-metiltransferasas, proteínas de unión a islas CpG y enzimas de fosforilización<sup>20,21</sup>. La metilación y la deacetilación son mecanismos mutuamente excluyentes en un mismo aminoácido de una histona. La relación entre metilación, fosforilización y deacetilación de histonas está bien establecida en el cáncer colorrectal (CCR). Así, la metilación de los residuos 4, 14, 36 o 79 de lisina de la histona 3, junto con la fosforilización del residuo 10 de la serina de la histona 3, tienen un efecto positivo en la transcripción génica, mientras que la metilación del residuo 9 y 27 de la histona 3 y del residuo 20 de la histona 4 se asocian a silenciación génica<sup>22-24</sup>.

### Efecto de la metilación del ADN en la expresión génica

La expresión génica está controlada epigenéticamente por el código de histonas, pequeñas secuencias de ARN no codificante<sup>25</sup>, proteínas de unión a islas CpG y metilación del ADN. Como se ha comentado anteriormente, este último proceso está regulado por las ADN metiltransferasas. Se han descrito 5 subtipos, pero sólo se conocen con exactitud tres de ellas: DNMT1, cuya función es mantener el estado de metilación del ADN en la fase S del ciclo celular<sup>26</sup>, y DNMT3A y DNMT3B, cuya función es la metilación del ADN durante la embriogénesis<sup>27,28</sup>. Las proteínas de unión a islas CpG (MBD) interpretan las marcas de metilación en las histonas, encargándose fundamentalmente de silenciar la transcripción génica.

Cuando se examina un gen silenciado y metilado en su promotor se observa una acumulación de las modificacio-

TABLA I. Genes implicados en el cáncer colorrectal silenciados por metilación de su promotor

Gen	Función	Frecuencia de metilación (%)
<i>APC</i>	Transducción de señal, mediado por B-catenina	10-50
<i>CDKN2A</i>	Regulación ciclo celular	15-30
<i>HPP1</i>	Antagonista de TGF- $\beta$	80
<i>MGMT</i>	Reparador de adhesión de grupos alquilo al ADN	30-40
<i>MLH1</i>	Reparador de los errores de replicación del ADN	10-20
<i>p14</i>	Regulación del ciclo celular	20-30
<i>RASSF1A</i>	Regulación del ciclo celular y reparador del ADN	50
<i>SOCS1</i>	Señalización intercelular	5-10
<i>THBS1</i>	Angiogénesis	10-20
<i>TIMP3</i>	Remodelador de la matriz, relacionado con la invasión tisular	10-30

Modificado de Wong et al<sup>17</sup>.

nes descritas anteriormente como «inactivadoras» en las histonas de la cromatina (tablas I y II). Sin embargo, no se conoce con exactitud la jerarquía mediante la cual ocurre esta silenciación y metilación del promotor del gen. Así, hay la posibilidad de que las MBD, proteínas de unión a regiones CpG, sean las efectoras de las modificaciones de las histonas, silenciando la expresión de este gen y, posteriormente, dando un orden de metilación de su promotor a través de las ADN metiltransferasas<sup>30</sup>. No obstante, también podría ser que la metilación del ADN fuese la que iniciara el resto de la cascada que conlleva la silenciación del gen.

Los mecanismos efectoros de silenciación de un gen metilado son dos. Por un lado, la inhibición directa de la interacción entre promotor y factores transcripcionales como AP-2, CREB, E2F, NF- $\kappa$ B y c-Myc. Por otro lado, la adhesión al complejo ADN-enzimas MBP de factores de transcripción con propiedades supresoras, como MeCP2 o MBD1<sup>31</sup>.

TABLA II. Genes supresores de tumor con expresión silenciada por metilación de su promotor

Gen	Nombre del gen	Tipo de tumor	Función	Referencias
<i>p14</i>	Inhibidor de cinasa 2a dependiente de ciclina (CDKN2A), beta	Cáncer colorrectal	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa	Esteller 2000; Fulda 2001
<i>p15</i>	Inhibidor de cinasa 2b dependiente de ciclina	Hematológicos	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa	Li 1995; Tien 2001
<i>p16</i>	Inhibidor de cinasa 2a dependiente de ciclina (CDKN2A), alfa	Tumores sólidos	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa	Belinsky 1998; García 1999; Shim 2000
<i>BRCA-1</i>	Gen del cáncer de mama 1	Mama, ovario	Reparador del ADN	Magdiner 1998; Catteau 1999
<i>E-Cad</i>	Cadherina epitelial	Mama, gástrico	Adhesión intercelular	Zochbauer-Muller 2001; Garinis 2002
<i>APC</i>	Poliposis adenomatosa	Cáncer colorrectal, gástrico	Interacciona con betacatenina	Esteller 2000
<i>MLH1</i>	Homólogo humano de MutL. de <i>Escherichia coli</i> .	Cáncer colorrectal, gástrico	Reparador del ADN	Myohannen1998
<i>VHL</i>	Von Piel Lindau	Renal	Angiogénesis	Prowse 1997
<i>p73</i>	Proteína tumoral p73	Linfoma	Ciclo celular	Ping Siu 2002
<i>MGMT</i>	O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa	Cáncer colorrectal, gástrico, linfoma	Reparador del daño de ADN	Oue 2001
<i>pRb</i>	Retinoblastoma	Glioblastoma7	Ciclo celular	Nakamura 2001
<i>TIMP3</i>	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 3	Cáncer colorrectal, renal	Inhibe las metaloproteinasas de tejido	Esteller 2001
<i>DAPK1</i>	Proteincinasa asociada a muerte celular	Cérvix	Apoptosis por IFN	Dong 2001
<i>ER</i>	Receptor de estrógenos	Vejiga urinaria	Receptor	Habichi 2001
<i>p53</i>	Proteína tumoral p53	Hígado	Inhibidor del ciclo celular	Pogribny 2002
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association domain family protein 1</i>	Nasofaríngeo, ovario, riñón	Homólogo del efector RAS	Kwong 2002
<i>RARB2</i>	Receptor del ácido retinoico beta 2	Nasofaríngeo	R de ácido retinoico	Kwong 2002
<i>COX-2</i>	Ciclooxigenasa 2	Gastrointestinal	Síntesis de prostaglandinas	Kikuchi 2002
<i>CASP 8</i>	Caspasa 8	Meduloblastoma	Proteasa proapoptótica	Zuzak 2002
<i>EDN1</i>	Endotelina 1	Pulmón	Vasoconstrictor	Takai 2001

Modificado de Garinis et al<sup>29</sup>.

## EL PARADIGMA HIPOMETILACIÓN-HIPERMETILACIÓN

### Hipometilación del ADN

Desde los años setenta se conoce el fenómeno de hipometilación como una disminución en el número de citosinas metiladas que afecta a las secuencias repetitivas satélite, o regiones pericentroméricas, sobre todo en las neoplasias benignas o malignas. Esto confiere un riesgo de rotura al cromosoma, conduciendo directamente a una inestabilidad génica<sup>32,33</sup>. De forma análoga, la hipometilación puede afectar a la estructura de un gen, reorganizándola y, por tanto, modificando su función, activando el que estaba silenciado, o viceversa. Además, a través del fenómeno de interferencia transcripcional, puede influir en la metilación de genes vecinos.

Entre otras, la hipometilación génica es responsable de la activación de oncogenes, como *S100A4* en el CCR o *ciclina D2* en el carcinoma gástrico<sup>34</sup>, y del fenómeno de pérdida de la impronta genómica (*loss of imprinting*), responsable del desarrollo de cáncer tras la hipometilación de una determinada región génica como, por ejemplo, la del gen *IGF2A* en el CCR<sup>35</sup>.

### Hipermetilación del ADN

En la última década ha sido posible establecer dos tipos diferentes de hipermetilación en el genoma humano<sup>36</sup>. La me-

tilación llamada tipo A es la que existe de forma fisiológica a lo largo de todo el genoma, sin asociarse estrictamente con la aparición de cáncer y, por tanto, estando presente en el tejido sano. Característicamente, aumenta con la edad y, en algún momento, puede volverse aberrante y afectar a genes que intervienen en el ciclo celular, conduciendo al desarrollo de cáncer. Se desconoce el mecanismo desencadenante, pero se postula que está relacionado con progresivos ciclos de replicación del ADN. El máximo exponente de ello es la metilación de la región promotora del gen que codifica para el receptor de estrógenos, *ER*<sup>37</sup>, aunque afecta a otros, como *MyoD*, *CSPG2*, *IGF2*, *N33* o *PAX6*.

La metilación considerada como específica del cáncer, o tipo C, es la que afecta selectivamente a genes implicados en la carcinogénesis, por lo que no está presente en el tejido sano y es menos frecuente. Este fenómeno se relaciona con el fenotipo metilador, o CIMP (*CpG island methylator phenotype*)<sup>36</sup>.

## IMPLICACIONES DE LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DE UN GEN

La silenciación de un gen se da a través de la inactivación de sus dos alelos. Hasta hace unos años se creía que el único mecanismo inactivador era la presencia de mutaciones en ambos alelos del gen. Sin embargo, los conocimientos alcanzados en el campo de la metilación han permitido establecer con claridad la implicación de los dos mecanismos, el mutador y el metilador, en la silenciación génica.

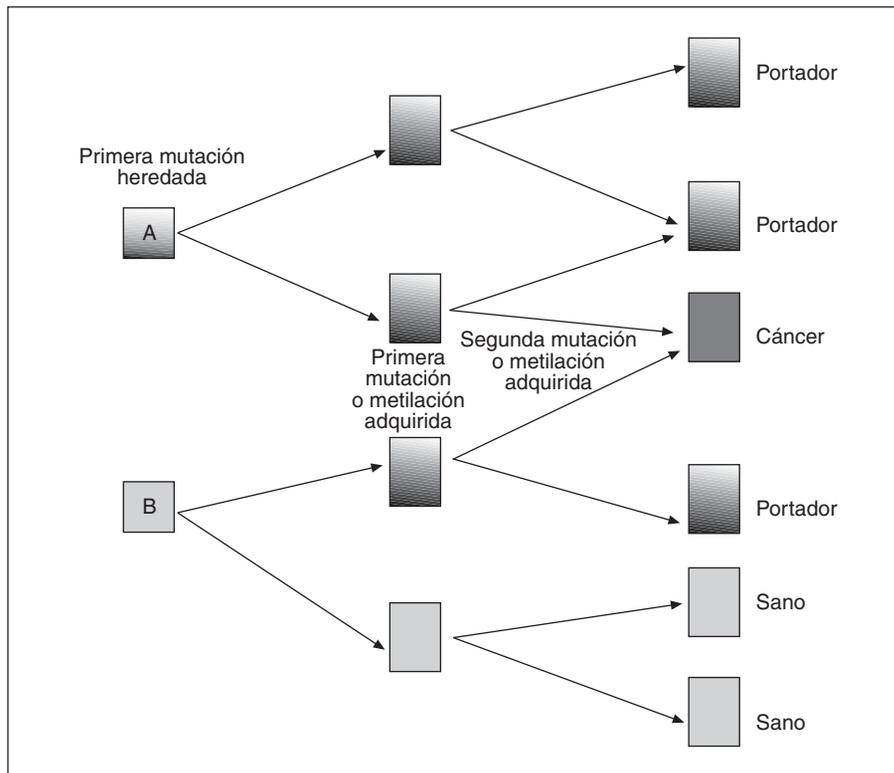


Fig. 3. Teoría del two-hit de Knudson, adaptada a la metilación. Panel A: uno de los 2 alelos es portador de una mutación de forma heredada (germinal). En su evolución, adquiere una segunda mutación o metilación del otro alelo, lo que comporta la inactivación del gen y el posterior desarrollo tumoral. Panel B: ningún alelo presenta una mutación de forma constitutiva, pero a lo largo del tiempo adquieren de forma somática 2 mutaciones, una mutación en un alelo y metilación del otro, o metilación de ambos alelos, con el mismo resultado: la inactivación del gen.

Por frecuencia, la primera opción que cabe considerar es la que contempla los mecanismos epigenéticos como eventos secundarios, no responsables de iniciar la silenciación de la transcripción de un determinado gen. De esta manera, muchos de los genes silenciados portarían una mutación en un alelo, heredada de alguno de los progenitores en los casos hereditarios, o adquirida con el paso del tiempo en los casos esporádicos, previa a la metilación del segundo. En esta eventualidad, la metilación afecta al alelo no mutado, o *wild type*<sup>38,39</sup>.

La segunda opción contempla la inactivación del gen mediante mecanismos exclusivamente epigenéticos. Esto ocurre en la inactivación del gen *MLH1* en el CCR esporádico con inestabilidad de microsatélites (IMS), en el cual, la metilación de los 2 alelos, separadamente o no en el tiempo, comporta la silenciación de este gen y la consecuente cascada de eventos mutagénicos propios de la vía mutadora (alteración del mecanismo de reparación del ADN)<sup>40,41</sup>. De esta forma, en la teoría clásica del *two-hit* de Knudson, se sustituiría una o 2 de las mutaciones por la metilación de uno o los 2 alelos (fig. 3).

## METILACIÓN Y CÁNCER COLORRECTAL

### Inestabilidad de microsatélites

La IMS se define como un fenómeno de inserción o delección aberrante de mononucleótidos o dinucleótidos repetitivos en la secuencia de ADN<sup>42</sup>. La reparación de este ADN está a cargo de un conjunto de genes, principalmen-

te *MLH1* y *MSH2*, cuya mutación germinal es la responsable del CCR hereditario no polipósico o síndrome de Lynch<sup>41</sup>. Muy recientemente, se ha descubierto la existencia de alteraciones epigenéticas germinales («epimutaciones») en el gen *MLH1*, las cuales podrían transmitirse a la descendencia de igual forma que ocurre con las mutaciones germinales convencionales<sup>43</sup>.

La mutación somática de estos genes reparadores del ADN, más concretamente del gen *MLH1*, sólo justifica un 10% de las formas esporádicas de CCR con IMS, y es mucho más frecuente la silenciación de este gen por hipermetilación de su promotor. La silenciación de *MLH1* por hipermetilación de su promotor puede llegar a representar el 10-15% del total de casos de CCR.

El 90% de los tumores con IMS no asociados al síndrome de Lynch presentan metilación de los 2 alelos del gen *MLH1*, la cual se acompaña de mutaciones somáticas en diversos genes, entre los que destacan *BRAF*, *BAX* y *TGFBR2*. Esta circunstancia demuestra la interrelación entre las vías genética y epigenética, aunque la cronología exacta en que ocurren estos dos fenómenos no está bien establecida<sup>44-48</sup>. Estos tumores presentan un fenotipo muy parecido a los que acontecen en el contexto del síndrome de Lynch<sup>49</sup>.

### Fenotipo metilador en el cáncer colorrectal

En 1999, Toyota et al<sup>36</sup> realizaron un estudio de 30 secuencias CpG metiladas (*MINT 1-33*) y 3 genes (*p16*, *THBS1* y *MLH1*) en 50 muestras de CCR y 15 muestras

de adenoma, mediante dos técnicas, una cualitativa y otra cuantitativa, cuya concordancia fue del 98%. Al estudiar la metilación en las muestras de cáncer y adenomas, se distinguió entre metilación tipo A y C. La metilación A englobaba genes metilados en las muestras de cáncer, pero también en la mucosa sana circundante, en una proporción variable según la muestra, siguiendo el patrón descrito anteriormente para genes como *ERA*, *MyoD* y *N33*. La metilación tipo C se refería a genes únicamente metilados en el tumor.

En el estudio de la metilación tipo C se observaron claramente 2 grupos: un grupo con una elevada proporción de metilación de este tipo en el que todas las muestras de tumor tenían metilados 3 o más *loci* de forma simultánea, y otro grupo donde la metilación tipo C era extremadamente rara. En ninguno de estos 2 grupos se observó metilación en la mucosa sana. Este patrón también se observó en el 50% de los adenomas, lo que sugiere que la metilación es un evento precoz en el proceso de carcinogénesis colorrectal.

Al fenómeno descrito en el primer grupo con metilación tipo C en 3 o más *loci* de los genes descritos se le denominó fenotipo metilador de secuencias CpG (CIMP), el cual también se ha observado en otras neoplasias: ovario<sup>50</sup>, páncreas<sup>51</sup>, hígado<sup>52</sup>, estómago<sup>53</sup>, cerebro y neoplasias hematopoyéticas. Dentro de este grupo con fenotipo metilador, se subclasificó arbitrariamente en función del número de genes metilados en CIMP-*low* (metilación de menos del 50% de los genes del panel CIMP) y CIMP-*high* (metilación del 50% o más de los genes del panel CIMP)<sup>54</sup>.

En el estudio mencionado de Toyota et al, los tumores que mostraban este fenotipo CIMP no parecían estar relacionados con la edad, el sexo o el estadio evolutivo, pero sí parecían tener una localización común en el colon ascendente o el ciego (82%). Posteriormente, se relacionó, hasta en un 70% de los casos, el fenotipo metilador con la IMS secundaria a metilación del gen *MLH1*, y se observó que los tumores CIMP y con IMS compartían características comunes: localización en el colon derecho, bajo grado de diferenciación, presencia de mucina y elevada incidencia en mujeres de edad avanzada<sup>55-57</sup>.

A pesar de que Toyota et al relacionaban el fenotipo metilador con la metilación específica de cáncer, independiente de factores como la edad, algunos estudios posteriores han hallado una gran relación entre ésta y la metilación de estos *loci*. Por ello, algunos autores descartan la diferencia entre metilación tipo A y tipo C, y la asociación de esta última con el fenotipo metilador, argumentando que las características biológicas y clínicas de los tumores pertenecientes a este grupo se debían a la metilación debida al azar de unos *loci* concretos<sup>58</sup>.

Por otro lado, a partir de un estudio que evaluaba los antecedentes familiares de cáncer en individuos con fenotipo metilador<sup>59</sup> se ha relacionado este fenotipo con un mecanismo epigenético de origen hereditario. Sin embargo, estos resultados no han podido reproducirse en un estudio posterior con participación de más de 500 pacientes<sup>60</sup>.

El primer consenso respecto al fenotipo metilador, después de todas las controversias, fue plasmado por Issa, en

2004<sup>61</sup>. En este consenso quedó establecido que no todos los genes eran igualmente susceptibles a ser metilados en el cáncer; que la metilación, en ocasiones, iba precedida de la silenciamiento del gen por otros mecanismos; que la selección natural desempeña un papel en la predisposición a metilar genes supresores de tumor e hipometilar oncogenes y, por último, que otros eventos, como la inflamación crónica o los factores ambientales, pueden influir en la activación de la maquinaria metiladora de determinados genes.

Issa<sup>61</sup> también propuso una explicación de la relación entre el fenotipo metilador y la edad, teniendo en cuenta que el fenotipo CIMP incluye una serie de genes metilados únicamente en el cáncer, diferenciándose de la metilación tipo A por el hecho de que no está presente en tejido sano ni distribuido por todo el genoma. Así, durante el desarrollo embrionario tendría lugar diferentes grados de la denominada *metilación de novo*, la cual controlaría la expresión génica según las necesidades del desarrollo tisular. Esta metilación, probablemente de tipo A, se extiende hasta las zonas CpG próximas al promotor de un gen, donde se encuentran las islas CpG. El acceso a estas regiones promotoras estaría protegido por determinadas estructuras, como los complejos proteicos PcG (*polycomb group protein complexes*) o por la expresión de otros genes relacionados. Esta protección se puede perder o debilitar con la edad, intrínsecamente o por la disminución de la expresión de genes que controlan esta barrera. En otros genes (metilación de tipo C) esta protección es más sólida y precisa algún mecanismo que rompa esta barrera, probablemente una alteración genética (mutación), no presente en el tejido sano. De esta forma, estos genes se harían accesibles a la metilación de las islas CpG de su promotor, fenómeno observado en el cáncer asociado al fenotipo CIMP. Por último, el mecanismo genético que rompe la barrera de protección podría ser sustituido por mecanismos exógenos, como los virus, una dieta pobre en ácido fólico o una inflamación crónica.

En el año 2006<sup>62</sup> se publicó el mayor estudio sobre metilación realizado hasta ahora. En él se estudiaron 195 genes en muestras de cáncer y tejido sano, lo que permitió establecer un nuevo panel para definir el fenotipo CIMP, y relacionó este fenotipo con la mutación BRAF V600 E. En este sentido, los marcadores *p16*, *MLH1*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31*, empleados por Toyota e Issa, fueron sustituidos por los marcadores propuestos por Weisenberger (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOC1*). Esta publicación abrió un debate interesante entre los diversos grupos en relación con los diferentes marcadores utilizados para definir el fenotipo CIMP<sup>63</sup>.

## NUEVAS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE METILACIÓN

Las técnicas cualitativas de detección de metilación génica (*methylation specific PCR* [MSP]) han quedado relegadas desde hace unos años en beneficio de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en

TABLA III. Estrategias de terapia epigenética

Primera estrategia terapéutica	Gen desmetilado	Segunda estrategia terapéutica	Consecuencia
Inhibición de histona deacetilasas	<i>p21</i>	–	Inhibe el crecimiento del tumor
Inhibición de ADN metiltransferasas	<i>p16, MLH1</i>	Quimioterapia o inmunoterapia	Estimula la apoptosis
Inhibición de ADN metiltransferasas y histona deacetilasas	<i>p21, p16, MLH1</i> y micro-ARN	–	Estimula la apoptosis. Los micro-ARN regulan negativamente la expresión de oncogenes
Quimioterapia	–	Inhibición de ADN metiltransferasas	Diferenciación células madre

Modificado de Jones y Baylin<sup>2</sup>.

tiempo real y tecnología TaqMan<sup>64</sup>. Estas técnicas tienen una alta sensibilidad y especificidad, y permiten una cuantificación precisa de la metilación. En ellas, el ADN obtenido de tejido se trata con bisulfito sódico, de forma que las citosinas no metiladas se convierten en uracilos<sup>65</sup>, los cuales se convierten a timidinas durante el proceso de PCR, mientras que permanecen intactas las citosinas metiladas. Esta diferencia generada en la secuencia del ADN permite discriminar el ADN metilado del no metilado en el proceso posterior de PCR a tiempo real mediante sondas fluorescentes específicas para las regiones promotoras de cada uno de los genes evaluados, y cuantificar la cantidad de cada una de ellas.

## TERAPIA EPIGENÉTICA

El objetivo principal de la terapia epigenética es revertir la silenciación génica provocada por la metilación del promotor. Respecto a las dianas sobre las que actuar, el bloqueo de las ADN metiltransferasas ha sido hasta ahora el mecanismo más popular. Hace 30 años fue descubierto el primer inhibidor de ADN metiltransferasa (5-azacitidina)<sup>66</sup>, pero tardó varios años en ser aceptado para el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos. Otros inhibidores de nucleósidos, como el 5-fluoro-2'-deoxicitidina y zebularina, se están evaluando en estudios en fase I.

La principal limitación de los inhibidores de ADN metiltransferasas es la toxicidad asociada. La mielosupresión dependiente de la dosis es la más importante, aunque se intenta evitar disminuyendo la dosis, dado que el efecto desmetilante se consigue a menor dosis que la citotóxica. Tampoco es despreciable la aparición de náuseas y vómitos. Otras limitaciones son la baja estabilidad del fármaco, la escasa biodisponibilidad por vía oral y su rápida eliminación, que comportan frecuentes estancias hospitalarias para su administración. Si además se tiene en cuenta que los genes desmetilados a través de este mecanismo presentan una remetilación en pocos días<sup>67</sup> y que hay mutaciones de las ADN metiltransferasas que permiten escapar al efecto de estos fármacos, es evidente la necesidad de hallar otras dianas sobre la que actuar para revertir la metilación.

En la actualidad se están evaluando los inhibidores de las histonas-deacetilasas<sup>68,69</sup>, entre los que destacan el ácido hidroxámico y sus derivados. Estos fármacos inhiben *in vitro* la proliferación del tumor e inducen apoptosis, aunque su efecto varía según la línea tumoral estudiada. Re-

cientemente la FDA ha aprobado el SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Sin embargo, al igual que las ADN metiltransferasas, no posee especificidad por un gen concreto.

Los inhibidores de las histona-metiltransferasas son otra alternativa válida para reactivar los genes silenciados por la metilación, ya sea aisladamente o en combinación con otros inhibidores epigenéticos. No obstante, tampoco son específicos, por lo que también podrían llegar a reactivar genes de forma indiscriminada.

Los inhibidores no nucleósidos de ADN metiltransferasas, como la procainamida, los polifenoles del té y, recientemente, el RG101, no requieren ser incorporados al ADN para ejercer su acción. Poseen una menor toxicidad (mielosupresión) pero también tienen una menor potencia terapéutica. Por último, otras estrategias de reactivación basadas en micro-ARN de genes supresores de tumor podrían formar parte de la terapia epigenética en el futuro<sup>70</sup>, pero de momento se dispone de muy poca información al respecto.

Como se ha comentado anteriormente, la principal limitación de los inhibidores conocidos es que no son específicos de gen, y pueden reactivar genes de forma indiscriminada. En contraposición a esto, se ha sugerido que estos inhibidores únicamente actuarían sobre las células en división, lo que podría suponer una afinidad por los genes anormalmente silenciados en el cáncer. En este sentido, parece que la cromatina que contiene genes silenciados de forma aberrante es más susceptible a la reactivación que la cromatina compacta inducida por una silenciación fisiológica<sup>71,72</sup>.

En la actualidad, se desconoce si el futuro está en el control de la dosis de los inhibidores de nucleósidos, su combinación o el uso de inhibidores de las histona-metiltransferasas, micro-ARN u otras alternativas terapéuticas (tabla III). No obstante, hay pocas dudas acerca de que un mayor conocimiento de la estructura global de la cromatina que contiene los genes silenciados abrirá nuevos campos de investigación que permitan establecer una terapia epigenética segura y eficaz, con incuestionables implicaciones en la prevención primaria del cáncer.

## AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a las ayudas recibidas del Fondo de Investigación Sanitaria (PI 05/1285), del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 04-07190) y de la Asociación Española contra el Cáncer.

Victòria Gonzalo disfruta de un contrato de investigación del Hospital Clínic y Sergi Castellví-Bel de un contrato de investigador del Fondo de Investigación Sanitaria (CP 03-0070, Ministerio de Sanidad).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. *Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC CancerBase N.º 5. version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr>
2. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128:683-92.
3. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004;36:417-22.
4. Cadieux B, Ching TT, Vandenberg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res*. 2006;66:8469-76.
5. Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature*. 1998;393:311-2.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
7. Narayan A, Ji W, Zhang XY, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, Ehrlich M. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 1998;77:833-8.
8. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99:247-57.
9. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, et al. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;89:121-8.
10. Xu GL, Bestor TH, Bouchis D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999;402:187-91.
11. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349:2042-54.
12. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-28.
13. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21:163-7.
14. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006;6:107-16.
15. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006;7:21-33.
16. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;301:179-201.
17. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 2007;56:140-8.
18. Ramsahoye BH, Binizskiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:5237-42.
19. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964;51:786-94.
20. Ng HH, Jeppesen P, Bird A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1394-406.
21. Saito M, Ishikawa F. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem*. 2002;277:35434-9.
22. Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*. 2003;3:89-95.
23. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res*. 2002;62:7213-8.
24. Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*. 2003;23:206-15.
25. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature*. 2004;430:161-4.
26. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000;24:88-91.
27. Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem*. 2001;276:32282-7.
28. Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Com*. 2004;318:544-55.
29. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 2002;111:115-27.
30. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome: components and functional correlates. *Genes Dev*. 2006;20:3215-31.
31. Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *Embo J*. 1992;11:327-33.
32. Ji W, Hernández R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M, et al. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res*. 1997;379:33-41.
33. Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;109:34-9.
34. Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Kitada Y, Yoshida K, Chayama K, et al. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol*. 2003;23:1663-70.
35. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res*. 2002;62:6442-6.
36. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8681-6.
37. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet*. 1994;7:536-40.
38. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:157-62.
39. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res*. 1998;58:591-3.
40. Castells A, Paya A, Alenda C, Rodríguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M, et al. Cyclooxygenase 2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. *Clin Cancer Res*. 2006;12:1686-92.
41. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005;293:1986-94.
42. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248-57.
43. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *N Engl J Med*. 2007;356:697-705.
44. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:191-5.
45. Esteller M, Riques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair

- gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A: T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4689-92.
46. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut.* 2004;53:1137-44.
  47. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espin E, et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene.* 2003;22:9192-6.
  48. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 2003;63:5209-12.
  49. Esteller M, Silva JM, Domínguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:564-9.
  50. Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan DW, Sargent J, Paul J, et al. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol.* 2001;158:1121-7.
  51. Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2000;60:1835-9.
  52. Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, et al. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:755-61.
  53. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res.* 1999;59:5438-42.
  54. An C, Choi IS, Yao JC, Worah S, Xie K, Mansfield PF, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:656-63.
  55. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology.* 2002;122:1376-87.
  56. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005;129:837-45.
  57. Van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut.* 2002;51:797-802.
  58. Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell.* 2003;4:121-31.
  59. Frazier ML, Xi L, Zong J, Viscofsky N, Rashid A, Wu EF, et al. Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003;63:4805-8.
  60. Ward RL, Williams R, Law M, Hawkins NJ. The CpG island methylator phenotype is not associated with a personal or family history of cancer. *Cancer Res.* 2004;64:7618-21.
  61. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:988-93.
  62. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38:787-93.
  63. Castellvi-Bel S, Castells A. CpG island methylator phenotype: the third way of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132:1184-5.
  64. Eads CA, Danenberg KD, Kazuyuki K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucl Acids Res.* 2000;28:e32; doi:10.1093/nar/28.8.e32 2000.
  65. Frommer M, McDonald L, Millar D, Collis C, Watt F, Grigg G, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS.* 1992;89:1827-31.
  66. Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature.* 1977;267:364-6.
  67. Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6690-8.
  68. Marks PA, Jiang X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle.* 2005;4:549-51.
  69. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:38-51.
  70. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2006;9:435-43.
  71. Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, et al. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:14007-12.
  72. Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002;62:961-6.