



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"INHIBICION DE LA METILACION DEL GEN DE RECEPTOR
A ESTROGENOS Y GENES SUPRESORES p 16 y Rb EN LINEAS
DE CANCER DE MAMA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
BIOL. BLANCA ANGELICA SEGURA PACHECO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ

MEXICO, D. F.



COORDINACIÓN

MARZO DE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Blanca Angélica Segura Pacheco
FECHA: 17 Junio 2004
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de marzo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Segura Pacheco Blanca Angélica, con número de cuenta 99810092, con la tesis titulada: "Inhibición de la mutilación del receptor a estrógenos y genes supresores p16 y Rb en líneas de cáncer de mama", bajo la dirección del(a) Dr. Alfonso Dueñas González.

Presidente:	Dr. Rafael Camacho Carranza
Vocal:	Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas
Secretario:	Dr. Alonso Dueñas González
Suplente:	Dr. Jorge Meléndez Zajgla
Suplente:	Dr. Alejandro Mohar Betancourt

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de diciembre de 2003.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Al Dr. Alfonso Dueñas:

Gracias, por la oportunidad de aprender a su lado, a la confianza y apoyo que siempre me ha dado en todo lo que hemos realizado.

A mi beba:

Querida Nayeli, gracias por entrar a la escuela tan bebe para que tu mamá pudiera hacer esta tesis de maestría.

Te quiero.

A mí "Oso":

La beca otorgada parece haber tenido buenos resultados, gracias, por que sin tu cariño y apoyo no hubiera seguido con mi carrera.

A mis Papas y Hermanos:

Todo el amor, cariño, apoyo etc que siempre me han procurado, es una razón por la cual seguir adelante, gracias.

INDICE

1.0 Resumen	4
2.0 Conceptos generales del cáncer.....	5
3.0 Biología molecular del cáncer.....	5
3.1 Mecanismos de activación de oncogenes e in activación de genes supresores de tumores	6
3.2 Metilación	7
3.3 Técnicas para estudiar la metilación del DNA.....	9
4.0 Metilación del DNA y cáncer.....	10
4.1 Metilación del gen ER α	15
4.2 Metilación de p16/p16 INK4A/CDKN2A/MTS.....	18
4.3 Metilación del gen RAR β	19
5.0 La metilación como un blanco terapéutico.....	20
5.1 Inhibidores de metilación.....	21
5.1.1 5-Aza-2-deoxicitidina (5azaCdr)	21
5.2 Hidralazina y procainamida como nuevos agentes desmetilantes.....	23
5.2.1 Hidralazina.....	24
5.2.2 Procainamida.....	27
6.0 Hipótesis.....	29
7.0 Objetivo principal.....	29

8.0	Material y métodos.....	30
8.1	Líneas celulares, Biopsias y Reactivos.....	30
8.2	Tratamiento con 5-Aza-CdR, hidralazina y procainamida.....	30
8.3	RT-PCR	30
8.4	Western blots.....	31
8.5	Análisis de la Metilación	32
8.6	Duración del efecto reactivante de la expresión génica DNA.....	33
8.7	Ensayos de funcionalidad de los productos de los genes re-expresados <i>ER</i> y <i>p16</i>	33
8.8	Experimentos <i>in vivo</i>	34
8.9	Actividad desmetilante de hidralazina en un paciente con cáncer de cérvix.....	34
9.0	Resultados.....	35
10.0	Discusión y conclusiones.....	40
11.0	Referencias.....	44

1.0 RESUMEN

La inactivación de genes supresores por metilación participa en el desarrollo del cáncer y la progresión del tumor, así la reactivación de genes supresores silenciados por metilación podría representar un avance en la terapéutica del cáncer. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue investigar si el antihipertensivo hidralazina y el antiarrítmico procainamida, dos conocidos inhibidores de metilación del DNA capaces de desmetilar y reactivar genes supresores. Nuestros resultados demuestran que ambas drogas desmetilan y re-expresan el producto funcional de genes supresores inactivados por metilación no solo en células en cultivo sino también en ratones inmunodeficientes, así como en un paciente con cáncer de cérvix. Nuestros resultados indican que estas drogas podrían ser usadas en la clínica como tratamiento contra el cáncer, probablemente para incrementar la eficacia de los tratamientos biológicos y quimioterapéuticos ahora usados.

2.0 CONCEPTOS GENERALES DEL CANCER.

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial. Se define como un grupo de enfermedades que afecta principalmente a la población adulta y cuya máxima incidencia ocurre en la séptima década de la vida. Dos tercios de todos los casos ocurren en personas mayores de 65 años de edad (*Cole P, Rodu B 2001*). Este grupo de enfermedades comparten a nivel clínico algunas características, entre las que se encuentran la capacidad de producir síntomas y signos clínicos derivados directamente de la presencia del tumor a nivel local y manifestaciones multisistémicas como consecuencia de las alteraciones en el metabolismo intermediario inducidas por el tumor. A nivel molecular comparte también características comunes como son la alteración de muchos genes, que actuando en conjunto, van a determinar que el tumor, en un sentido "Darwiniano" seleccione las poblaciones celulares que le proporcionan una ventaja en supervivencia. Así, el fenotipo tumoral resultante le permite tener mayor crecimiento, capacidad de invadir y producir metástasis a distancia, angiogénesis, capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral y resistencia a los tratamientos.

3.0 BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÁNCER.

El cáncer se origina por un desbalance en la expresión de los proto oncogenes y genes supresores debido a alteraciones genéticas. Este desbalance, induce diferentes eventos como el aumento en la proliferación celular, una disminución en la diferenciación etc , favoreciendo así el desarrollo del cáncer, como se esquematiza en la figura 1

CÁNCER. Bases Moleculares

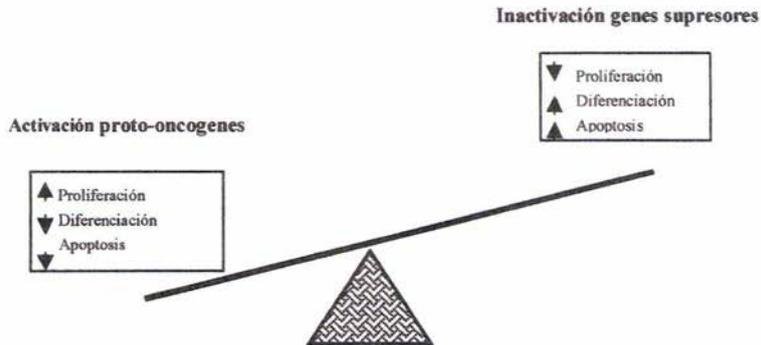


Fig.1. El cáncer se origina de un desbalance en la homeostasis de los tejidos, debido al aumento de la tasa de proliferación con respecto a la tasa de apoptosis. Este fenotipo se debe a un desequilibrio de la activación de proto-oncogenes y genes supresores.

3.1 MECANISMOS DE ACTIVACION DE ONCOGENES E INACTIVACION DE GENES SUPRESORES DE TUMORES.

La carcinogénesis depende de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores que generan el fenotipo tumoral.

Los principales mecanismos de activación o inactivación de genes se deben principalmente a alteraciones genéticas como mutaciones, deleciones, translocaciones, metilación etc.

Fig.2. El proceso de carcinogénesis se lleva a cabo por la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores desarrollando fenotipos tumorales como la pérdida de la diferenciación, alteración de la relación núcleo-citoplasma etc.



Uno de los mecanismos importantes de inactivación de genes supresores y que su estudio ha tenido un fuerte auge en los últimos años, es el de la metilación del DNA.

3.2 METILACIÓN

La metilación del DNA es un proceso epigenético mediante el cual de manera enzimática se adiciona un grupo metilo al carbono cinco de los residuos citosina incluidos en los dinucleótidos CpG. La secuencia palindrómica CpG es relativamente infrecuente en el genoma de los mamíferos, éstas secuencias en su mayoría se encuentran metiladas. Sin embargo, las regiones promotoras de varios genes contienen también áreas ricas en CpG, llamadas islas CpG. Las citosinas que se encuentran en las islas están usualmente desmetiladas en células normales adultas, con la excepción de islas pertenecientes a genes del cromosoma X inactivo, genes que son silenciados de forma parental y otros genes que no han sido identificados todavía. El estado de metilación de las islas CpG es un importante mecanismo de regulación de la estructura de la cromatina y de la transcripción. (Rountree MR et al 2001)

Varios estudios han analizado la metilación *in vitro* de diferentes regiones de plásmidos episomales, los cuáles forman minicromosomas posterior a la transfección de células en cultivo. Ahora se conoce que la densidad de la metilación en éstas islas correlaciona inversamente con la actividad génica, pero es independiente de la posición y distancia de las secuencias metiladas al sitio de la transcripción. Originalmente, se pensaba que la inhibición de la transcripción por la metilación era directamente realizada por la unión de un factor de transcripción unido al sitio de inicio. Ahora se sabe que, el silenciamiento de los genes debido a la metilación se lleva a cabo también por los cambios conformacionales de la cromatina que limitan la accesibilidad a los promotores. Como se muestra en la figura 3 el DNA metilado es el blanco de la

proteína, MBP (methyl-binding protein), que promueve la formación de un complejo de proteínas que reprimen la transcripción. MBP tiene un dominio represor transcripcional que se une al co-represor mSin3A, el cuál a su vez recluta varias proteínas al complejo incluyendo los desacetiladores de histonas HDAC 1 y 2. (Wade P 2001)

La desacetilación de los residuos de lisina en las histonas H3 y H4 enmascara la carga positiva de la lisina, aumentando la interacción entre las histonas y bloqueando el acceso a la maquinaria de transcripción. (Muller-Tidow C et al 2001)

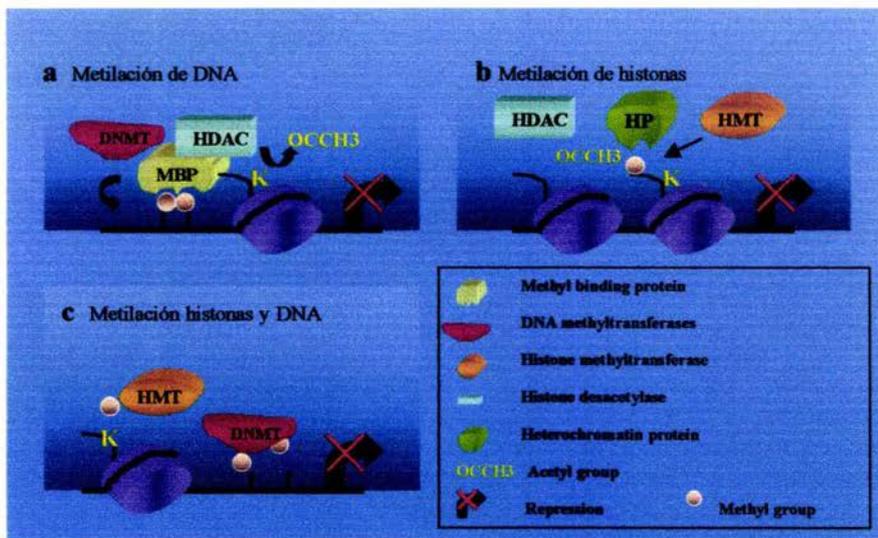


Fig. 3. La metilación del dinucleótido CG por DNMT en algunos promotores de genes permite el reclutamiento de proteínas como MBP para llevar a cabo la compactación de la región por medio de la desacetilación de las colas de las histonas (a,c). Por otro lado, la metilación de la lisina 9 de la histona H3 permite un mayor grado de compactación cuando la proteína HP1 se une a la H3 (b).

3.3 Técnicas para estudiar la metilación del DNA

La metilación del DNA puede ser estudiada desde diferentes ángulos debido a la gran variedad de técnicas disponibles (Fraga M, Esteller M.2002). El cuadro siguiente muestra las técnicas conocidas, divididas en los métodos que usan bisulfito de sodio y aquellos que no lo usan.

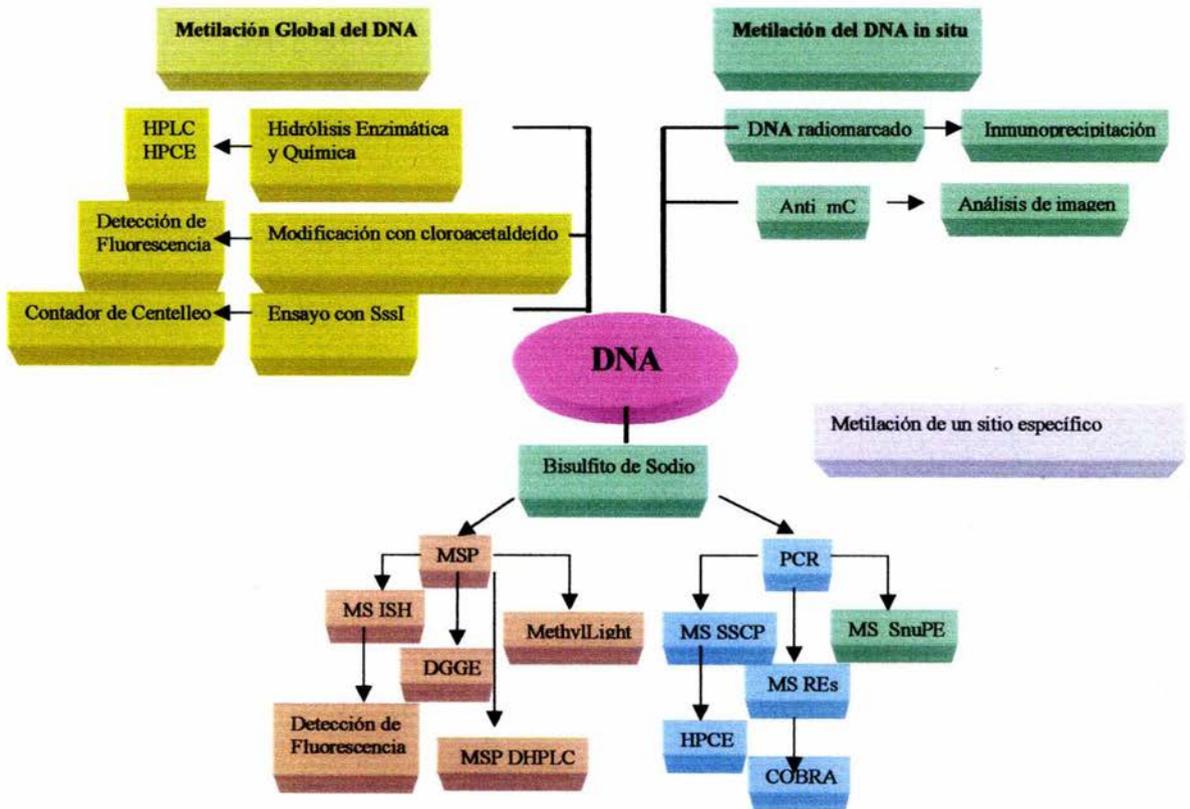


Fig. 4. Principales métodos para el estudio de la Metilación. MSP (Methylation Specific PCR) MS SnuPE (Methylation sensitive single nucleotide primer extension) MS SSCP (Methylation sensitive single stranded conformational polymorphism) MS Res (Methylation sensitive restriction endonucleases) MS ISH (Methylation specific in situ hybridization) COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

4.0 Metilación del DNA y cáncer.

Los cambios epigenéticos en las células son los responsables de los diferentes patrones de expresión génica durante el desarrollo normal de un individuo. Sin embargo, se ha demostrado que existen cambios epigenéticos anormales que juegan un papel muy importante en la generación de varias enfermedades incluyendo el cáncer. La carcinogénesis es un proceso muy complejo de varios pasos. Dentro de la transformación de una célula normal a una tumoral suceden cambios genéticos que llevan a la progresión. Uno de los eventos más importantes es la pérdida de genes supresores de tumor por mutaciones y deleciones, así como también la activación constitutiva o amplificación de oncogenes. Últimamente se ha aclarado un poco más el panorama con respecto a las alteraciones epigenéticas que pueden silenciar a los genes supresores. La metilación del DNA juega un papel crítico en la iniciación y progresión del cáncer. La metilación *de novo* es relativamente rara en las células somáticas normales, sin embargo, para algunos genes la metilación en las islas CpG se incrementa con la edad como es el caso de la mucosa del colon. (Issa *et al.* 1994; Toyota *et al.* 1999) Esta metilación generada por la edad puede predisponer la iniciación de un tumor, sin embargo no se conocen con exactitud los mecanismos que la desencadenan. Tal metilación *de novo* en células malignas se ha reportado en varios genes supresores de tumor incluyendo Rb, VHL, APC y MLH1 (Ohtani-Fujita *et al.* 1993; Herman *et al.* 1994; Hiltunen *et al.* 1997; Herman *et al.* 1998). En varios casos, el tratamiento de líneas celulares como LNCaP (Cáncer de próstata) con 5-aza-2'-deoxycitidina, permite la desmetilación de las islas CpG y la re-expresión de genes como *GSTP1* y *PR*, sugiriendo que la metilación aberrante de éstas islas CpG juega un papel muy importante en la represión de la transcripción de genes clave en las células. (Karpf A y Jones D 2002)

Sin embargo, a pesar de esto, todavía no es claro si la metilación es la iniciadora de la represión transcripcional o es el paso final.

DNA metiltransferasas (DNMT), son las enzimas responsables de catalizar la transferencia del grupo metilo a la citosina, se conoce en algunos modelos que la sobre expresión de éstas enzimas podría aumentar la metilación. (Robertson KD 2001) Varias líneas celulares expresan en grandes cantidades de DNMT1 aún cuando se encuentran arrestadas en G0 (Robertson KD et al 2000) este aumento en la expresión de DNMT1 también puede generar transformación de fibroblastos inmortales. (Wu *et al.* 1993; Vertino *et al.* 1996) En tumores sólidos (pulmón, colon, mama etc.) se ha demostrado sobre expresión de DNMT1 en el tejido tumoral comparado con tejido normal adyacente. (Counts y Goodman. 1995; Laird y Jaenisch. 1994; Miyoshi *et al.* 1993; Issa *et al.* 1993). Estudios posteriores hechos con oligonucleótidos antisentido (MG98) demostraron que la DNMT1 es en parte responsable de los patrones de metilación alterados observados en cáncer, pero las que mantienen la hipermetilación regional son DNMT3a y DNMT3b. (Rhee I et al 2000; Rhee I et al 2002)

Las características de las tres DNMTs explican de cierta forma la participación que tienen en el cáncer. DNMT1 es regulada por las proteínas PCNA y Rb que están ligadas al ciclo celular (Szyf *et al.* 1985; Szyf *et al.* 1991) El patrón de metilación del DNA se mantiene gracias a la asociación de la actividad de DNMT1 con la fase S del ciclo (Araujo *et al.* 1998; Chuang *et al.* 1997). El inhibidor de ciclo celular p21^{CIP1} puede por competencia acabar con la asociación entre DNMT1 y PCNA, teniendo una gran influencia en la actividad de las dos proteínas (Araujo *et al.* 1998). La expresión de p21 es usualmente disminuida en células malignas, pero principalmente se ha demostrado que los niveles de DNMT1 son inversamente proporcionales a los niveles de p21 (Araujo *et al.* 1998; Nass *et al.* 1999). Si se cambia la relación DNMT1/p21 se altera la

maquinaria de metilación, contribuyendo a un patrón de metilación aberrante parecido al observado en cáncer. La expresión de DNMT3 a y b se ha encontrado aumentada en varias líneas celulares (Robertson KD *et al.* 1999). Es interesante, como estas enzimas son capaces de metilar *de novo*, (lo que no hace que DNMT1) ya que reconocen DNA sin tener cadenas metiladas.

La metilación es una señal reversible que de por sí puede alterar la expresión de los genes pero también puede contribuir al incremento en la frecuencia de mutaciones de citosina a timidina derivadas de la deaminación de la 5-metilcitosina (Laird y Jaenisch. 1995). Se ha demostrado que la tasa de mutación de 5-metilcitosina es hasta de 40 veces mayor que para las otras bases nitrogenadas (Cooper y Krawczak. 1990; Yandell *et al.* 1989) Hasta el momento se han encontrado algunos genes que están inactivados por mutaciones de este tipo uno de los más conocidos es p53, pero definitivamente la metilación participa más en la inactivación de genes de forma epigenética que genética. En el cuadro 1, se muestran ocho genes supresores de una gran cantidad de genes que se encuentran metilados. En este trabajo decidimos estudiar los genes del receptor estrogénico, p16 y RAR β debido a que su hipermetilación y silenciamiento se han visto en una gran cantidad de tumores y además, existen modelos experimentales bien definidos para su estudio *in vitro* e *in vivo*.

CUADRO 1. GENES SUPRESORES METILADOS

GENES HIPERMETILADOS	FUNCIÓN
BRC1A1	REPARACIÓN ADN
DAPK	REGULACION DE APOPTOSIS
HMLH1	REPARACION DE DNA
O6-MGMT	REPARACIÓN DE ADN
P16	REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR
RARB	DIFERENCIACION CELULAR
ER α	DIFERENCIACION CELULAR

4.1 METILACION DEL GEN ER α .

ER α es un receptor nuclear que debe interactuar con la hormona esteroidea, estrógeno, para poder unirse específicamente al DNA y activar genes dependientes de la respuesta a esta hormona. El estrógeno y su receptor juegan un papel importante en el desarrollo y función de la glándula mamaria normal (Borellini y Oka. 1989).

Se cree que esta hormona es un factor importante en la iniciación y/o progresión del cáncer de mama, debido a que estimula el crecimiento de las células epiteliales de esta glándula (Korach. 1994). Existen tres factores de riesgo para el cáncer de mama: edad de la primera menarca, como del primer embarazo y la menopausia; ya que todos estos procesos se encuentran asociados a los dramáticos cambios en la secreción de los estrógenos durante la vida de las mujeres (Henderson *et al.* 1988). Los tumores que expresan ER α crecen lentamente, son más diferenciados y están asociados a una supervivencia más larga de los pacientes, mientras que los tumores negativos al receptor presentan características más agresivas (Knight III *et al.* 1977; McGuire 1978; Allegra *et al.* 1979; Fisher *et al.* 1988; Pichon *et al.* 1996). El tratamiento que se les da a las pacientes con cáncer de mama está relacionado a la expresión de ER, es decir, si el tumor es positivo entonces será susceptible al tratamiento endocrino con antiestrógenos como tamoxifén, el cuál bloquea la función de ER (McGuire 1978; Allegra *et al.* 1979; Kuukasjarvi *et al.* 1996).

Alrededor del 30% de los pacientes de primera vez no expresan ER y el 10% de los pacientes que recurren después del tratamiento a hormonoterapia también dejan de expresar el ER.; el problema con estos tumores es que son resistentes a la

hormonoterapia, además de ser más agresivos. (Kuukasjarvi *et al.* 1996, Hull *et al.* 1983; Rassmussen y Kamby. 1989).

El mecanismo molecular responsable de la pérdida de la expresión del gen de *ER* aún no se conoce a la perfección pero se tienen como modelos líneas celulares que no expresan *RNA_m* de *ER* (Barret-Lee *et al.* 1987; Ottaviano *et al.* 1994). La ausencia del *RNA_m* de *ER* en éstas líneas celulares no está relacionado con alguna mutación, sugiriendo que la inhibición de la transcripción del gen de *ER* se debe a otro mecanismo (Parl *et al.* 1989; Yaich *et al.* 1992; Lapidus *et al.* 1998). La pérdida de la expresión puede ser explicada por modificaciones epigenéticas tales como la metilación y la acetilación.

Se ha demostrado que las líneas celulares negativas al receptor a estrógenos tienen metilación en las islas CpG del promotor P1, mientras que las líneas positivas tienen el promotor desmetilado (Ottaviano *et al.* 1994; Lapidus *et al.* 1996). Por otro lado, en 92 tumores primarios de mama se analizaron todos los sitios CpG de los promotores del gen de *ER* por la técnica de Southern blot. El 25% de un 40% de los tumores negativos al receptor tenían los sitios analizados metilados mientras que los tumores positivos y los tejidos normales se encontraban completamente desmetilados.

Debido a que por Southern blot solo se pueden analizar sitios CGCG y se conoce que sitios diferentes son susceptibles a metilación, se empezó a utilizar la técnica de MSP, para comprobar la metilación de las islas CpG en las líneas celulares negativas. De esta forma se demostró que tanto en tumores de mama como en líneas celulares negativas al *ER* el promotor 1 si se encontraba metilado al 100%.(Ottaviano *et al.* 1994; Lapidus *et al.* 1996)

La hipermetilación de las islas del *ER* se asocia con la inhibición de la transcripción. El tratamiento de las líneas celulares negativas al *ER* con 5-aza-2'-deoxycytidine (deoxyC) resulta en la desmetilación de los sitios CpG restaurando la expresión (Ferguson *et al.* 1995). Se comprobó que el producto del gen re-expresado fuera funcionalmente activo por su habilidad para activar la transcripción de genes como *pS2*. Estos resultados demuestran que la metilación del gen de *ER* puede jugar un papel importante en la supresión de la expresión del gen y que puede ser una señal reversible. Hasta el momento solo en una línea celular Hs578t, la reactivación de *ER* inhibe el crecimiento e induce apoptosis. Esta muerte celular se puede bloquear con antiestrogenos puros, verificando que la respuesta es específicamente dada por la función del *ER*. Resultados muy parecidos se tienen cuando se transfecta *ER* a células negativas (García *et al.* 1992; Jiang y Jordan. 1992; Zajchowski *et al.* 1993). En contraste, líneas con altos niveles de actividad de DNMT1 fueron más sensibles a la droga y no se pudieron rescatar de la muerte con antiestrogenos, sugiriendo que existe otro mecanismo involucrado en la muerte de las células. De hecho la AzaCdr induce toxicidad en éstas líneas celulares debido a la formación de aductos de DNA. (Jutterman y Jaenisch. 1994, Ferguson *et al.* 1997). En las líneas celulares negativas a *ER*, la expresión de DNMT1 es significativamente mas elevada comparada con las *ER*-positivas sugiriendo que podría existir mayor metilación local del DNA (Nass *et al.* 1999; Ottaviano *et al.* 1994; Ferguson *et al.* 1997). La expresión de DNMT1 esta relacionada altamente con el ciclo celular (Szyf *et al.* 1985; Szyf *et al.* 1991). En las células *ER*-positivas la expresión de DNMT1 correlaciona con la fase S, confirmando que las vías regulatorias que controlan DNMT1 están intactas. En contraste, las células negativas expresan DNMT1 a través de todo el ciclo. Varios estudios sugieren que la activación de las vías de regulación de crecimiento está desregulada en las células negativas al *ER* lo que a su vez regula a la

DNMT1 (Hahnel y Twaddle. 1985).

Las líneas de cáncer de mama son un buen modelo para examinar el papel de la metilación en la supresión de la expresión génica. La línea MDA-MB-231 no expresa *ER* debido a que las islas de éste gen se encuentran hipermetiladas (Ferguson *et al.* 1995; Ferguson *et al.* 1998). El tratamiento de las células con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycitidina promueve la desmetilación parcial de las islas del *ER*.

Se ha demostrado que las proteínas MeCp2 forman complejos con HDAC1 mecanismo que reprime indirectamente la transcripción por medio de la metilación del gen de *ER* (Macaluso M et al 2003). Además, inhibidores de HDAC1 y 2, tales como tricostatina A (TSA), han demostrado reactivar este gen y otros como *MLH1*, *TIMP3*, *p15*, *p16* y *gelsolina*. (Yang X et al 2001)

4.2 METILACION DE p16/p16 INK4A/CDKN2A/MTS .

El gen de p16 está localizado en el cromosoma 9p21. Este gen codifica un inhibidor de ciclinas dependiente de cinasa p16ink4A que regula la transición de G1 a fase S via la fosforilación de Rb (Liggett y Sidransky 1998). La transcripción del gen *p16* INK4A genera dos transcritos distintos que codifican a dos proteínas funcionalmente diferentes p16 INK4A y p19 ARF. Los dos transcritos son idénticos solo en el segundo y tercer exon. (Sharpless y DePinho 1999). La pérdida de expresión de p16 INK4A por una deleción homocigótica, por metilación del promotor o por mutación puntual es muy común en varios tipos de cáncer. La metilación del promotor y del exon 1 del gen de *p16* se ha encontrado en varias líneas celulares de cáncer de mama (Herman *et al.* 1995, Woodcock *et al.* 1999). La metilación está asociada a la pérdida de la expresión del gen y por consiguiente la falta de la proteína. La falta de expresión de este gen no se ha podido correlacionar con pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Solo existen

algunos estudios que en cáncer de vejiga en los que se ha encontrado una relación entre el pronóstico del paciente y la metilación del gen de p16 (Chan MW *et al* 2002; Friedrich MG *et al* 2001). Se ha demostrado en la línea celular T24 de cáncer de vejiga, que no expresa el gen de p16 por metilación, al ser tratada con un inhibidor de la metilación como aza-CdR o al transfectarle el gen de *p16*, éstas células se arrestan en G1 debido a la re-expresión de este gen (Bender CM *et al* 1998).

4.3 METILACION DEL GEN DE RAR β

Los receptores al ácido retinoico *RAR* α , β y γ , así como los receptores *RXR* α , β y γ también forman parte de la superfamilia de receptores nucleares (Minucci y Pelicci 1999). Los seis receptores son factores de transcripción dependientes de ligando (Chambon 1996). El gen de *RAR β* está localizado en el cromosoma 3p24, su importancia radica en el papel que tiene en el control de varios tipos tumorales incluyendo mama, pulmón y otros. La expresión de *RAR β* es débil o nula en líneas de cáncer de mama que son resistentes al ácido retinoico (ATRA) (Swisshelm *et al.* 1994, Jing *et al.* 1996, Widschwendter *et al.* 1997). Se piensa que la metilación del promotor del gen de *RAR β* es uno de los principales causantes de la inhibición de su expresión en cáncer de mama (Widschwendter *et al.* 2000). Se ha demostrado que existe metilación del promotor de *RAR β* con las técnicas de Southern Blot y MSP en varias líneas celulares y en un tercio de los tumores de mama no seleccionados (Sirchia *et al.* 2000). No se ha observado metilación del gen en células normales o tejido normal. Hasta el momento no se ha encontrado correlación entre el estado de *ER* y *RAR β* . Como en otros genes, el gen de *RAR β* se puede reactivar en líneas celulares negativas tales como MCF-7 y MDA-231 de cáncer de mama, cuando son tratadas con 5-aza-dC y más aun

con el inhibidor de HDAC, TSA, haciéndolas susceptibles al ácido retinoico.(Yan L et al 2001)

5.0 LA METILACIÓN COMO UN BLANCO TERAPEUTICO

El conocimiento de anomalías genéticas específicas en tumores ha permitido el desarrollo de terapias con blancos moleculares como ejemplifica la terapia génica dirigida a la restauración de la actividad de genes supresores, bloqueando genes o sus productos con oligonucleótidos antisentido, inhibidores de cinasas y anticuerpos monoclonales entre otros. (Esteller M 2002)

La reversión de la metilación de promotores en genes supresores de tumor es un blanco atractivo como tratamiento contra el cáncer. Evidencia experimental demuestra que la re-expresión con drogas desmetilantes de genes supresores silenciados logra grandes efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*.(Christman JK 2002) Estos conceptos son respaldados por la capacidad transformadora de la expresión de la actividad del gen DNMT1 que puede ser revertida por oligonucleótidos antisentido. Estos descubrimientos preparan el terreno para el uso clínico de agentes desmetilantes en cáncer, sin embargo, ésta terapia potencial tiene propiedades carcinogénicas y mutagénicas, así también, está asociada a la toxicidad que los agentes desmetilantes comunes tienen. Por eso, la necesidad de encontrar agentes desmetilantes menos tóxicos.

Los agentes antihipertensivos y antiarrítmicos hidralazina y procainamida respectivamente, son conocidos como inhibidores de la metilación del DNA que han sido usados para hipometilar células T en sistemas experimentales. Esta hipometilación produce hiper-expresión de LFA-1 que hace a las células T auto-reactivas. Esta

propiedad ha sido demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo* (Cornachia *et al* 1998) Recientemente Kaplan *et al*, han demostrado que la hiper-expresión de LFA-1 es inducida por inhibidores de la DNA metiltransferasa que causan la desmetilación del promotor del gen CD11. (Kaplan *et al* 2001)

5.1 INHIBIDORES DE METILACION

5.1.1 5-Aza-2-deoxicitidina (5azaCdr) y 5-azacitidina (5azaC)

Estos compuestos son análogos de la base nitrogenada citocina y por esta característica han sido usados clínicamente como droga desmetilantes, es decir, capaces de reactivar genes silenciados, relajar la cromatina y alterar la replicación del DNA. En particular los pacientes con B-talasemia que son tratados con 5-azacitidina re-expresan hemoglobina fetal (Ley *et al*, 1995). Además también se demostró que efectivamente el gen se re-expresó aumentando los niveles de hemoglobina fetal en el paciente. Se demostró que esta re-expresión correlacionó con la desmetilación del gen. En un estudio posterior con dihidro-5-azacitidina en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas también se observó incremento en los niveles de hemoglobina fetal (Carr BI *et al*, 1997).

Aunque no administrada con el fin de evaluar el potencial de inducir la expresión de genes supresores, la droga 5-azacitidina se ha usado en estudios fase II para evaluar su efecto antineoplásico en tumores sólidos como cáncer de mama, pulmón etc. En el cáncer de mama, esta droga produce respuestas en el 17% de los casos (Weiss AJ *et al* 1977). En 1986 el grupo de Von Groeningen reportó en pacientes con cáncer de pulmón, entre otros tumores, que 5-azacitidina produce la re-expresión de genes metilados (Von Groeningen *et al* 1986).

La toxicidad y mutagenicidad de 5azaCdr y 5azaC se debe precisamente a su capacidad desmetilante, es decir, debido al parecido estructuralmente que tiene con citocina, es capaz de sustituir durante la replicación a la citocina por medio de un enlace covalente originando que DNA-metiltransferasa no pueda unirse y catalizar la unión del grupo metilo a la citocina original. La DNA-metiltransferasa se queda unida a 5 azaC evitando que se lleve a cabo la metilación.(Herman *et la* 1996)

Si bien la 5-aza-2-deoxicitidina es un agente desmetilante que ha sido probado con excelentes resultados *in vitro* e *in vivo*, tiene la desventaja de ser mutágena y tóxica, lo que lo hace ser un agente poco utilizable en pacientes.(Herman *et la* 1996)

Por esta razón, es importante encontrar agentes hipometilantes menos tóxicos que la 5-aza-2-deoxicitidina.

MECANISMO DE ACCION DE LA 5-AZA-2-DEOXCITIDINA



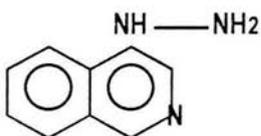
Fig 5. Modelo de lesión mutagénica con 5azaCdr. El modelo indica el mecanismo de inhibición de metilación por la droga y el subsecuente rompimiento químico en la estructura del anillo de la 5-aza-deoxicitidina, la DNMT queda atrapada con un grupo hidroxilo (flecha).

5.2 HIDRALAZINA Y PROCAINAMIDA COMO NUEVOS AGENTES DESMETILANTES

Hidralazina y procainamida son drogas usadas para la hipertensión y arritmia respectivamente. En 1988 y 2000, se reportó que en las células T tratadas con 5-aza-2-deoxicidina, hidralazina y/o procainamida se hacían auto-reactivas. Esta autorreactividad correlaciona con un incremento en la expresión del antígeno LFA-1 debido a la desmetilación de los promotores del gen (Deng *J et al* 2003).

5.2.1 HIDRALAZINA

Hidralazina (1-hidrazinophtalazina) tiene la siguiente estructura:



La hidralazina es un vasodilatador periférico cuyo mecanismo de acción celular responsable de este efecto no se conoce. Sus dos principales indicaciones terapéuticas son para la hipertensión y la insuficiencia cardíaca congestiva crónica. (Goodman A 1996)

Farmacocinética: La hidralazina se absorbe rápida y completamente tras la administración oral. En el plasma sólo se encuentran pequeñas cantidades de sustancia libre y la mayor parte circula en forma conjugada, es decir, principalmente como hidrazona del ácido pirúvico. Tan sólo la llamada hidralazina “aparente”, ésto es, la suma de hidralazina libre y conjugada, puede medirse confiablemente. La concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan después de una hora en la mayoría de los casos.

La hidralazina administrada por vía oral está sometida a un efecto de primer paso, según la dosis (disponibilidad sistémica: 26-55%); este efecto del primer paso depende del tipo de acetilador que sea el paciente. Tras la misma dosis los acetiladores lentos presentan niveles plasmáticos de hidralazina “aparente” más altos que los acetiladores rápidos. El patrón de los metabolitos depende del tipo de acetilador y probablemente de lo hidroxilador que sea el sujeto. Se ha comprobado que el metabolito principal, la N-acetil-hidralazina-ftalazinona (NAc-HPZ) es un indicador relevante del fenotipo relacionado con el fármaco.

La vida media plasmática fluctúa generalmente entre dos y tres horas, pero en los acetiladores rápidos es más corta: media de 45 minutos. La edad avanzada no influye sobre la concentración sanguínea ni el aclaramiento sistémico. Sin embargo, la eliminación renal puede resultar afectada ya que la función renal disminuye con la edad. La hidralazina y sus metabolitos se excretan rápidamente por los riñones. En las 24 horas siguientes a una dosis oral se puede recuperar el 80% aproximadamente de la misma en la orina. La mayor parte de la hidralazina se excreta en forma de metabolitos acetilados o hidroxilados, parte de los cuales están conjugados con ácido glucurónico; el 2-14% se excreta en forma de hidralazina “aparente”.

Mecanismo de inhibición de la metilación.

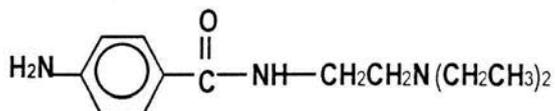
Aunque no se conoce perfectamente como hidralazina inhibe la metilación se sabe que esta droga tiene gran afinidad por las bases pirimídicas pero principalmente por la citosina por lo que se tiene la hipótesis que las DNMTs no pueden catalizar la unión del grupo metilo por que la citosina se encuentra ocupada por la hidralazina no permitiéndose el proceso de metilación. (Cornacchia E *et al* 1988) Por la estructura química de la hidralazina se ha pensado que es capaz de unirse de forma covalente con el DNA; la desventaja ante esta característica sería que ésta droga tendría la capacidad

de generar daño en las cadenas provocando mutaciones. El Dr. Herrera en el Instituto Nacional de Cancerología (comunicación personal) ha demostrado que tanto hidralazina como procainamida no producen daño genotóxico en linfocitos sanos humanos comparado con el control 5 azaCdr; la genotoxicidad se evaluó con la inducción de micronúcleos en los linfocitos tratados con dosis equivalentes a las aplicadas en humanos. (Ramirez T *et al* 2003)

5.2.2 PROCAINAMIDA.

Es un análogo del anestésico local, procaina. Procainamida es uno de los mejores antiarrítmicos, pero su uso prolongado genera efectos adversos. Debido a su rápida eliminación necesita ser tomada ocho veces al día.

La estructura química es la siguiente



Efectos farmacológicos. Procainamida es un bloqueador de canales de sodio con un tiempo intermedio de recuperación. El mayor metabolito de procainamida es N-acetyl-procainamida

La procainamida es indicada en taquicardia ventricular, extrasístoles, contracciones ectópicas, fibrilación auricular, arritmias de la anestesia, y en general arritmias ventriculares que no ceden con lidocaina.

Farmacocinética: sufre metabolismo hepático, con formación del metabolito activo llamado N-acetil procainamida. La vida media de la procainamida es de 4 horas pero su metabolito tiene una vida media mayor.

Reacciones adversas: Trastornos gastrointestinales y alteraciones a nivel de SNC, sin embargo son más frecuentes las reacciones de hipersensibilidad que se presentan en un 20 a 30 % de los pacientes en tratamiento crónico, en los que puede aparecer un síndrome tipo Lupus con artralgias, fiebre, pericarditis, derrame pericárdico, el cual desaparece al suspender el tratamiento, este síndrome es más frecuente en los acetiladores lentos ya que el metabolito activo se produce por acetilación. Un 70 a 80 % de los pacientes que se encuentran en tratamiento crónico con procainamida tienen títulos de anticuerpos antinucleares.

Mecanismo de inhibición de la metilación

Procainamida inhibe la metilación por dos mecanismos: disminuye la actividad de DNMT por unión directa al sitio catalítico y se une a secuencias ricas en CG, se piensa que al unirse a estas secuencias la procainamida impide la unión de la DNMT al DNA (Deng *J et al* 2003).

6.0 HIPOTESIS

Si la Hidralazina y la Procainamida son inhibidores de metilación entonces serán capaces de revertir la metilación de genes tanto *in vitro* como *in vivo*.

7.0 OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la inhibición de la metilación del DNA y la expresión del gen del receptor de estrógenos y otros genes supresores de tumores en líneas celulares de carcinoma mamario tratadas con hidralazina y procainamida.

8.0 MATERIAL Y METODOS.

8.1 Líneas celulares, Biopsias y Reactivos.

La línea celular MDA-231 de carcinoma mamario, negativa al receptor a estrógenos y la línea MCF-7 de carcinoma mamario ductal, es positiva al receptor a estrógenos. Las células T24 son de un carcinoma de vejiga de un hombre de 23 años. Todas las células se obtuvieron del ATCC. Las células se cultivaron en DMEM con 10% de Suero fetal bovino. Las drogas hidralazina, procainamida y 5-Aza-CdR se obtuvieron de SIGMA.

8.2 Tratamiento con 5-Aza-CdR, hidralazina y procainamida.

Las células MDA-231, MCF-7 y T24 fueron mantenidas en una confluencia de 5×10^5 células en cajas petri de 100 mm de diametro. En el segundo día las células se trataron con las drogas a las siguientes concentraciones, para 5-Aza-CdR fue de $0.75 \mu\text{M}$, de acuerdo a lo reportado para la inhibición de la metilación de los genes ER, RAR y p16. En cuanto a las dosis de hidralazina y procainamida se escogieron de acuerdo a la dosis media en sangre de pacientes tratados con estos fármacos con objetivo terapéutico cardiovascular, que corresponden a las dosis de $10 \mu\text{M}$. Las drogas se prepararon en fresco antes de su uso. Se mantuvieron las células con los fármacos disueltos en el medio de cultivo durante 5 días. En el día 6 se despegaron las células con gendarme y PBS, así se obtuvieron proteínas, DNA y RNA. Estas condiciones se aplicaron para las líneas MDA-231 y T24. Para las células MCF-7, el medio que contenía las drogas se cambió en el día 6, posteriormente las células fueron tratadas adicionalmente durante 24 horas con ácido retinoico all-trans a una concentración de 1 mM .

8.3 Análisis de la Metilación

El análisis de la metilación del promotor del gen del *ER* se realizó con PCR después de la digestión del DNA con enzimas sensibles a la metilación conocida como HpaII y la enzima insensible a la metilación MspI como se describe anteriormente (Iwase H *et al*

1999) El DNA se obtuvo con el kit Wizard purification (Promega, Madison, Wisconsin). Para este experimento se utilizó 1 µg de cada muestra la cuál se digirió toda la noche en un volumen de 20 µl con 10 unidades de MspI o de HpaII de acuerdo a las instrucciones de uso (Gibco BRL, Grand Island, New York). 2 µl de la mezcla de la digestión, es decir, el equivalente a 100 ng de DNA fue amplificado previa purificación, en un volumen de 20 µl usando las siguientes secuencias de oligonucleótidos reportadas anteriormente (Octaviano *et al* 1994; Ferguson *et al* 1998) 5'-TCTCCCTCACTCCCACTGC-3' y 5'-GAAATCAAAACAAGCCTACCC-3' que amplifica un producto de 292 pares de bases para el promotor p0 del gen *RE*. El protocolo de amplificación consistió en 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 94 °C por 1 min. la temperatura de alineación fue 60 °C por 1 min y la extensión de 70 °C por 1 min, seguido por una extensión final de 5 min a 72 °C.

La ausencia de bandas de las muestras digeridas con MspI indicó que se llevó a cabo la digestión de la enzima cortando no importando el estado de la metilación, si embargo, si no existía amplificación en las reacciones digeridas con HpaII esto indicaba la desmetilación y si existía amplificación indicaba la metilación del promotor del gen del *ER*.

El estado de metilación de los genes *p16* y *RARβ* genes fue analizado con la técnica de PCR de metilación específica previamente descrita (Herman JG *et al* 1996). La técnica consiste en convertir la citosinas no metiladas a uracilo mediante tres pasos la sulfonación, la deaminación hidrolítica y la desulfonación alcalina. Así las citosinas metiladas se mantienen como citosinas y las desmetiladas son ahora uracilo, de tal manera que los oligonucleótidos son diseñados para que reconozcan uracilos o citosinas, es decir, si el gen se encuentra metilado amplificará para los oligonucleótidos llamados M que reconocen citosinas metiladas, en cambio si se encuentra desmetilado

el gen entonces amplificará para los oligonucleótidos N, los cuales reconocerán uracilos. Brevemente, 1 µg de DNA en un volumen de 100 µl de cada muestra fue desnaturizada con NaOH recientemente preparado a una concentración final de 0.2 M y modificado con Bisulfito de sodio de acuerdo a las instrucciones del kit DNA Modification (Intergen, Purchase, New York). La mezcla para el PCR contenía 2µl of 10X PCR buffer, 0.5 U of Taq Gold polymerase, dNTPs (de cada uno 1.25 mM), 300 ng de oligonucleótidos y el DNA modificado o no modificado a un volumen final de 20 µl. Los productos se observaron en un gel de agarosa al 2% agarose bajo luz UV.

Los oligonucleótidos utilizados para la MSP:

Set	Sentido	Antisentido	Producto	Tm
p16 W	5'-CAGAGGGTGGGGCGGACCGC-3	5'-CGGGCCCGGCCGTGG-3	140	65 °C
p16 M	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTA-3	150	65 °C
p16 U	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3	5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3	158	60 °C
RARβ W	5'-CCGAGAACCGGAGCGATCCG-3	5'-CCGCCCGGCTGGATTGGCC-3	146	60 °C
RARβ M	5'-TCGAGAACCGGAGCGATTTCG-3	5'-GACCAATCCAACCGAAACGA-3	146	58 °C
RARβ U	5'-TTGAGAATGTGAGTGATTGA-3	5'-AACCAATCCAACCAAAACAA-3	146	50 °C

(Herman JM *et al* 1996; Widschwendter M *et al* 2000)

8.4 RT-PCR

El RNA de las células tratadas y no tratadas se obtuvo con TriReagent (Gibco BRL Grand Island, New York) siguiendo las recomendaciones de la compañía. Con un microgramo del RNA total, se hizo DNA complementario usando el kit RT-PCR (Perkin Elmer; Branchburg, New Jersey) siguiendo las instrucciones de fabricación. Para el gen de *ER* los oligonucleótidos utilizados amplifican un producto de 480 pb que abarcan del exon 7 al 8 (Lapidus RG *et al* 1998) 5'-GGAGACATGAGAGCTGCCAAC-3' y 5'-CCAGCAGCATGTCGAAGATC-3' en un volumen total de 20µl. Las condiciones utilizadas fueron 94 °C por 12 min. Seguido por 24 ciclos de 94 °C de 1 min. 55 °C por 30 sec y

72 °C por 40 seg. El gen de *p16* se amplificó como se ha descrito anteriormente (Merlo A *et al* 1995) usando los oligonucleótidos sentido 5'- AGCCTTCGGCTGACTGGCTGG-3' antisentido 5'- CTGCCATCATCATGACCTGG-3'. Para el gen de *RARβ* las condiciones descritas (Sirchia SM *et al* 2000) usando los oligonucleótidos siguientes: sentido 5'- GACTGTATGGATGTTCTGTCAG-3 antisentido 5'- ATTTGTCCTGGCAGACGAAGCA-3'.

8.5 Western blots.

Las células fueron centrifugadas y lavadas con 1X PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40] que contenían inhibidores de proteasa (10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF y 10 µg/ml Pepstatin A). Con 50µg de proteína total se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% , el cuál, se transfirió a una membrana de PVDF y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos monoclonales para *ER*, *p16*, *RARβ* y *Actina* (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California) seguido de la incubación con el anticuerpo secundario IgG-horseradish peroxidase conjugado (Amersham International, Buckinghamshire England) por 30 min. a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron con el kit de luminiscencia ECL (Amersham International, Buckinghamshire England).

8.6 Experimentos *in vivo*.

Para evaluar si tanto la hidralazina y la procainamida eran capaces de desmetilar y re-expresar el gen del *RE* *in vivo*, 16 ratones hembras nu/nu de 8 semanas de nacidas (Harlan Teklad Madison, Wisconsin) fueron inyectadas dorsalmente con 6×10^6 de las células MDA-231. Después de varias semanas, el tumor alcanzó el tamaño de 1 cm de diámetro, se utilizaron por grupo cuatro ratones los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200 µl de solución salina, 300 µg de 5-Aza-CdR, 5 mg/kg de

hidralazina y 20 mg/kg de procainamida diariamente por 7 días. En el día ocho, los ratones fueron sacrificados bajo anestesia y se removieron los tumores para su procesamiento. Los tumores fueron inmediatamente procesados para la extracción de proteínas, RNA y DNA para la evaluación de la metilación del gen receptor a estrógenos y su expresión .

8.7 Duración del efecto reactivante de la expresión génica.

Para evaluar la duración del efecto reactivante de genes con hidralazina se comparó con el efecto de 5-Aza-CdR, en células T24, las células fueron tratadas con las drogas durante 5 días como se describió anteriormente. En el día 6, el medio se cambió y las células sucesivamente se pasaron según iban proliferando en medio libre de drogas. Cada día subsiguiente se obtuvo RNA para analizar por RT-PCR la expresión del gen de *p16* . Como control de la cantidad y de la integridad del RNA se analizó por RT-PCR la expresión del gen *GAPDH* usando los oligonucleótidos y condiciones antes descritos (Gonzalzo *et al* 1999).

8.8 Ensayos de funcionalidad de los productos de los genes re-expresados *ER* y *p16*.

Para evaluar la funcionalidad del producto del gen del *ER* re-expresado, las células MDA-231 fueron tratadas por 5 días con hidralazina y 5-Aza-CdR como se había descrito anteriormente. Al sexto día se cambió el medio de cultivo por RPMI sin rojo fenol que contenía suero fetal bovino inactivado. En éstas condiciones se trataron las células con estradiol 10nM durante 24 horas posteriormente se analizó en el RNA la expresión del gen dependiente del receptor a estrógenos *PS2* previamente descrito (Kwolden *J et al* 1997). Para evaluar el producto del gen *p16* en las células T24 se trataron durante 5 días con 5-Aza-CdR e hidralazina. Posterior a este tiempo se les cambió el medio libre de drogas (confluencia alrededor de 80%) hasta las 24 horas al que se despegaron y se fijaron en etanol al 75%, se tiñeron con yoduro de propidio y se

analizaron por citometría de flujo para determinar el ciclo celular.

8.9 Actividad desmetilante de hidralazina en un paciente con cáncer de cérvix.

Para evaluar que hidralazina fuera capaz de desmetilar y reactivar la expresión de genes supresores de tumor silenciados en el contexto clínico; una paciente quien había progresado a tratamientos como quimioterapia, cirugía y radioterapia, fue tratada con hidralazina previo consentimiento informado. La hidralazina fue administrada por 10 días por vía oral (50 mg cada 8 horas.). Dos días antes del tratamiento se tomó una biopsia del tumor de la cuál se extrajo DNA y RNA para confirmar el estado de metilación y de expresión del gen *RARβ*. En el día 11 se tomó otra biopsia del mismo sitio para analizar el estado de metilación nuevamente.

9.0 RESULTADOS

Estudios previos han revelado que los genes de *ER*, *p16* y *RARβ* están metilados en las líneas celulares MDA-231, T24 y MCF-7 respectivamente, y que 5-Aza-Cdr es capaz de desmetilar estos genes. Para determinar que otros agentes son capaces de desmetilar estos genes supresores, las líneas fueron tratadas con hidralazina y procainamida con las dosis indicadas por 5 días. Se usó 5-Aza-Cdr como control positivo de desmetilación.

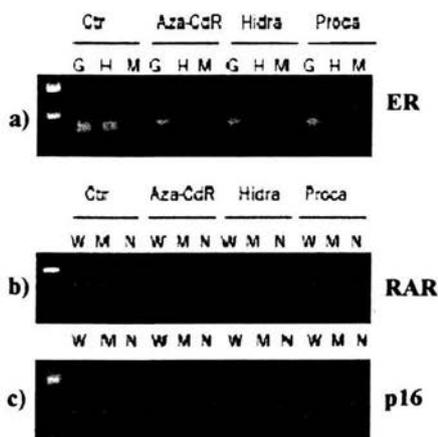


Figura 6. Análisis de la metilación de los genes *ER*, *RARβ* y *p16*. a, G es DNA genómico sin digerir como control positivo, H es Hpa II, M es Msp I. La banda en la línea 2 indica la falta de digestión con Hpa II y la metilación en las células MDA-231 sin tratar. Figuras 6b y 6c muestran el análisis de RAR y p16 en las células MCF-7 y T24. W son oligonucleótidos que amplifican el DNA metilado o desmetilado, M es metilado y N es no metilado.

Como se esperaba, la PCR en las células MDA-231 no tratadas no se amplifica nada en la muestra digerida con MspI pero si se amplifica si con Hpa II indicando que esta metilada. Por el contrario, en las células tratadas no se amplifica con HpaII ya que se encuentran desmetiladas (Fig. 6a). Para investigar, si la capacidad desmetilante de hidralazina y procainamida no era específica para una línea y un gen, T24 y MCF-7 también fueron tratadas. La PCR de metilación específica usando DNA modificado con bisulfito para los genes *p16* y *RARβ*, demostró la metilación en las células no tratadas y la desmetilación en las tratadas (Fig 6b y 6c)

Así estos resultados demuestran que hidralazina y procainamida son capaces de demetilar estos genes supresores. Para correlacionar que la desmetilación del DNA con la expresión de los genes *ER*, *p16* y *RARβ*, se evaluaron los niveles del RNAm y de proteína. La transcripción y traducción de los genes de interés fue negativa en las líneas celulares sin tratamiento pero después de 5 días con los fármacos, las células expresaron el transcrito y la proteína (Fig. 7).

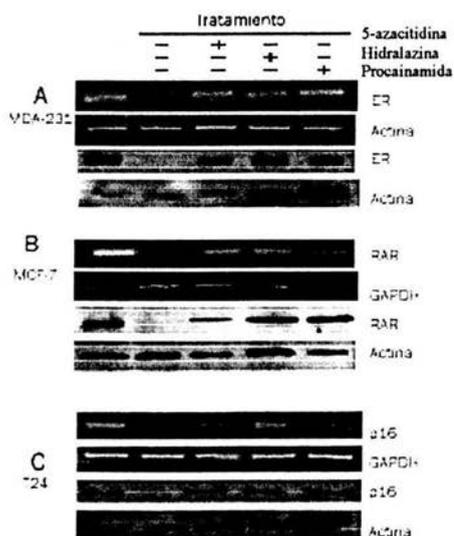


Figura 7. Detección de RNAm y proteínas en: A, *ER* (MDA 231), B, *RARβ* (MCF-7) y C, *p16* (T24) por RT-PCR y Western blot. El control positivo (+ ctr) en *a* es MCF-7, para *b* es MDA-231 expuesto a 5-azacitridina/act-AR y para *c* son células Hela.

Para explorar la habilidad de la hidralazina y procainamida para inducir la desmetilación *in vivo*, ratones *nu/nu* fueron inyectados con células MDA-231 para generar tumores, subsecuentemente se trataron durante 7 días por vía intraperitoneal con hidralazina y procainamida. El análisis de la expresión del gen de *ER* a nivel proteína y RNA, a si como el estado de metilación del gen demostró que las dosis usadas de ambas drogas son capaces de desmetilar y expresar el gen de *RE*, (Fig 8).

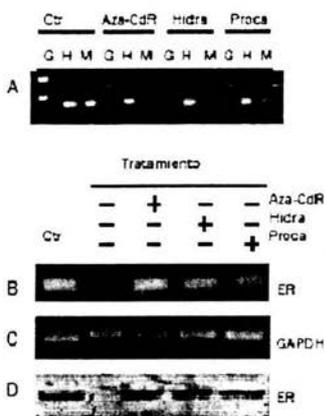


Figura 8. Análisis de metilación y expresión del producto del gen de *ER* en ratones desnudos.

Fig. A muestra que el tumor del ratón control fue metilado como se muestra en la banda del carril 2 indicando la falta de digestión con *Hpa* II. La banda desaparece con el tratamiento de 5-aza-CdR e hidralazina lo cual indica la desmetilación del gen. Carril 11 corresponde a los ratones tratados con procainamida. La banda es ausente en *Msp* I pero es muy débil en *Hpa* II indicando que fue solo una desmetilación parcial. G es DNA genómico sin digerir. B y D

son productos de la expresión por RT-PCR y Western blot. En ambos casos la intensidad de las bandas en procainamida son débiles, correlacionando con la desmetilación parcial.

Estos resultados demuestran que hidralazina tiene la misma capacidad que 5-Aza-Cdr para desmetilar y re-expresar genes supresores *in vitro* e *in vivo*. Para comparar el efecto de re-expresión a lo largo del tiempo, la línea T24 fue tratada tanto con hidralazina como con 5-Aza-Cdr. Los resultados demuestran que bajo condiciones idénticas de tratamiento y de dosis probadas, hidralazina mantiene mas tiempo el efecto de reactivación del gen de p16 (Fig. 9).

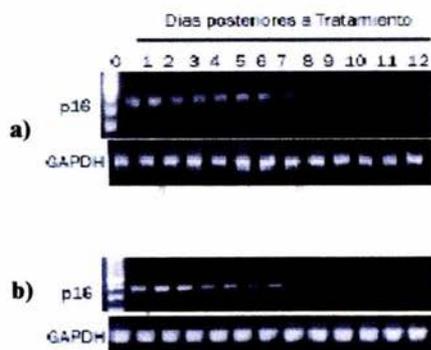


Figura 9. Expresión de ARNm de *p16* en células tratadas con a, 5-Aza-Cdr y b: hidralazina. Día 0 es el quinto día de tratamiento con la droga. Una delgada banda se mantiene el día 11 con hidralazina y al día 8 con azacitidina.

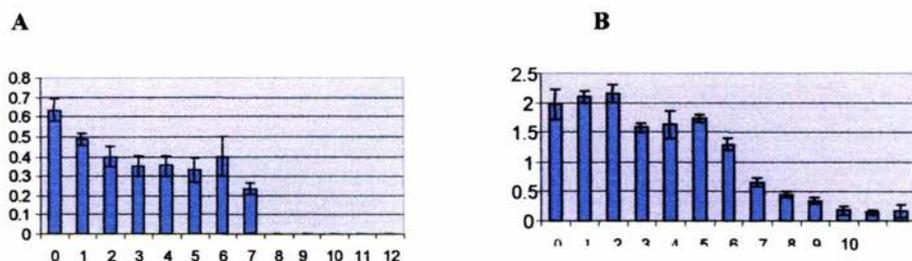


Figura 10. Expresión de ARNm de *p16* con relación al ARNm de GAPDH de células tratadas con A, 5-Aza-Cdr y B hidralazina. Día 0 es el quinto día de tratamiento con la droga. Por densitometría se cuantifican bandas hasta el día 12 en hidralazina y al día 8 con azacitidina.

Ha sido previamente probado que los genes reactivados por 5-Aza-Cdr son funcionales. Debido a la importancia del potencial terapéutico de los agentes desmetilantes, demostramos que los genes reactivados con hidralazina también son funcionales. Como se predecía, en la línea celular MDA-231, el producto de *ER* induce la transcripción del gen de *PS2* bajo la estimulación de estradiol por 24 horas (Fig. 11a). Asimismo, en la línea de cáncer de vejiga, la reactivación del gen de *p16* fue capaz de inducir arresto en G1 indicando que el producto del gen es funcional. (Fig. 11b).

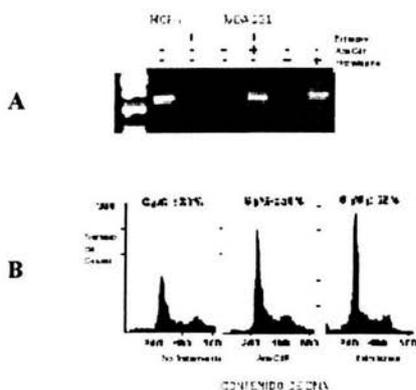


Figura 11. Funcionalidad de los genes expresados. A RT-PCR para el gen *PS2*. Muestra que el estradiol induce el gen *PS2* en las células previamente expuestas tanto a 5-Aza-CdR o hidralazina y b, perfil del ciclo celular de las células T24 expuestas a las drogas. 5-Aza-CdR e hidralazina donde son igualmente efectivas induciendo el arresto en G0/G1.

Ya ha sido demostrado que la 5-azacitidina reactiva la expresión de genes inactivados por metilación en pacientes con beta talasemia (Ley J et al 1982), así, nosotros tratamos un paciente con cáncer de cérvix con hidralazina por 10 días, para confirmar si nuestros resultados son clínicamente viables. Como se esperaba la hidralazina desmetila e induce la expresión del gen de *RARβ* en el tumor (Fig. 12)



Figura 12. Efecto de la hidralazina en una paciente con carcinoma de cérvix. *a*, muestra que *RARβ* esta metilado pre-tratamiento pero desmetilado después del tratamiento con hidralazina. *b*, esta desmetilación correlaciona con la expresión indicada con la banda en el post-tratamiento.

10.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La investigación de nuevos agentes desmetilantes con valor terapéutico que sean capaces de desmetilar y reexpresar genes supresores en pacientes con cáncer ha sido obstaculizada por la falta de disponibilidad de drogas que puedan sustituir las ya existentes con uso clínico. En este trabajo nosotros demostramos que dos agentes “no tóxicos” de uso común en la clínica para condiciones no malignas son capaces no sólo de desmetilar sino de reexpresar *in vitro* e *in vivo*, los productos de los genes supresores de tumor demetilados en las líneas celulares son funcionales. Además, demostramos que el efecto de hidralazina es factible desde el punto de vista clínico, ya que el tratamiento con hidralazina en una paciente con cáncer desmetiló y reexpresó el gen de *RARβ*. En este trabajo usamos la línea celular de cáncer de mama MDA-231 la cual carece de la expresión del gen de *ER* debida a la hipermetilación de su promotor (Ottaviano. 1994; Lapidus. 1996). Por otro lado, ha sido demostrado que 5-aza-CdR induce la expresión de una proteína *ER* funcional. Nuestros resultados demuestran que las células MDA-231 no tratadas tienen metilado y silenciado el gen de *ER* y que después de cinco días de exposición a la procainamida e hidralazina éste patrón epigenético fue modificado.

La PCR de metilación específica es considerada el método más confiable para determinar el estado de metilación de los promotores de los genes. La metilación del gen de *ER* ha sido ya analizado con ésta técnica (Lapidus RG *et al* 1998), sin embargo, nosotros no pudimos reproducir satisfactoriamente esos resultados, por lo cual decidimos analizar la metilación del gen de *ER* con la amplificación por PCR después de la digestión con enzimas sensibles a la metilación. Esta técnica tiene algunas limitaciones que dependen en su mayoría de una digestión enzimática eficaz, sin embargo, nuestros datos claramente demuestran que no existen bandas en el DNA de células no tratadas después de la digestión con HpaII.

Por otro lado, los resultados son validados por resultados idénticos obtenidos con 5-aza-CdR que en la mayoría de nuestros experimentos usamos como control positivo.

Hemos descartado que el efecto de la hidralazina y procainamida pudiera ser específico para una línea celular o gen, nosotros presentamos experimentos adicionales para el gen de *p16* en la línea de cáncer de vejiga T24. Este gen regulador del ciclo celular ha sido ampliamente estudiado por el estado de metilación de su promotor en cáncer. Resultados previos en éstas células han demostrado 5-aza-CdR revierte la metilación e induce la re-expresión *in vitro* e *in vivo* del gen de *p16* (Bender CM *et al* 1998). Nuestros resultados indican que procainamida e hidralazina producen los mismos resultados obtenidos en la línea celular de cáncer de mama y proporcionan evidencia que la reactivación del gen esta a la par de la desmetilación demostrada por la PCR de metilación específica.

Interesantemente, nuestros resultados demuestran que los productos de éstos genes expresados son funcionales como se muestra con la inducción del gen dependiente de estrógenos *PS2* después del tratamiento con estradiol y por el incremento en la población de células T24 en la fase G1 del ciclo celular. Estos descubrimientos soportan

el uso potencial de hidralazina para reactivar genes supresores de tumor en cáncer. Nosotros también estudiamos los efectos de éstas dos drogas en el gen *RARβ* en la línea MCF-7. Este gen se ha encontrado silenciado por metilación en varias líneas celulares así como también en tumores, tales como en el carcinoma de pulmón en donde se usa como factor pronóstico (Virmani AK *et al* 2000). Es conocido que la expresión del gen *RARβ* es sobre regulado por ácido retinoico (Geisen C *et al* 1997) y que en el carcinoma de mama la exposición continua a 5-aza-CdR y al ácido retinoico induce la re-expresión del gen de *RARβ* (Widschwendter M *et al* 2001). Nuestros resultados muestran que después de la exposición inicial a las drogas probadas, el ácido retinoico induce la expresión del receptor solo en las células tratadas las cuales correlacionan con la desmetilación del promotor. Un importante descubrimiento de éste estudio fue que la administración sistémica de hidralazina y procainamida en animales, a dosis equivalentes a las dosis usadas en humanos como antihipertensivo y antiarrítmico respectivamente (Cornachia E *et al* 1988; Richardson B *et al* 1988) fueron capaces de desmetilar y reexpresar el gen de ER.

Estudios previos han demostrado que 5-aza-CdR inhibe la metilación por su incorporación a la cadena de DNA que en turno bloquea la unión de DNMT1 al DNA y que su efecto es mantenido por al menos 9 pasajes en las células recuperando gradualmente su estado de metilación a niveles originales (Ferguson AT *et al* 1997). Debido a que hidralazina y procainamida tienen distintos mecanismos de desmetilación, que es por inhibición directa de la actividad enzimática de DNMT1 (Yung R *et al* 1997; Kaplan MJ *et al* 2000) nosotros analizamos el efecto de recuperación de la expresión del gen de p16 en la línea T24. Sorpresivamente hidralazina fue más efectiva que 5-aza-CdR para mantener el gen reexpresado.

Ciertas evidencias sugieren que para mantener los genes desmetilados, las células puedan necesitar de la exposición continua a las drogas desmetilantes, lo cual desde cierto punto de vista, podría favorecer el uso de hidralazina a comparación de 5-aza-CdR, como droga antihipertensiva se puede dar diariamente por largos períodos de tiempo al contrario del clásico tratamiento de 21 días de 5-aza-CdR.

Algo importante es determinar si la reexpresión de los genes supresores de tumor pueden inhibir el crecimiento tumoral por sí sola. Varios datos demuestran que para la 5-aza-CdR la actividad antitumoral puede depender no solo de su actividad desmetilante sino también de sus acciones citotóxicas intrínsecas (Mompaler RL 1977). Sin embargo, procainamida e hidralazina han sido ya probadas como agentes antitumorales. Hidralazina produce toxicidad por su habilidad para producir acidificación y también por la inducción de hipoxia selectiva (Horsman MR *et al* 1995; Yamagata M 1996). Procainamida y su análogo 3-cloroprocainamida incrementan la eficacia de cisplatino en algunos modelos tumorales (Hua J *et al* 1996; Esposito M *et al* 1996), además de su capacidad de inhibir la DNA metiltransferasa, procainamida cambia el ambiente inmunológico incrementando la eficacia antitumoral cuando se combina con interferón en carcinoma renal. (Onishi T *et al* 1998).

Estudios recientes han demostrado que en el carcinoma de cerviz, uno de los factores para el desarrollo y progresión de éste tumor es la hipermetilación de varios genes (Arvind K *et al* 2001; Dong SM *et al* 2001). Entre esos genes se encuentra *RAR β* , este gen se encuentra metilado en el 50% de las líneas de cáncer de cervix y en el 26% de los tumores (Arvind K *et al* 2001). Aquí, demostramos que hidralazina con dosis de 150 mg diarios, los cuales están por debajo de la dosis común usada como antihipertensivo revierte la metilación y reexpresa *RAR β* .

Las implicaciones de éste estudio son importantes por que estas drogas pueden tomar un

papel en la terapia contra el cáncer, remarcando la casi nula toxicidad así como la disponibilidad para su uso oral y bajo costo. En éste momento, se tienen conocimiento de dos estudios fase I-II probando la capacidad desmetilante de 5-aza-CdR en pacientes con enfermedad avanzada así como también las pruebas preclínicas de moléculas antisentido que tienen como blanco al gen de DNMT1.

Las características ya descritas de la hidralazina y la procainamida las hacen posibles candidatos para estudios clínicos con pacientes con cáncer. Aunque, tanto hidralazina como procainamida son capaces de desmetilar y reactivar genes supresores decidimos estudiar mejor a la hidralazina ya que el uso clínico de un agente antiarrítmico puede presentar mayores complicaciones para el paciente que el uso de un antihipertensivo en “condiciones no-cardiovasculares”, así hidralazina parece ser el candidato más apropiado para continuar este estudio.

En conclusión, nosotros tenemos evidencia de que éstas dos drogas “cardiovasculares” reactivan genes supresores de tumor silenciados por metilación y por lo tanto, pueden ser empleadas como una terapia potencial para anormalidades epigenéticas encontradas en cáncer. Cabe mencionar algunas sus potenciales aplicaciones; en el caso de cáncer de mama, la reexpresión de el *ER* puede hacer que pacientes con tumores negativos a *ER* puedan ser susceptibles a manejo endocrino, y en la misma forma favorecer el tratamiento con ácido retinoico de diversos carcinomas, incrementando la expresión de *RAR β* al modificar el patrón de metilación del DNA.

11.0 REFERENCIAS

- Allegra, J. C et al (1979) Cancer Treat. Rep., 63, 1271-1277*
- Araujo, F. D.; Knob, J. D.; Szyf, M.; Price, G. B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1998) Mol. Cell. Biol., 18,3475-3482.*
- Barret-Lee PJ, Travers MT, McClelland RA, et al.(1987) Characterization of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer. Cancer Res; 47: 6653-6659.*
- Barrett-Lee, P. J.; Travers, M. T.; McClelland, R. A.; Luqmani, Y. and Coombes, R. C. (1987) Cancer Res., 47, 6653-6659.*
- Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. (1998) Cancer Res 58: 95-101.*
- Borellini, F. and Oka, T. (1989) Environ. Health Perspect., 80, 85-99.*
- Carr BI, Rahbar S, Doroshow JH, Blayney D, Goldberg D, Leong L, Sdmrton Y. Fetal hemoglobin gene activation in a phase II study of 5,6-dihydro-5-azacytidine for bronchogenic carcinoma.(1997) Cancer Res 47: 4199-4201.*
- Christman JK .(2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapyOncogene 21, 5483 - 5495*
- Chuang, L. S. H.; Ian, H.-I.; Koh, T.-W.; Ng, H.-H.; Xu, G. and Li, B. F. L. (1997) Science, 277, 1996-2000.*
- Cooper, D. N. and Krawczak, M. (1990) Hum. Genet., 85, 55-74.*
- Counts, J. L. and Goodman, J. I. (1995) Cell, 83, 13-15.*
- Deng C, Lu Q, Zhang Z, Rao T, Attwood J, Yung R, Richardson B (2003). Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. Arthritis Rheum. Mar;48(3):746-56.*
- Yung R, Chang S, Hemati N, Johnson K, Richardson B (1997) Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. Arthritis Rheum. Aug;40(8):1436-43*
- Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, Richardson B. (1988) Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. J Immunol. Apr 1;140(7):2197-200.*
- Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. (2001) Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine.*

Mol Pharmacol. Apr;59(4):751-7.

Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. (1997) Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 29;94(9):4681-5.*

Fraga MF, Esteller M. (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques.;33(3):632, 634, 636-49.*

Esteller M. (2002) The coming of age of DNA methylation in medicine in the genomics and postgenomics era. *Clin Immunol.103(3 Pt 1):213-6.*

Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, Subramanyan S, Orlandi R, Sukumar S, Sacchi N. (2000) Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene.16;19(12):1556-63*

Esteller M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future *Oncogene 21, 5427 - 5440*

Ferguson AT, Vertino PM, Spitzner JR, Baylin SB, Muller MT, Davidson NE. (1997) Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase. DNA adduct formation in 5-aza-2' deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem, 272: 32260-32366.*

Ferguson T, Lapidus RG, Baylin SB, Davidoson NE. (1995) Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res; 55: 2279-2283.*

Ferguson, A. T.; Lapidus, R. G.; and Davidson, N. E. (1998) *Oncogene, 17, 577-583.*

Ferguson, A. T.; Lapidus, R. G.; Baylin, S. B.; and Davidson, N. E. (1995) *Cancer Res.; 55, 2279-2283.*

Ferguson, A. T.; Vertino, P. M.; Spitzner, J. R.; Baylin, S. B.; Muller, M. T.; and Davidson, N. E. (1997) *J. Biol. Chem.; 272, 32260-32266.*

Garcia M, Derocq D, Freiss G, Rochefort H. Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA 89: 11538-11542,*

Garcia, M.; Derocq, D.; Freiss, G. and Rochefort, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11538-11542.*

Hahnel, R. and Twaddle, E. (1985) *Breast Cancer Res. Treat.; 5, 155-163.*

Herman, J. G.; Graff, J. R.; Myohanen, S.; Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996) *Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 93, 9821-9826.*

Herman, J. G.; Latif, F.; Weng, Y.; Lerman, M. I.; Zbar, B.; Liu, S.; Samid, D.; Duan, D. S. R.; Gnarr, J. R.; Marston Linehan, W. and Baylin, S. B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 9700-9704.

Herman, J. G.; Merlo, A.; Mao, L.; Lapidus, R. G.; Issa, J. P.; Davidson, N. E.; Sidransky, D. and Baylin, S. B. (1995) *Cancer Res.*, 55, 4525-4530.

Herman, J. G.; Umar, A.; Polyak, K.; Graff, J. R.; Ahuja, N.; Issa, J. P.; Markowitz, S.; Wilson, J. K.; Hamilton, S. R.; Kinzler, K. W.; Kane, M. F.; Kolodner, R. D.; Vogelstein, B.; Kunkel, T. A. and Baylin, S. B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6870-6875.

Hiltunen, M. O.; Alhonen, L.; Koistinaho, J.; Myohanen, S.; Paakkonen, M.; Marin, S.; Kosma, V. M. and Janne, J. (1997) *Int. J. Cancer*, 70, 644-648.

Hull, D. F.; Clark, G. M. and Osborne, C. K.; et al. (1983) *Cancer Res.*, 43, 413-416.

Issa JPJ, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature Genet*; 7: 536-540.

Issa, J. P.; Ottaviano, Y. L.; Celano, P.; Hamilton, S. R.; Davidson, N. E. and Baylin, S. B. (1994) *Nat. Genet.*, 536-540.

Issa, J. P.; Vertino, P. M.; Wu, J.; Sazaawal, S.; Celano, P.; Nelkin, B. D.; Hamilton, S. R. and Baylin, S. B. (1993) *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 1235-1240.

Jiang S-Y, Jordan VC. (1992) Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with a complementary DNAs for estrogen receptor.. *J Natl Cancer Inst* 84: 580-591.

Jiang, S.-Y. and Jordan, V. C. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 580-591.

Jutterman, R.; Li, E.; and Jaenisch, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11791-11801.

Karpf AR Jones DA (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer *Oncogene* 21, 5496 - 5503

Karpf, AR Jones DA (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer *Oncogene* 21, 5496 - 5503

Knight III, W. A.; Livingston, R. B.; Gregory, E. J. and McGuire, W. L. (1977) *Cancer Res.*, 37, 4669-4671.

- Korach, K. S. (1994) *Science*, 266, 1524-1527 Henderson B, Ross R, Ludd J. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? (1985) *Cancer*; 56: 1206-1208
- Kuukasjarvi, T.; Kononen, J.; Helin, K.; Holli, K. and Isola, J. (1996) *J. Clin. Oncol.*, 14, 2584-2589.
- Laird, P. W. and Jaenisch, R. (1994) *Hum. Molec. Genet.*, 3, 1487-1495.
- Laird, P. W.; Jackson-Grusby, L.; Fazeli, A.; Dickinson, S. L.; Edward Jung, W.; Li, E.; Weinberg, R. A. and Jaenisch, R. (1995) *Cell*, 81, 197-205.
- Lapidus, R. G.; Ferguson, A. T.; Ottaviano, Y. L.; Parl, F. F.; Smith, H. S.; Weitzman, S. A.; Baylin, S. B.; Issa, J. P.; and Davidson, N. E. (1996) *Clin. Cancer Res.*; 2, 805-810.
- Lapidus, R. G.; Nass, S. J.; and Davidson, N. E. (1998) *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3, 85-94.
- Lapidus, R. G.; Nass, S. J.; Butash, K. A.; Parl, F. F.; Weitzman, S. A.; Graff, J. G.; Herman, J. G.; and Davidson, N. E. (1998) *Cancer Res.*; 58, 2515-2519.
- Ley TJ, Desimone J, Anagnou NP, Keller GH, Humphries RK, Turner PH, Young NS, Heller P, Nienhuis AW. (1998) 5-azacytidine selectively increases g-globin synthesis in a patient with B+ Thalassemia. *New Engl J Med* 307: 1469-1475.
- Macaluso M, Cinti C, Russo G, Russo A, Giordano A. (2003) pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene*. 5;22(23):3511-7.
- Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. (2001) Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res. Oct 1;61(19):7025-9.*
- Yan L, Yang X, Davidson NE. (2001) Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.;6(2):183-92.
- McGuire, L. (1978) *Semin. Oncol.*, 5, 428-433
- Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med*;1: 686-692.

- Miyoshi, E.; Jain, S. K.; Sugiyama, T.; Fujii, J.; Hayashi, N.; Fuamoto, H.; Kamada, T. and Taniguchi, N. (1993) *Carcinogenesis*, 14(603-605).
- Müller-Tidow C, K Kügler, S Diederichs, S Klumpen, M Möller, U Vogt, R Metzger, P M Schneider, W E Berdel, H (2001) *Loss of expression of HDAC-recruiting methyl-CpG-binding domain proteins in human cancer*
British Journal of Cancer 85, 1168 - 1174
- Nass, S. J.; Ferguson, A. T.; El-Ashry, D.; Nelson, W. and Davidson, N. E. (1999) *Oncogene*, 18, 7453-7461..
- Ohtani-Fujita, N.; Fujita, T.; Aoike, A.; Osifchin, N. E.; Robbins, P. D. and Sakai, T. (1993) *Oncogene*, 8, 1063-1067.
- Ottaviano YL, Issa JP, Pari FF, et al. (1994) *Methylation of the estrogen receptor gene CpG islands marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells.*
Cancer Res; 54: 2552-2555.
- Ottaviano, Y. L.; Issa, J. P.; Parl, F. F.; Smith, H. S.; Baylin, S. B. and Davidson, N. E. (1994) *Cancer Res.*, 54, 2552-2555.
- Ottaviano, Y. L.; Issa, J. P.; Parl, F. F.; Smith, H. S.; Baylin, S. B.; and Davidson, N. E. (1994) *Cancer Res.*; 54, 2552-2555
- Parl, F. F.; Cavener, D. R.; and Dupont, W. D. (1989) *Breast Cancer Res. Treat.*; 14, 57-64.
- Rami;rez T, Garci;a-Montalvo V, Wise C, Cea-Olivares R, Poirier LA, Herrera LA (2003) *S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells.*
Mutat Res. Jul 25;528(1-2):61-74.
- Rhee I, Kam-Wing Jair, Ray-Whay Chiu Yen, Christoph Lengauer, James G. Herman, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, Stephen B. Baylin, Kornel E. Schuebel (2000) *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.* *Nature* 404, 1003 - 1007
- Robertson KD (2001) *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*
Oncogene 20, 3139 - 3155.
- Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA (2000) *Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells.* *Nucleic Acids Res.* 15;28(10):2108-13
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. (1999) *The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.* *Nucleic Acids Res Jun 1;27(11):2291-8.*
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP,

- Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* Apr 4;416(6880):552-6.
- Rountree MR, Kurtis E Bachman, James G Herman, Stephen B Baylin. (2001) DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer *Oncogene* 20, 3156 - 3165
- Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G. (1991) Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem*; 266: 10027-10030.
- Szyf M, Rouleau J, Theberge J, Bozovic V. (1992) Induction of miogenic differentiation by an expression vector encoding the DNA methyltransferase cDNA coding sequence in the antisense orientation. *J Biol Chem*; 267: 12831-12836.
- Szyf, M.; Bozovic, V. and Tanigawa, G. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 10027-10030.
- Szyf, M.; Kaplan, F.; Mann, V.; Giloh, H.; Kear, E. and Razin, A. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 8653-8656.
- Toyota, M.; Ahuja, N.; Ohe-Toyota, M.; Herman, J. G.; Baylin, S. B. and Issa, J. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8681-8686.
- Vertino, P. M.; Yen, R. C.; Gao, J. and Baylin, S. B. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 4555-4565.
- Wade PA (2001) Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 20, 3166 - 3173
- Weiss EH, Devlin JJ, Mellor AL, et al. (1986) Lack of class I H-2 antigens in cells transformed by radiation leukemia virus is associated with methylation and rearrangement of H-2 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83:4504-4508.
- Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller HM, Amberger A, Zeschnick M, Widschwendter A, Abendstein B, Zeimet AG, Daxenbichler G, Marth C. (2000) Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92(10):826-32.
- Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. (2001) Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 7(7):1982-6.
- Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA. (1999) Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol Cell Biol.* 19(10):6690-8.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9821-6.

Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE, Nelkin BD, Baylin SB. (1993) Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NHI3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 8891-8895.

Wu, J.; Issa, J. P.; Herman, J.; Bassett, D. E.; Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8891-8895.

Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. (1992) Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res*; 52: 77-83.

Yaich, L.; Dupone, W. D.; Cavener, D. R.; and Parl, F. F. (1992) *Cancer Res.*; 52, 77-83.

Yandell, D. W.; Campbell, T. A.; Dayton, S. H.; Peterson, R.; Walton, D.; Little, J. B.; McConkie-Rosell, A.; Buckley, E. G. and Dryja, T. P. (1989) *N. Engl. J. Med.*, 321, 1689-1695.

Yang, Y.; Spitzer, E.; Kenney, N.; Zschiesche, W.; Li, M.; Kromminga, A.; Muller, T.; Spener, F.; Lezius, A. and Veerkamp, J. H. et al. (1994) *J. Cell Biol.*, 127, 1097-1109.

Zajchowski DA, Sager R, Webster L. Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor-negative but not estrogen receptor-positive human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor. (1993) *Cancer Res* 53: 5004-5011.

Zajchowski, D. A.; Sage, r. R. and Webster, L. (1993) *Cancer Res.*, 53, 5004-5011.