

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**“EVALUACIÓN DEL COMPUESTO LQM502 COMO
DESMETILANTE DEL ADN Y REACTIVADOR DE
LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES DE
TUMORES EN CÁNCER”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

MBIOL. MARIA FERNANDA CAMARGO GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue elaborada gracias al apoyo otorgado por parte del programa de posgrados de la facultad de Ciencias Biológicas junto con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

También le agradezco el apoyo económico otorgado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Esta tesis igualmente fue apoyada por la beca otorgada por parte de la Cátedra del Instituto Pfizer Programa Universitario Investigación en salud en el área de cáncer.

Al comité tutorial por sus sugerencias y enseñanzas durante este trayecto. A los miembros del jurado del examen de grado por sus consejos y críticas. Al Dr. Alfonso Dueñas por su confianza y apoyo tanto a nivel educativo como personal.

AGRADECIMIENTOS

A cada una de las personas que confiaron en mí a la hora de emprender mi viaje, por su inmenso y desinteresado cariño sin fecha de caducidad. A mi familia que desde lejos se manifestaban entre mis intervalos de rendición, imágenes de mis padres junto a mis hermanos que me toman de la mano para seguir caminando, es mi quimera, ilusión manifiesta en mis sueños de vuelo.

A mis compañeros de laboratorio, Alma, Erick, Enrique, Caty, Lucy, Dra. Vidal, Olga, Liz, Daymi, Lupita, Darío, Edgar, Boris que me ayudaron en el desarrollo de mis experimentos y me formaron con sus críticas, también les agradezco porque fueron mi familia durante estos años.

A mis amigos Derly, Charry, Sandra, Nan, Vivi G, Hurtiz, Marthel que estando algunos lejos y otros más cerca me acompañaron con desvelos, con mis crisis de neurosis, y de ciencia desbocada. A los que deje y me dejaron en el camino por perseguir este sueño.

A JA por sus enseñanzas: dejar, amar, soñar, llorar, volar, por la noche que dejaste de actuar para darme amor. Por las noches boca arriba donde parecía ser un sueño nuestra realidad y la realidad era nuestra utopía prefabricada entre vidas pasadas. Por la vida a la vida.

“Las disciplinas como la ciencia o como la filosofía están en los umbrales de la explicación de la realidad, pero no han explicado toda la realidad, a medida que se avanza en el campo filosófico o en el científico, los misterios se van multiplicando, en nuestra vida interior es exactamente lo mismo”

El sentimiento de lo fantástico.

Julio Cortázar

Abreviaturas

5-aza-CdR: 5-aza-deoxicitidina

5-aza-CR: 5-azacitidina

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin difosfato

ARN: Ácido ribonucleico

C: Citosina

CpG: Isla CpG es una región con al menos 200 pb y con un porcentaje de GC mayor de 50

DNMTs: ADN metiltransferasas

dNTPs: Desoxinucleótidos Trifosfato

EC: Electroforesis capilar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

G: Guanina

GRIM19: Genes Associated with Retinoid IFN induced Mortality

HAT: Histona acetil transferasas

HDAC: histona deacetilasa

IFN/RA: Interferón / Ácido Retinoico

Kb: Kilobase

kDa: Kilodaltons

MBD: Methyl binding proteins

MeCPs: Methyl-CpG-binding protein 2

pb: Pares de bases

PBS: Amortiguador de fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RIPA: Amortiguador de radio-inmunoprecipitación

RT-PCR: Reacción en cadena reversa de la polimerasa de la transcripción

SAM: S-Adenosyl-L-methionine

STAT3: Signal transducer and activator of transcription-3

T: Timina

U: Uracilo

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

INDICE

1.0	Resumen.....	6-7
2.0	Epigenética y Cáncer.....	8
3.0	Metilación del ADN.....	9-10
4.0	Histonas y modificaciones postranscripcionales.....	11
5.0	Inhibidores de metilación	
5.1	Análogos de nucleósidos.....	12
5.2	No nucleósidos.....	12
6.0	Hidralazina como inhibidor de metilación.....	13
6.1	Mecanismos de acción de hidralazina.....	13-14
7.0	Inhibidores de HDACs.....	14-15
8.0	Terapia combinada de inhibidores de metilación y de HDACs.....	15-16
9.0	GRIM 19 como modelo de estudio.....	16-17
10.0	Justificación.....	17-18
11.0	Hipótesis.....	18
12.0	Objetivos.....	18
12.1	General	18
12.2	Específicos.....	18
13.0	Materiales y métodos	
13.1	<i>Líneas celulares y tratamientos</i>	19
13.2	<i>Extracción de ácidos nucleicos y proteínas</i>	19
13.3	<i>Modificación del ADN por Bisulfito</i>	19-20
13.4	<i>Análisis de Metilación específica</i>	20
13.5	<i>Transcripción Inversa</i>	20
13.6	<i>Western Blots</i>	21
13.7	<i>Análisis Densitométrico</i>	21
13.8	<i>Metilación Global</i>	21-22
13.9	<i>Análisis Estadístico</i>	22
14.0	Resultados.....	22-30
15.0	Discusión y conclusiones.....	30-36
16.0	Referencias.....	36-44

1.0 RESUMEN

Cornacchia *et al.*, en 1988 le atribuyeron a la hidralazina la capacidad de inhibir la metilación del ADN en células Jurkat, lo que hizo despertar el interés en esta molécula por parte de nuestro grupo de investigación. La hipótesis que se concibió fue que la hidralazina, en virtud de su actividad inhibitoria de la metilación del ADN, podría restaurar la expresión de genes supresores de tumores que tenían hipermetilada su región promotora.

Con el ánimo de resolver esta inquietud, Segura *et al.*, realizaron una serie de ensayos, donde se demostró la capacidad desmetilante y reactivadora de genes supresores de tumores, por parte de la hidralazina. Para el año 2005 Zambrano *et al.*, revelaron el mismo efecto en pacientes con cáncer cérvicouterino.

La siguiente propuesta fue una serie de modelos moleculares realizados en el 2005 por Angeles *et al.*, que llevaron a la identificación de los sitios de interacción de la enzima ADN metiltransferasa junto con la hidralazina. Se demostró que existe una alta afinidad entre estas dos moléculas.

Posterior a estos estudios y con el ánimo de identificar y desarrollar otras moléculas capaces de bloquear el sitio activo de las ADN metiltransferasas humanas y de optimizar el efecto desmetilante y disminuir los efectos adversos de la hidralazina, se realizó el mismo estudio *in silico* para modelar las propiedades de nuevos productos sintéticos análogos a la hidralazina. La molécula 2-hidrazinopiridina (LQM502), demostró ser un buen candidato como agente inhibidor de metilación, al indicar una interacción favorable con la enzima.

El propósito de este trabajo entonces, fue comparar la actividad desmetilante y reactivadora de este nuevo compuesto junto con su análogo, la hidralazina, específicamente en el gen supresor de tumor GRIM19 en diferentes líneas celulares de cáncer.

Los datos muestran que el compuesto LQM502 induce la expresión de GRIM19, por una actividad desmetilante de este compuesto, en tres líneas celulares tumorales humanas. También observamos una disminución en los niveles de metilación global, lo que da a entender su importante actividad desmetilante.

Los resultados resaltan la relación conjunta que existe entre un agente desmetilante y un inhibidor de HDACs como lo es el ácido valproico, ya que se ve una acción sinérgica que favorece los niveles de expresión de este gen en particular.

2.0 EPIGENÉTICA Y CÁNCER

Clásicamente el cáncer se ha visto como un conjunto de enfermedades que son consecuencia de anormalidades genéticas, que incluyen mutaciones de genes supresores de tumores y oncogenes, y también anomalías cromosómicas.⁶

En 1983, Andy Feinberg y Bert Vogelstein demostraron en sus estudios una importante proporción de islas CpG (regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia mayor del 60% de dinucleótidos CG) metiladas, en tejidos normales y desmetiladas en células tumorales, identificando así la primera anormalidad epigenética en células tumorales. Actualmente se sabe que en un genoma normal el 1% de todas las citosinas o el 70%-80% de los dinucleótidos CG están metilados.²⁸

Este y otros descubrimientos permitieron establecer que el cáncer también es consecuencia de cambios epigenéticos, los cuales corresponden a aquellos cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN.⁵⁵

El cáncer es entonces también una enfermedad epigenética, lo que nos lleva a entenderlo como una combinación de modificaciones en el ADN, organización de la cromatina y variaciones en sus proteínas asociadas, que configuran una nueva entidad que regula la función génica a través de la metilación, acetilación y remodelamiento de cromatina.²⁹

La estructura donde se llevan a cabo estas modificaciones o cambios de tipo epigenético es la cromatina nuclear, donde el ADN y las proteínas asociadas están condensadas de manera ordenada. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, los cuales se encuentran formados por 147 pares de bases enrolladas en dos vueltas, alrededor de un octámero de histonas, las cuales contienen dos copias de cada histona nucleosómica H2A, H2B, H3 y H4. La afinidad de las histonas al ADN y a diferentes proteínas asociadas a este complejo, la regulan la acetilación, metilación, fosforilación, poli ADP ribosilación y la ubiquitinación en el extremo amino-terminal de las histonas. Dichas modificaciones organizan el genoma en una cromatina compacta (heterocromatina) o

relajada (eucromatina), que finalmente regulan el acceso de factores de transcripción, replicación y reparación.

3.0 METILACIÓN DEL ADN

Dentro de los tipos de herencias epigenéticas se encuentran la metilación del ADN y la modificación de las histonas⁵⁵ La metilación del ADN es un mecanismo normal en el desarrollo de las células que consiste en la adición de un grupo metilo a las citosinas del ADN que se encuentran adyacentes a las guaninas en los dinucleótidos CpG. Estos dinucleótidos están presentes aproximadamente cada 80 dinucleótidos, habiendo regiones de 200pb a varias kilobases con una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG, denominadas “islas CpG”. Estas se localizan en general entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción.⁷⁻⁴

En células eucariontas la metilación de las citosinas ocurre predominantemente en las regiones con baja densidad de CpGs.⁸ Por el contrario, pequeñas regiones localizadas en la zona regulatoria 5´ de los genes, con alta densidad de islas CpG, se encuentran siempre desmetiladas en células normales, con la excepción de algunos genes, tales como aquéllos que se mantienen desmetilados sólo hasta que se asocian con el desarrollo embrionario, como es el caso de los que se encuentran en el cromosoma X inactivo de las mujeres⁴⁵ y algunos otros genes como los transposones lo que sería un mecanismo de defensa del genoma contra estos elementos móviles³⁸. También se ha relacionado con la regulación del sistema inmune, estando involucrado en el control del desarrollo de las células hematopoyéticas y decisiones de linaje, competencia inmune, autoinmunidad y cambios del estatus inmune relacionados con la edad.^{43,36}

La maquinaria de metilación en mamíferos está compuesta por dos importantes partícipes: las ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales catalizan la transferencia del grupo metilo de la S adenosil- L-metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina. Se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción y se han clasificado en dos grupos: las ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasas *de novo* (DNMT3A y DNMT3B).

El otro grupo de proteínas involucradas en el proceso de metilación son las proteínas de unión a CpGs metiladas (MeCPs o MBD), las cuales son las intérpretes de las marcas y determinan el nivel de expresión.³⁴⁻⁷

En 1986 Baylin *et al.*,⁶ encontraron una estrecha relación entre el silenciamiento de la expresión de un gen con su hipermetilación específica, pero fue hasta 1989 cuando el grupo de Horsthemke²⁵ relacionó la hipermetilación del promotor de RB con el silenciamiento de este gen. Se demostró entonces que este gen tiene una pequeña isla CpG dentro del promotor, y esta isla permanece desmetilada en todos los tejidos en desarrollo. Sin embargo, la hipermetilación de su región promotora redujo dramáticamente su expresión.

Estos hallazgos llevaron a estudios de otros genes supresores de tumores tales como p16,⁴⁴ VHL,²⁸ Caderina E,²⁴ hMLH³³ y BRCA1²⁰ observando que se disminuían sus niveles de expresión en diferentes tipos de tumores y que esta disminución no correlacionaba con modificaciones de tipo genético. Fue entonces que se confirmó que la hipermetilación de sus regiones promotoras era la causante de los bajos niveles de expresión.

Entonces se concibió que la metilación local ocurre en la región promotora de genes, reprimiendo su transcripción debido a la inhibición de la unión de factores de transcripción y por el reclutamiento de MeCPs junto con su maquinaria represora.

Actualmente se sabe que un amplio espectro de genes involucrados en el control de ciclo celular, respuesta al daño del ADN, apoptosis, invasividad y demás pasos críticos para el proceso de iniciación y progresión del cáncer son silenciados por hipermetilación de sus promotores.

4.0 HISTONAS Y MODIFICACIONES POSTRANSCRIPCIONALES

Aunque muchos autores se han enfocado en estudiar únicamente procesos de metilación de ADN involucrados en la regulación de enfermedades humanas, hay una evidencia clara de la existencia de otros procesos epigenéticos responsables de distintas patologías. El remodelamiento de la cromatina es crítico para la regulación epigenética y una de las principales actividades remodeladoras es la modificación de las histonas. Modificaciones de este tipo son las que se conocen como el "código de histonas", que son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoulación de los residuos amino de las histonas.¹⁰

Dentro de estas modificaciones la más estudiada es la acetilación de las histonas. La acetilación neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina y de arginina de los extremos aminoterminales de las histonas, la cual es una característica de un genoma transcripcionalmente activo, ya que reduce la interacción electrostática ADN/histona. El estado de acetilación de las histonas es un proceso dinámico y depende de un balance entre la actividad de las histona-acetiltransferasas (HAT) y las histona deacetiltransferasas (HDAC). Las HAT actúan como co-activadores transcripcionales favoreciendo una estructura relajada de la cromatina, mientras que las HDAC asisten a la formación de complejos correpresores para limitar el acceso de factores de transcripción.²

Como se observó con la metilación del ADN, también la pérdida o ganancia de acetilación y metilación en las lisinas de las histonas se ha observado en células tumorales. La pérdida de la acetilación de las histonas ha sido identificada como el primer paso en el silenciamiento génico. Se ha reconocido ampliamente que las HDACs son unos blancos prometedores para las intervenciones terapéuticas con el ánimo de revertir estados aberrantes epigenéticos, por eso el interés de diseñar inhibidores de HDACs.¹⁰

5.0 INHIBIDORES DE METILACIÓN

Existen dos clases de inhibidores de metilación:

5.1 *Análogos de nucleósidos*

Estos análogos tienen el anillo de la citosina modificado y están acoplados ya sea a la ribosa o desoxirribosa. Son posteriormente metabolizados por las cinasas que convierten los nucleósidos en nucleótidos para incorporarlos en el ADN y/o ARN. La metilación al parecer es inhibida cuando los compuestos son incorporados en el ADN, ya que durante la replicación del ADN las DNMTs forman un complejo donde el donador de grupos metilo SAM se incorpora. En un anillo normal de citosina el grupo metilo es transferido de SAM al carbono 5 de la base y la enzima es liberada. En el caso de los análogos de la citosina, la modificación en el carbono 5 del anillo resulta en la formación del complejo unido covalentemente, lo que previene la futura metilación del genoma.

5-aza-deoxicitidina (5-Aza-CdR) y 5-azacitidina (5-aza-CR) son los clásicos inhibidores de metilación análogos de nucleósidos, los cuales fueron descritos hace 30 años como agentes citotóxicos pero posteriores estudios los caracterizaron como inhibidores de metilación. A la fecha se ha demostrado que su mayor actividad en la reactivación de genes silenciados por metilación ha sido en leucemias, lo que ha llevado a la 5-Aza-CR a ser aprobada por la FDA (Federal Drug Administration) para el tratamiento del síndrome mielodisplásico. Otros análogos de nucleósidos son: dihidro-5-azacitidina (DHCA), 5-Fluoro-2'-deoxicitidina (5-F-CdR) y 5-aza-citosina.

5.2 *No nucleósidos*

Estas pequeñas moléculas pueden ser más útiles que el grupo anterior ya que pueden inhibir la metilación por la unión directa con la enzima ADN metiltransferasa en su sitio catalítico sin incorporarse en el ADN. Actualmente se han caracterizado varias moléculas con actividad desmetilante, como es el caso del zebularine,¹⁴ procaina, hidralazina,⁵¹ un extracto del polifenol del té verde,²¹ el antisentido MG98⁵³ y la molécula RG108.¹¹

6.0 HIDRALAZINA COMO INHIBIDOR DE METILACIÓN

Esta droga ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de hipertensión arterial. Sin embargo, también se ha reportado una asociación con la condición de lupus *like*, cuya consecuencia puede ser debido a su efecto inhibitorio de la metilación, el cual fue descrito en 1988 por Cornacchia *et al.*,¹⁵ donde le atribuyen a la hidralazina la capacidad de inhibir la metilación del ADN en células Jurkat.

Este hallazgo hizo despertar el interés en la hidralazina por parte de nuestro grupo de trabajo, donde la hipótesis que se concibió fue que la hidralazina, en virtud de su actividad inhibitoria de la metilación del ADN, podría restaurar la expresión de genes supresores de tumores que se había descrito anteriormente que tenían hipermetilada su región promotora.

Con el ánimo de responder esta inquietud se diseñaron ensayos *in vitro* e *in vivo*, los cuales demostraron la capacidad de inhibir la metilación de genes supresores de tumores tales como receptores de estrógenos (ER), p16, y receptor de ácido retinoico (RAR β) cuyos promotores se encontraban metilados en las líneas celulares tumorales MDA231, T24 y MCF7 respectivamente, y posteriormente fue corroborado con la inducción de la expresión de estos genes,⁵¹ ensayos que se ejecutaron posteriormente en pacientes sin tratamiento previo con diagnóstico histológico de carcinoma de cérvix.⁵⁷

6.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE HIDRALAZINA

Los mecanismos que se han propuesto de cómo actúa la hidralazina han sido hasta ahora dos. El primero fue descrito en el 2003 por Richardson *et al.*,¹⁶ quienes sugieren que la hidralazina no es un inhibidor directo de la actividad enzimática de las DNMTs, sino que a través de la inhibición de la fosforilación de ERK disminuye la expresión de estas enzimas, ya que se demuestra allí mismo que la DNMT1 y la DNMT3a son reguladas en parte por las señales de la vía de ERK¹⁶. Y hallazgos recientes corroboran cómo ciertos inhibidores de la vía de ERK disminuyen los niveles de metilación al inhibir la DNMT1 en la línea celular tumoral de colon humana SW1116.⁴⁸

La siguiente propuesta fue una serie de modelos moleculares realizados en el 2005 por Angeles *et al.*,² donde se determinaron los sitios de interacción de la hidralazina y la enzima *HhaI*, una ADN metiltransferasa que es parte del sistema de restricción de la bacteria *Haemophilus haemolyticus*, que reconoce la secuencia 5'-GCGC-3' y metila la citosina interna en la posición C5. En este estudio se demostró que existe una alta afinidad entre estas dos moléculas, dándonos a entender el porque la hidralazina puede ser usada como un agente epigenético terapéutico para el tratamiento del cáncer.² Estos estudios motivaron el diseño de otras moléculas que pudiesen tener mejores afinidades por las metilasas y así más potentes actividades desmetilantes.

7.0 INHIBIDORES DE HDACs

Los inhibidores de HDACs han demostrado actividad contra diversos tipos de cánceres y notables efectos en proliferación tumoral, muerte celular programada, diferenciación y angiogénesis *in vitro* en *in vivo*.⁴⁰ Por ejemplo, se ha visto que inducen inhibidores cinasa-dependientes de ciclina como p21, que es responsable de arresto G1/G2 y la subsiguiente diferenciación celular; también pueden cambiar la expresión de genes involucrados en la inhibición de angiogénesis y metástasis.

Un gran número de moléculas inhibitoras de HDACs se ha purificado de fuentes naturales o se han desarrollado de manera sintética. Actualmente hay 6 diferentes clases de inhibidores de HDACs; esta clasificación los agrupa dependiendo de su estructura química y en la variabilidad en cuanto a su eficiencia para inhibir enzimáticamente a las HDACs.

Inicialmente se propuso que estos inhibidores mediaban su actividad biológica al involucrar la expresión de genes por la hiperacetilación de histonas, pero actualmente se sabe que no sólo afectan la transcripción de genes, sino también la mitosis, la replicación y reparación del ADN, al igual que pueden regular la acetilación de otras proteínas no histonas, mostrando un amplio espectro de acción.

Un ejemplo de un inhibidor de HDACs que ha sido utilizado por décadas en terapia, es el ácido valproico, conocido ampliamente como una droga anticomicial. Datos más recientes demuestran que esta droga puede modular el epigenoma inhibiendo la

actividad catalítica de las HDACs, probablemente por la unión al centro catalítico y bloqueando el acceso del sustrato^{46, 35}, lo que causa la hiperacetilación del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4 tanto *in vitro* como *in vivo*. A pesar de ser menos potente que otros inhibidores como la tricostatina y el n-butilato, el ácido valproico puede inducir expresión génica y se ha sugerido también que puede reactivar genes que son regulados por metilación del ADN.⁵²

8.0 TERAPIA COMBINADA DE INHIBIDORES DE METILACIÓN Y DE HDAC

Está bien documentada la relación que existe entre la metilación del ADN, la estructura de la cromatina y la expresión génica. La metilación del ADN genera una configuración cerrada en la cromatina a través de la interacción de los complejos remodeladores de cromatina dentro de los cuales están las MBDs³⁰. Datos recientes demuestran que esta relación es bidireccional, la cromatina cerrada precede a la metilación del ADN y existe una interacción física entre las DNMTs y enzimas modificadoras de cromatina como las HDACs.

Hallazgos de Cameron *et al.*, demostraron que los inhibidores de HDAC y de metilación de ADN activan genes por diferentes mecanismos y por lo tanto diferentes genes son blancos cuando se aplican como agentes solos; consecuentemente, pueden actuar sinérgicamente cuando se aplican en combinación.¹² Sin embargo, datos recientes sugieren que los inhibidores de DNMTs y de HDAC pueden atacar los mismos blancos genómicos.²³

Nuevos descubrimientos han demostrado que al combinar 5-Aza-CdR y tricostatina A o depsipéptido sinérgicamente se reactivan genes supresores de tumores silenciados como MLH1, TIMP3, CDKN2B, CDKN2A, ARH1, gelsolina y maspinas, incrementando el nivel de apoptosis en las células tumorales, lo que sugiere la utilidad de una terapia combinada con inhibidores de metilación y de HDACs.^{47,9,54}

Debido a la posibilidad de que el tratamiento con los inhibidores de HDAC resulte en una alteración de la metilación del ADN (esto tiene una clara e importante implicación en el futuro uso de esos agentes en las terapias), se han combinado en varios modelos *in*

vitro e *in vivo*.⁵⁸ Estudios *in vitro* con hidralazina y ácido valproico demostraron la habilidad de estas dos drogas como agentes desmetilante e inhibidor de HDACs respectivamente, y sus efectos sinérgicos en la inhibición de crecimiento celular en diferentes líneas celulares tumorales también demostraron su habilidad de sobre-expresar cierto número de genes dentro de los cuales se encontró la sobre-expresión de un gen supresor de tumor: Grim19, el cual llamó nuestra atención.⁵

9.0 GRIM 19 COMO MODELO DE ESTUDIO

En el año 2000, con el ánimo de entender las bases moleculares de la muerte celular e identificar los genes que participan en este proceso, específicamente cuando esta muerte es inducida por la combinación de interferón y ácido retinoico (IFN/RA) se pudo caracterizar y aislar el nuevo gen GRIM 19 (por sus siglas en inglés Genes Associated with Retinoid IFN induced Mortality). Se demostró entonces que con el antisentido de GRIM 19 confiere sobrevivencia celular y crecimiento, y su sobreexpresión aumenta la sensibilidad de las células a la muerte por interferón y ácido retinoico.³

Este gen codifica para una proteína de 16 kDa de 144 aminoácidos descrita principalmente como una proteína mitocondrial y nuclear, que se expresa ubicuamente en varios tejidos humanos y en altos niveles en músculo cardíaco y esquelético y en menor grado en hígado, riñón, y cerebro²⁶. Esta proteína interactúa específicamente y regula de manera negativa la actividad de STAT3 (por sus siglas en inglés Signal Transducers and Activators of Transcription 3), que es un factor de transcripción que puede ser activado por citosinas y factores de crecimiento, el cual juega un papel importante en crecimiento celular, anti-apoptosis y transformación celular y está constitutivamente activo en varios cánceres.⁴¹

También se ha demostrado que GRIM 19 es un componente esencial para el ensamblaje del complejo I mitocondrial y para la integridad de toda la cadena de transferencia de electrones mitocondrial, necesarios para los procesos involucrados en la cadena respiratoria.²⁶

Ma *et al.*, demostraron que IFN/RA estimulaba la asociación de GRIM19 con la proteasa mitocondrial HtrA2, cuya función es degradar una de las proteínas inhibitorias de apoptosis XIAP, la cual inhibe caspasa 9, por lo que dicha interacción favorecía la muerte celular ⁴². A su vez, Sudhakar *et al.*, corroboraron las propiedades de esta proteína como supresora de tumores al demostrar la unión que existe entre GRIM19 y el dominio de transactivación de STAT3, donde en respuesta al tratamiento con IFN/RA se promovía la unión de GRIM19 con los promotores de genes dependientes de la activación por parte de STAT3, como lo son *bcl-2*, *bcl-x_l* y *ciclina B1*, proteínas antiapoptóticas ³¹.

En el 2006 Alchanati *et al.*, observaron que hay una relación entre la pérdida de la expresión de esta proteína y el cáncer renal humano y otros tumores urogenitales. Sin embargo, esta pérdida de expresión no se ha asociado con cambios de tipo genético, y es por eso que modificaciones como la metilación pueden explicar las razones de la pérdida de su expresión¹.

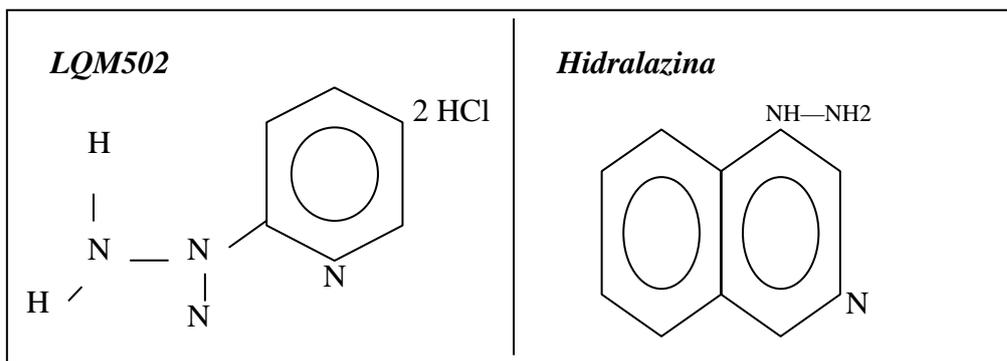
Son necesarios estudios que puedan explicar si los eventos que causan este silenciamiento o la disminución de la expresión de este gen son debidos a eventos epigenéticos. Tal como se hicieron para un homólogo de GRIM19, el NDUFB6 el cual también forma parte del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. En dicho estudio Ling *et al.*, demostraron que la combinación de factores genéticos y epigenéticos estaban asociados a la reducción de la expresión de este gen en músculo esquelético en personas de edad comparadas con personas jóvenes, asociado a un polimorfismo que se ve en las personas ancianas que las hacen más susceptibles a la metilación del ADN en la región promotora de este gen.

10.0 JUSTIFICACIÓN

Posterior a estos estudios y con el ánimo de identificar y desarrollar otras moléculas capaces de bloquear el sitio activo de las ADN metiltransferasas humanas y de optimizar el efecto desmetilante y disminuir los efectos adversos de la hidralazina, se realizó el mismo estudio *in silico* para modelar las propiedades biológicas y fisicoquímicas de nuevos productos sintéticos análogos a la hidralazina. Dentro de estos, la molécula (LQM502) 2-hidrazinopiridina demostró ser un buen candidato como

agente inhibidor de metilación al indicar una interacción favorable con la enzima uniéndose a dos residuos de ésta. (Publicación en proceso)

El propósito de este trabajo es comparar la actividad desmetilante y reactivadora de este nuevo compuesto junto con su análogo, específicamente en este gen supresor de tumor GRIM19 en diferentes líneas celulares de cáncer.



11.0 HIPÓTESIS

El análogo de la hidralazina LQM502 es un agente demetilante del ADN y reactivadora de la expresión de GRIM19 *in vitro*

12.0 OBJETIVOS

12.1 General

Evaluar la actividad desmetilante y activadora de la expresión de GRIM19 por parte de LQM502.

12.2 Específicos

- Valorar la capacidad de LQM502 como inhibidor de metilación.
- Evaluar la capacidad de LQM502 para producir cambios en la metilación global del ADN.
- Estudiar la capacidad de LQM502 para reactivar la expresión de GRIM19.
- Analizar los niveles de proteína de GRIM 19 posterior al tratamiento.

13.0 MATERIALES Y MÉTODOS

13.1 Líneas celulares y tratamientos

Las tres líneas celulares CaLo (cérvix), HeLa (cérvix) y MDA 231 (mama) fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) cultivadas en D-MEM/F12 con 10% de suero fetal bovino. Se arrestaron durante 24 horas previas al tratamiento con ausencia de suero. Al día siguiente se lavaron con PBS y se adicionó medio nuevo con los fármacos hidralazina (10 μ M), LQM502 (10 μ M) y 5-Aza-CdR (0.75 μ M). Al tercer día se adicionó medio fresco con los fármacos y ácido valproico (1mM) y sus respectivas combinaciones. Al cuarto día al grupo de tratamiento con 5-aza-CdR le fue removido el medio y fue adicionado medio fresco. Al quinto día se despegaron las células con tripsina PBS+EDTA. Las condiciones de tiempos y concentraciones de los fármacos fueron escogidos de esta manera por estudios previos reportados por nuestro laboratorio. (Ref. 51 y 57).

13.2 Extracción de ácidos nucleicos y proteínas

El ADN genómico fue obtenido por el método de digestión con proteinasa k y purificación con fenol-cloroformo. La extracción de ARN se hizo con Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Para el análisis de proteínas, las células se cosecharon y se centrifugaron, se lavaron con PBS 1X, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en el amortiguador de radio-inmunoprecipitación (RIPA) (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 1% NP40) con el inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail. Sigma).

13.3 Modificación del ADN por Bisulfito

Se diluyó 1 μ g de ADN en 50 μ l de agua y se desnaturalizó durante 25 minutos con 5 μ l de NaOH 3M a 42°C. Posteriormente se adicionó 30 μ l de hidroquinona 10mM y 510 μ l de bisulfito de sodio 3.9 M a pH 5 durante 13 hrs. a 55°C en oscuridad. El ADN modificado se purificó con las columnas de purificación Wizard (Promega) y se eluyó en 50 μ l de agua. Se desnaturalizó posteriormente el ADN con 5 μ l de NaOH 3M durante 15 min a 37°C. Posteriormente se neutralizó y se precipitó la reacción con 5 μ l

de acetato de amonio 3M y 300µL de etanol durante 2 horas a -20°C. Se centrifugó durante 30 min a 13.000rpm y se lavó con ETOH 70%. Finalmente se secó por vacío y se diluyó en 50µL de agua. Se utilizó inmediatamente o se guardó a -20°C en oscuridad para su posterior uso.

13.4 Análisis de Metilación específica

El gen estudiado fue GRIM 19, el cual fue analizado por la técnica de metilación específica mediante PCR como se describió anteriormente²⁷. La mezcla de la PCR contenía Buffer 10X a una concentración final de 1X, 0.5 unidades de Taq Gold polimerasa, dNTPs a una concentración final de 0.2mM, primers a una concentración final de 0.5 ppm y 200ng del ADN modificado en un volumen final de 20µL. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

	Secuencia	Producto	Tm
Metilado GRIM19	Sen 3'- TGT ATA TTT CGA TGA ATT CGA AGA-5' AnS 5'- TAA TAA ACC GAC GAC GAA CG-3'	123 pb	55°C
Desmetilado GRIM19	Sen 3'- TTG TAT ATT TTG ATG AAT TTG AAG ATG T -5' AnS 5'- AAA TAA TAA ACC AAC AAC AAA CAC C -3'	127 pb	55°C

El estado de metilación sin tratamiento y con tratamiento se corroboró por la secuenciación del producto de PCR, el cual fue precipitado con isopropanol y fue secuenciado con el primer sentido. El ADN purificado fue diluido y secuenciado usando el kit ABI BigDye Terminator v3.1 (ABI, Foster City, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación fueron examinadas en el analizador genético ABI3100.

13.5 Transcripción Inversa

El ARN total fue extraído para transcripción reversa usando el kit de RT-PCR (Perkin Elmer). Los primers y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

	Secuencia	Producto	Tm
GRIM19	Sen 3'- AAT GCA AGA ACC AAG GCG AGT CAC -5' AnS 5'- AGG CAT GTC CTG CTT CAC CTT TGA -3'	283 pb	59°C
Actina	Sen 3'- ACC ATG GAT GAT GAT ATC G -5' AnS 5'- ACA TGG CTG GGG TGT TG AAG -3'	310 pb	59°C

13.6 Western Blot

10 µg de la proteína total se separaron electroforéticamente mediante SDS-poliacrilamida al 16% y fueron inmovilizados sobre una membrana de Polyvinylidene difluoride Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) después de 2 horas de bloqueo con TBS y Tween 20 con un 5% de leche en polvo baja en grasa a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario contra GRIM 19 (Mito Science LLC), anticuerpo monoclonal de ratón. Después, fueron lavadas con PBS Tween 20 y posterior a esto fueron incubadas con el anticuerpo secundario adecuado conjugado con peroxidasa. Después de nuevos lavados, las membranas se revelaron con el sustrato de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences. ECL plus Western Blotting Detection System). Para determinar las cargas y normalizarlas, se tiñeron los geles con azul de coomassie y posteriormente se leyeron las bandas en un espectrofotómetro.

13.7 Análisis Densitométrico

Las intensidades de los Western blots y de las RT-PCR fueron cuantificadas por densitometría empleando el programa NIH image versión 1.62. Los resultados de cada banda fueron normalizados utilizando como referencia la expresión de actina en los RT-PCR y en el caso de los Western blots se empleo la concentración total de proteína en cada línea del gel, que obtuvimos al teñir los geles con azul de coomassie y habiendolos leído en el espectrofotómetro.

13.8 Metilación Global

Adenina (A), timina (T), guanina (G), uracilo (U), citosina (C) y 5 metil-citosina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO; USA). Las bases se disolvieron en agua estéril y se filtraron a través de una membrana de poros de 0.45 µm (Millipore). El ADN extraído de las muestras fue suspendido en 60µL de agua estéril para una concentración final de 0.08µg/µL. La hidrólisis del ADN se llevó a cabo incubando las muestras en 440µL de ácido fórmico a 140°C en una ampula cerrada durante 90 min. Después de la hidrólisis, las muestras se redujeron por vacío y se resuspendieron en 8µL de agua estéril. Las muestras de ADN se analizaron por electroforésis capilar para la medición

de 5-metilcitosina como se reporto anteriormente.⁵⁰ Para el procedimiento de electroforésis capilar, un capilar sin recubrimiento fundido con sílice (Beckman-Coulter; 60 cm × 75 µm; longitud efectiva, 44.5 cm) se uso para este sistema (P/ACE MDQ; Beckman-Coulter) conectado a un procesador de datos (32 Karat software). El buffer de corrida fue 20mM de NaCO₃ (pH 9.6 ± 1) y 80 mM SDS. Las condiciones de corrida fueron a 25°C con un voltaje de 20 kV. La absorbancia fue monitoreada a 223nm. Después de cada corrida, el sistema del capilar fue acondicionado lavándolo con el buffer de corrida durante 2 min. Los buffers y las soluciones de lavado se prepararon en agua estéril y filtradas a través de poros de 0.45 µm. Las muestras hidrolizadas se inyectaron con una presión de 0.5 p.s.i durante 15 seg. La metilación relativa de cada muestra de ADN fue tomada como el porcentaje de ^mC en el total de las citosinas: $\frac{{}^m\text{C \acute{a}rea del pico} \times 100}{(\text{C \acute{a}rea del pico} + {}^m\text{C \acute{a}rea del pico})}$

13.9 Análisis Estadístico

Los datos fueron representativos de dos mediciones y están presentados como los promedios con sus errores estándar (+/-). Las comparaciones entre los grupos se hicieron con la prueba de Fisher. Las relaciones se analizaron con la prueba de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ fue usado para indicar las diferencias significativas entre los valores promedios.

14.0 RESULTADOS

En un estudio publicado por Arce *et al.*,⁵ en el 2006 donde se pretendía evaluar la eficacia clínica de los agentes epigenéticos hidralazina y valproato de magnesio junto con quimioterapia neoadyuvante (doxorrubicina y ciclofosfamida), en pacientes con cáncer de mama local avanzado, se demostró por un ensayo de microarreglos que posterior al tratamiento con estos agentes se hiperexpresaban 1091 genes y se regulaban hacia abajo 89. Dentro de aquellos genes que se encontraban sobre-expresados estaba GRIM 19. Para corroborar estos hallazgos se realizó una RT-PCR para evaluar su expresión pre y post tratamiento. Los resultados correlacionaron con los datos del microarreglo, lo que nos sugirió usar este gen como un modelo de estudio ya que puede estar regulado a través de mecanismos epigenéticos, así que se analizó si inhibidores de

la metilación como lo son 5-Aza-CdR, hidralazina y su análogo LQM502 son capaces de regular su expresión.

En primera instancia se hizo una RT-PCR para ver el estado de expresión de este gen en tres diferentes líneas celulares tumorales humanas: MDA231, CaLo y HeLa, con los diferentes tratamientos. (Fig. 1)

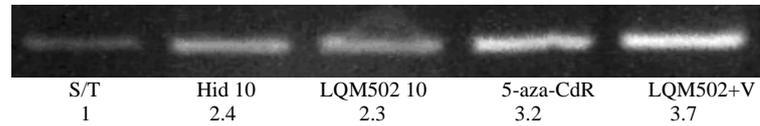
En las tres líneas celulares sin tratamiento se observó una expresión basal del gen, pero observamos un aumento en los niveles de expresión al tratar las células con LQM502. Sin embargo, este aumento se detectó igual que con el tratamiento con hidralazina 10µM y aún más importante con 5-aza-CdR. Cuando se usó la combinación LQM502 con ácido valproico se vio un aumento de la expresión en todas las líneas celulares. El patrón del aumento de la expresión se vio muy similar en las tres líneas celulares con respecto a los diferentes tratamientos.

Estos resultados se compararon con la expresión de la proteína por Western Blot. (Fig.2)

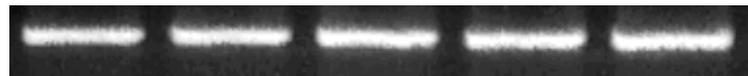
Como en la RT-PCR, en el Western Blot se pudieron observar también los niveles basales de la proteína en las células sin tratamiento, y cómo ésta aumenta con los diferentes tratamientos. Se vio un aumento similar al tratar las células con hidralazina y LQM502 en CaLo y HeLa en las MDA 231 vemos un mayor aumento al tratarlas con hidralazina. Al compararlas con LQM502 en esta misma línea celular se observó que al combinar LQM502 y ácido valproico la intensidad de la banda es menor que con solo el LQM502.

Tanto en MDA231 como en CaLo se detectó un ligero aumento con el tratamiento con 5-aza-CdR y con la combinación LQM502 y ácido valproico.

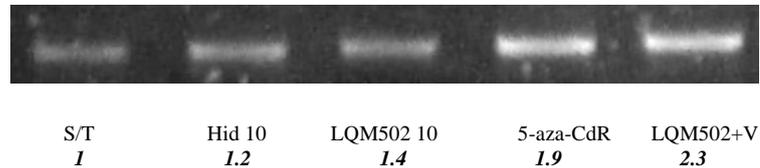
MDA 231
RT- GRIM 19



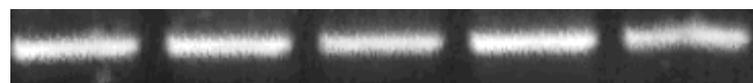
Actina



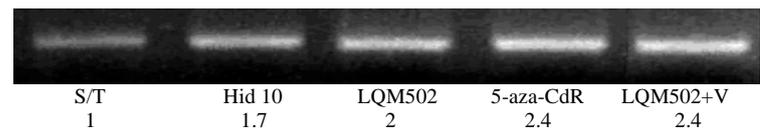
CaLo
RT-GRIM 19



Actina



HeLa
RT-GRIM 19



Actina

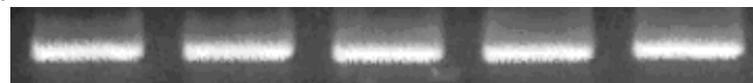
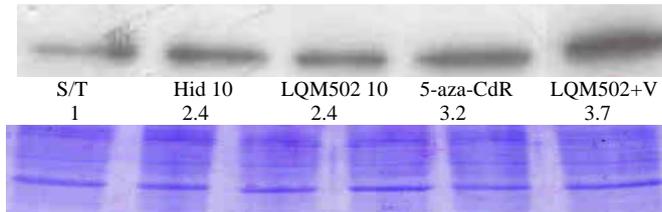
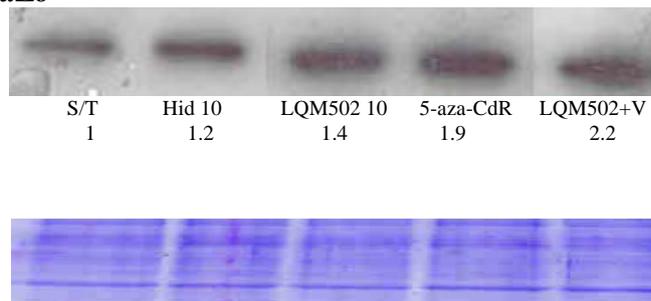


Figura 1. RT-PCR de GRIM19 para las líneas celulares CaLo, MDA 231 y HeLa. La amplificación de actina se usó para confirmar la integridad del cDNA. Células sin tratamiento (S/T), Hidralazina 10µM (Hid10), LQM502 10µM (LQM502 10), 5-aza-2-deoxicitidina 0.75 µM (5-aza-CdR) y LQM502 10µM +Acido Valproico 1mM (LQM502 + V). La intensidad de la señal de GRIM 19 fue normalizada con la intensidad de la actina y el índice de las células sin tratar fue definido como 1.

GRIM 19
MDA 231



CaLo



HeLa

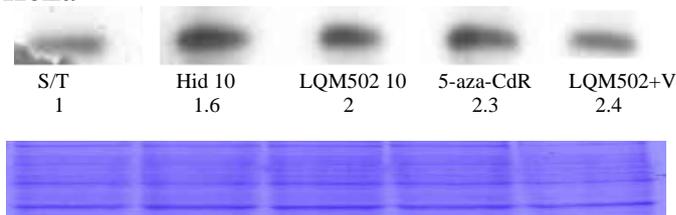
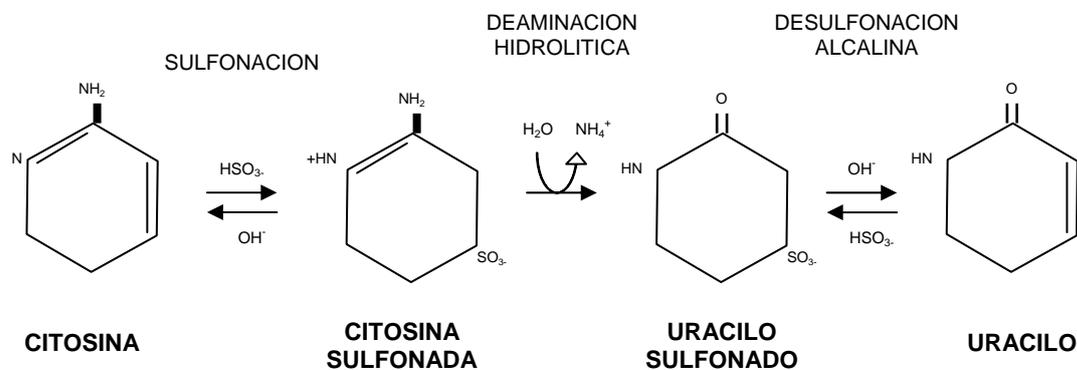


Figura 2. Western Blot para GRIM 19 para MDA 231, CaLo y HeLa. La intensidad de la señal de GRIM 19 fue normalizada con la concentración total de proteína en cada línea del gel.

Para caracterizar los cambios epigenéticos por el tratamiento a las células con LQM502, se hizo la PCR de metilación específica. Por ser un gen recientemente descrito aún no está caracterizada su región promotora, así que para nuestros ensayos decidimos tomar una región de 1kb arriba del primer exón, esto a través del programa Genome Browser. Lo siguiente que se realizó fue caracterizar una región rica en CGs para diseñar los primers para metilado y desmetilado y esto se llevó a cabo por el programa de MethPrimer Design.³⁶

El ADN de las tres líneas celulares se trató con bisulfito de sodio para procesarlo por la técnica de modificación, descrita previamente en materiales y métodos, y fue el ADN utilizado para la PCR de metilación específica (Fig. 3).

Brevemente esta técnica consiste en someter el ADN previamente desnaturizado por cambio de pH y de temperatura, a bisulfito de sodio, este convierte todos los residuos de citosinas no metiladas a uracilos mediante deaminación. Sin embargo, los residuos metilados de citosinas que son resistentes a la modificación permanecen como citosinas, el impedimento para que estas citosinas sean modificadas es debido a la presencia de un grupo metilo.



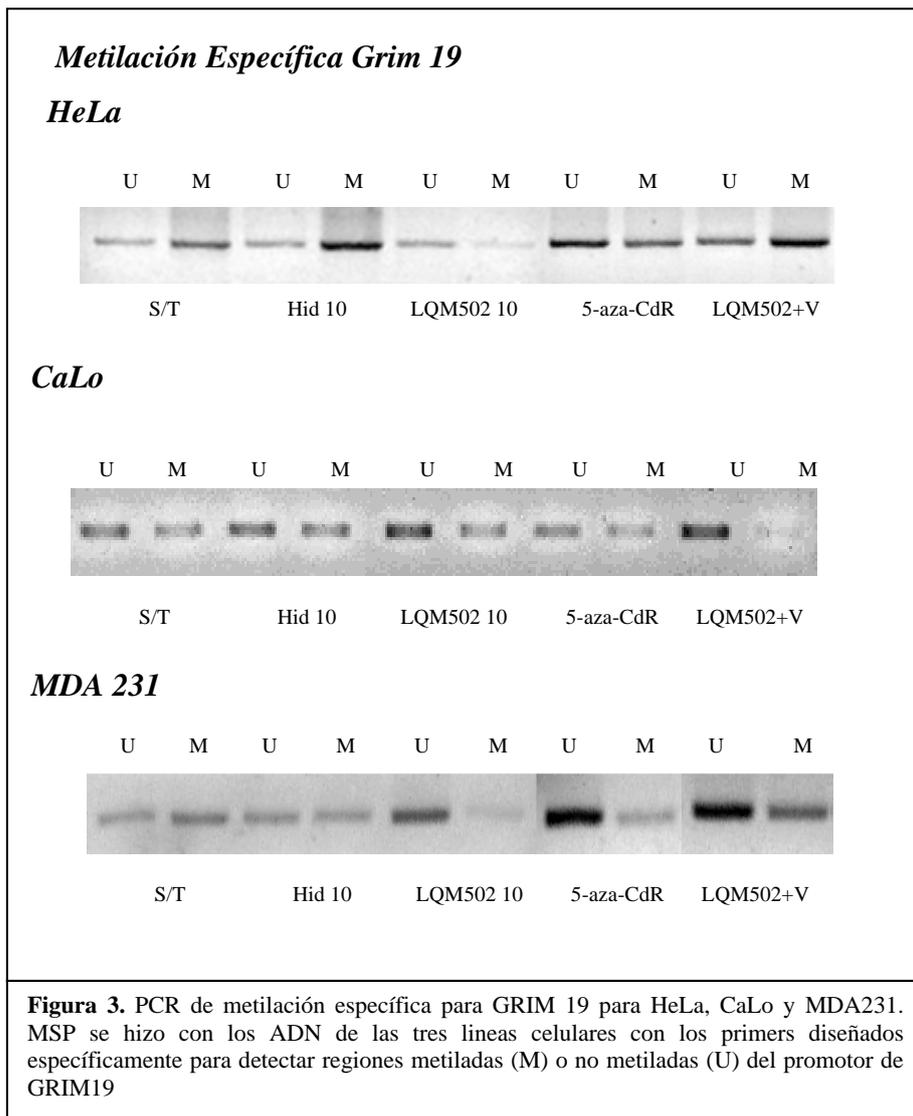
La PCR de metilación específica utiliza las diferencias en la secuencia entre alelos metilados y alelos desmetilados que surgen después del tratamiento con bisulfito de sodio. La frecuencia de sitios CpG facilita la diferencia entre las secuencias. Los primers para cada locus son diseñados para que le permitan distinguir cual ADN previamente modificado esta metilado y cual desmetilado. Los resultados se obtienen haciendo la amplificación por PCR y con un gel de electroforesis.

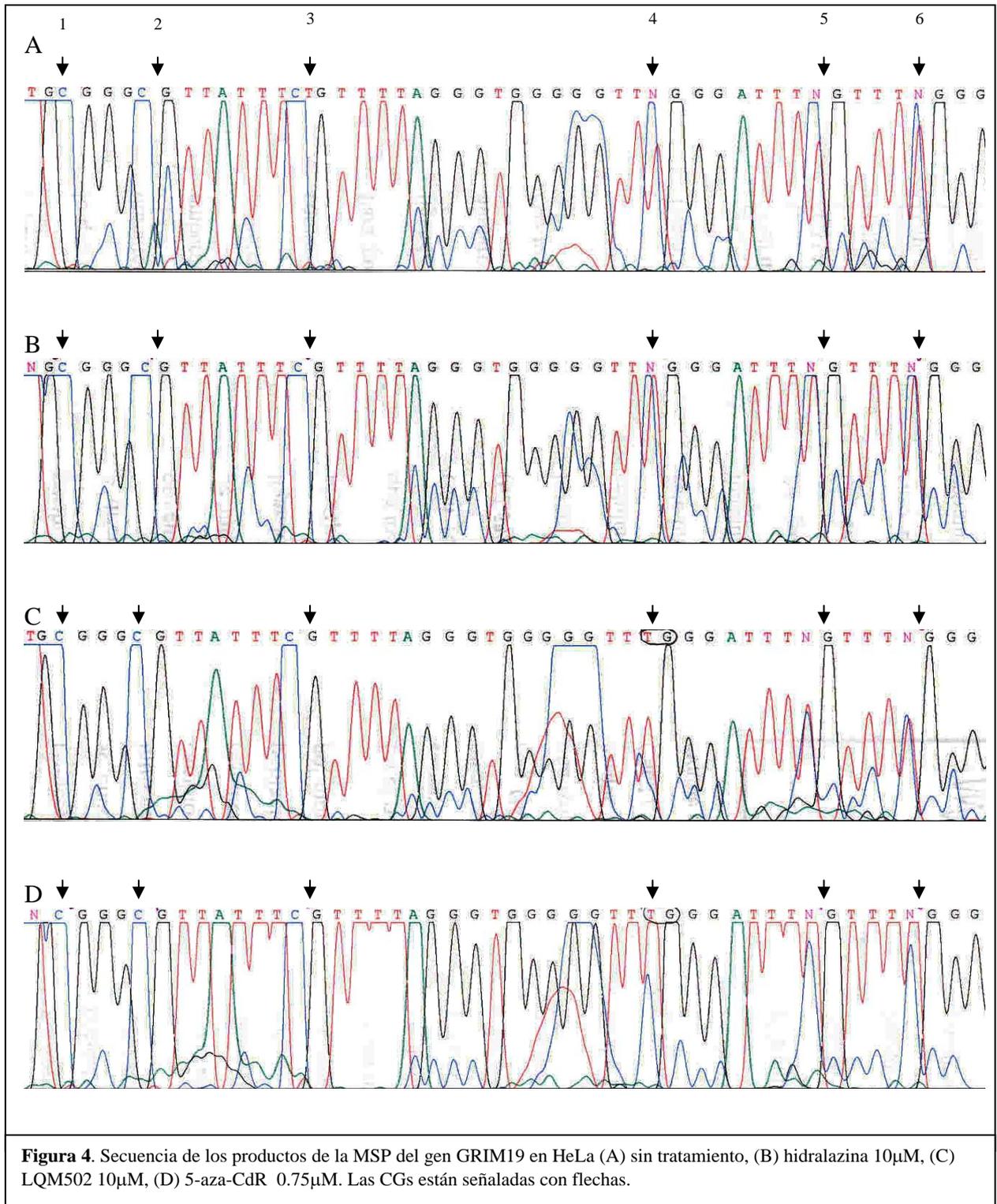
Como se pudo observar, existe una metilación parcial de esta región de este promotor, ya que identificamos presencia de transcrito de GRIM 19 tanto con los primers para metilado como para desmetilado. No obstante en las tres líneas celulares se detectó una desmetilación parcial después de la incubación con LQM502. A pesar de esto, con hidralazina no vemos diferencias importantes en cuanto a los niveles de desmetilación, al compararlos con las células sin tratamiento. Al combinar LQM502 con el ácido valproico observamos en que existe una acción sinérgica de estos dos compuestos a la

hora de desmetilar tanto en CaLo como en MDA231. Se observó siempre en las tres líneas celulares un aumento en los niveles de desmetilación al tratarlas con 5-aza-CdR.

Esta desmetilación fue confirmada por secuenciación de los productos de PCR de la PCR de metilación específica, con los ADNs de las células sin tratar y las células tratadas con hidralazina, LQM502 y 5-aza-CdR.

El producto a secuenciar fue del fragmento que amplifica el primer sentido metilado (Fig 4). Allí se encontraron seis CGs, de las cuales tres se encuentran totalmente metiladas (señaladas con flechas 1, 2, y 3), estas se mantienen como citosinas. Por otro lado las otras tres CGs (4, 5 y 6) se vieron parcialmente metiladas, es decir que localizamos poblaciones donde estas CGs se encuentran metiladas y otras desmetiladas.





Se observó que las CGs 4, 5 y 6 van cambiando su patrón de citosinas a timinas en la medida que cambiamos de tratamiento, lo que nos sugiere una desmetilación por parte de estos compuestos en estas CGs en particular y aun más evidente en la CG número 4 posterior al tratamiento con LQM502 y 5-aza-CdR, donde cambia completamente a

timina. Tanto los otros tratamientos y las otras líneas celulares que no se muestran en este experimento, no presentan cambios en su secuencia. (Datos no mostrados)

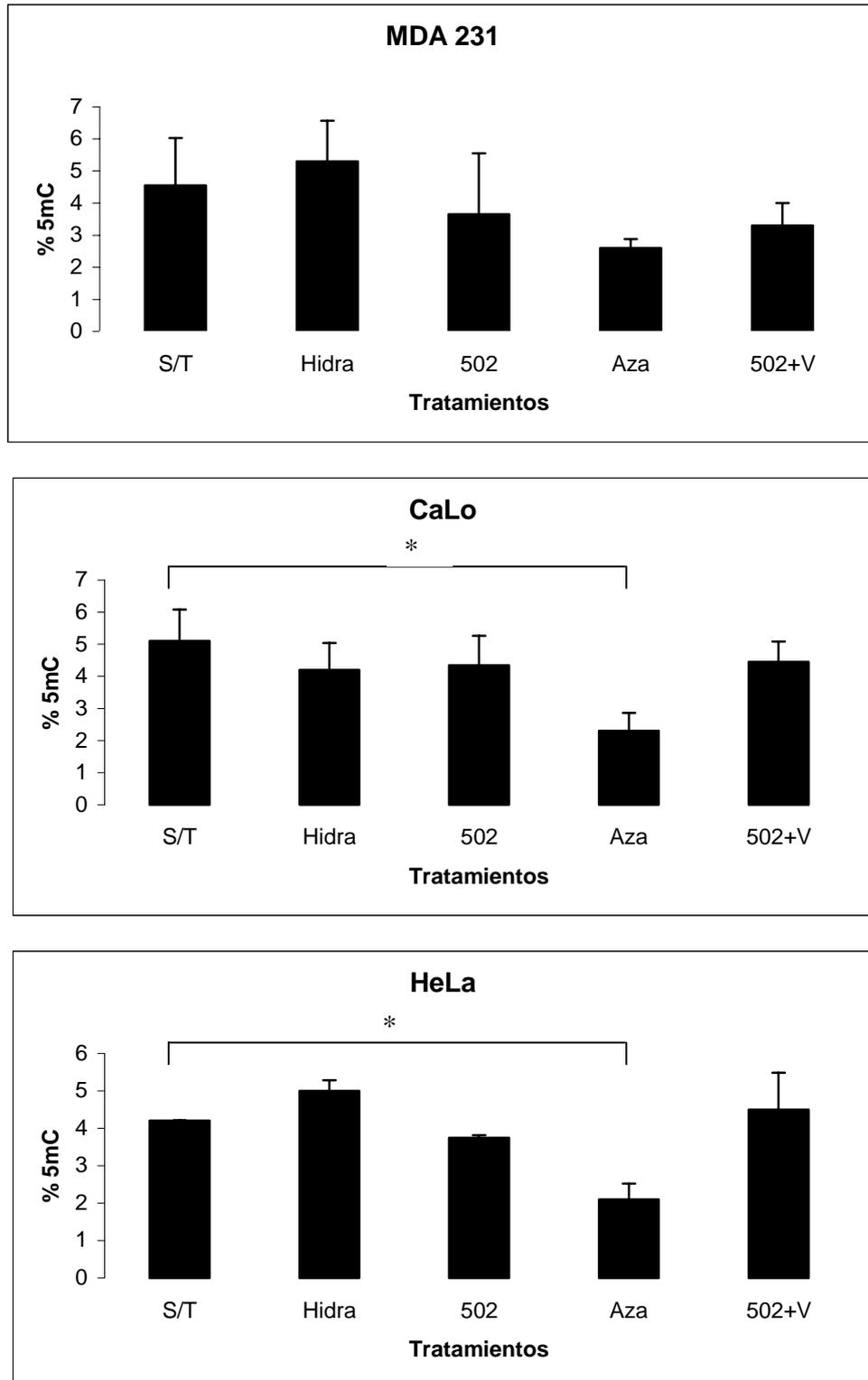


Figura 5. Metilación global analizada por electroforesis capilar en MDA 231, CaLo y HeLa. Los resultados expresados son el promedio de dos mediciones. * $p < 0.05$.

La evaluación de agentes desmetilantes no sólo requiere el estudio de sus efectos sobre los genes supresores de tumores, sino también sus cambios en la metilación global del ADN. Una de las metodologías más sensibles para medir los niveles de 5 metil-citosina total es por electroforesis capilar.

Para este propósito se purificó ADN de las líneas celulares tratadas con los diferentes compuestos y se determinaron los niveles de metilación por electroforesis capilar. La determinación del porcentaje de metil-citosina en las muestras se hizo utilizando esta relación: $(\text{área del pico de metil-citosina} \times 100) / (\text{área del pico de metil-citosina} + \text{área del pico de citosina})$, como se reportó por Fraga *et al.*,²² (Fig.5).

Se observó una moderada disminución en los niveles de metilación global, al tratar las células con LQM502 comparándolas con el control, pero donde vemos los más bajos niveles de metilación global es en las HeLa y MDA 231 tratadas con el análogo de la citosina, 5-aza-CdR.

15.0 DISCUSIÓN

La reversión de las modificaciones epigenéticas por inhibición de las ADN metiltransferasas, representa una estrategia experimental prometedora en la terapia del cáncer.¹⁷ Sin embargo, estas moléculas han tenido el gran impedimento en su uso clínico por sus altos niveles de toxicidad. Debido a esto ha sido importante identificar compuestos químicos con la habilidad de bloquear directamente las ADN metiltransferasas humanas.

Ya que algunas de estas moléculas no han mostrado alguna evidencia en cuanto a su directa inhibición con las metiltransferasas y su efectividad no se ha caracterizado correctamente aún, y puede que su efectividad sea debida a un efecto indirecto, es necesario identificar compuestos químicos que sean capaces de bloquear directamente las DNMTs.

En este estudio se hizo un análisis comparativo entre LQM502, la hidralazina y 5 aza-deoxicidina. Estos dos últimos compuestos se han descrito anteriormente como inhibidores de metilación en líneas celulares tumorales. LQM502 representa un

compuesto que fue seleccionado por su favorable interacción con el sitio activo de la enzima metil transferasa en un modelo *in silico*.

En los ensayos de RT-PCR y Western Blot, las células sin tratar mostraban unos niveles basales de la expresión de su transcrito y proteína; sin embargo, se ve que existe un aumento de la expresión del gen GRIM 19 después del tratamiento con LQM502, muy similar a los niveles de expresión inducidos por hidralazina, sugiriendo que el aumento en los niveles de expresión puede ser debido a la actividad desmetilante que tiene la hidralazina y que podría tener el compuesto LQM502.

De igual forma se vio un aumento en los niveles de expresión al combinar ácido valproico y LQM502 comparados con las células sin tratamiento, debido seguramente a un efecto sinérgico de estos dos compuestos, tal como se ha demostrado en otros modelos experimentales, como es el caso del estudio desarrollado por Yang *et al.*, donde analizaron el gen del receptor de estrógenos, el cual se encuentra metilado en algunas líneas celulares de cáncer de mama, y al tratarlas con 5-aza-CdR y/o con tricostatina (otro inhibidor de HDACs), inducían la re-expresión entre 5 y 40 veces; sin embargo, la expresión del transcrito del receptor se incrementó de 300 a 400 veces cuando las células fueron tratadas con la combinación de las dos moléculas.⁵⁶

Esto demuestra una reacción sinérgica entre el inhibidor de HDAC y los inhibidores de metilación, lo que debe ser considerado para la determinación de ambos mecanismos de acción de estas drogas, así como para el potencial terapéutico de su uso en la clínica. En ese caso, al combinar la molécula LQM502 con el ácido valproico se pueden ajustar estas observaciones a aquellas hipótesis o teorías donde mencionan que el ácido valproico activa genes también regulados por metilación.⁵² Por otra parte se debe tener en cuenta que también puede estar actuando directamente como inhibidor de HDACs, afectando aquellos genes que se encuentran metilados y se desmetilan y son activados como consecuencia de un incremento en la acetilación de histonas.

Sin embargo, lo que sí se puede asumir y concordar con otra hipótesis antes propuesta¹³ es que el estado de metilación de una secuencia es determinado por un balance dinámico entre la abundancia de la actividad desmetilante en la célula y el estado de acetilación de las histonas.

Pero definitivamente algo que podría explicar que el mecanismo de silenciamiento o de reducción de la expresión de este gen es la metilación de su región promotora, es la inducción que se observa al tratarlas con 5-aza-CdR, que es el clásico inhibidor de metilación, capaz de activar genes regulados por metilación. Sin embargo, vemos que los niveles de expresión son aún más elevados con 5-aza-CdR al compararlos con LQM502 y la hidralazina y esto puede ser debido en parte a los diferentes modos de acción de estos dos tipos de inhibidores.

Para corroborar nuestras hipótesis de un silenciamiento de este gen por metilación de su región promotora hicimos una PCR de metilación específica, dirigida a reconocer las secuencias tanto metilada como desmetilada posterior a la modificación con bisulfito. Lo que se observó fue un patrón de desmetilación en las tres líneas celulares al tratarlas con LQM502, al igual que al tratarlas con 5-aza-CdR.

Al secuenciar esta región que se flanqueo con los primers para la PCR de metilación específica (Fig. 4), se encontró que de las seis CGs que se abarcaron sólo las CGs 4, 5 y 6 están siendo parcialmente desmetiladas. Estas CGs van cambiando progresivamente con los diferentes tratamientos a TGs, debido a la conversión por bisulfito de las citosinas desmetiladas a uracilo. Después del tratamiento con LQM502 (Fig. 4C), estas tres CGs van mostrando un patrón de desmetilación ya que vemos cómo va aumentando el pico de timina y va disminuyendo el de citosina. Sin embargo, vale la pena resaltar que la desmetilación no es total, tal como aparece en la Fig. 3, y se ve como existe una población metilada y otra desmetilada.

Lo mismo sucede con aquellas células tratadas con 5-aza-CdR, en las que también se observa el aumento mucho más evidente de los picos de timina donde antes estaba una citosina (Fig. 4D). En el electrograma observamos que en las CGs donde vemos cambios el lector las reconoce como N es decir que no determina exactamente que nucleótido es, debido a la presencia de dos poblaciones en la muestra, existe la población donde las citosinas se mantuvieron metiladas y el lector las lee como citosinas y existe la población de cistosinas que se desmetilaron y posterior al tratamiento con bisulfito de sodio cambiaron a uracilo.

Quisimos averiguar que factores de transcripción estaban asociados a esta región del promotor para ver si estos estaban regulados por metilación, pero por nuestra búsqueda informática no hallamos ningún factor regulado de esta manera, lo que nos hace suponer es que la preferencia que se tiene por estas CGs en particular es debida al acceso que tienen las moléculas inhibidoras de metilación para intercalarse en el ADN como sería el caso de 5-aza-CdR o por el impedimento estérico que puede estar causando el LQM502 en la DNMT a la que se le este asociando, haciendo de éste un complejo que no tiene fácil acceso a regiones donde la cromatina es más compactas.

En estos ensayos se observa que la hidralazina no causa un efecto tan evidente comparado con los otros dos tratamientos, lo que sugeriría que la molécula LQM502 muestra una mejor actividad que la hidralazina a estas dosis de 10µM, y también demostró tener un efecto semejante al inhibidor de metilación por excelencia 5-aza-CdR, debido a su acción como inhibidor. Esto corrobora nuestra hipótesis de una actividad desmetilante por parte de la molécula LQM502, aunque su acción es débil al compararla con la 5-aza-CdR, ya que no se ve una desmetilación completa.

También debemos tener en cuenta que estamos analizando una supuesta región que es parte del promotor de este gen, pero no sabemos a ciencia cierta si le pertenece al promotor y puede ser debido a esto que no vemos cambios significativos en la secuencia a la hora de exponer las células con los diferentes tratamientos, ya que podemos estar analizando una región que no esta implicada en la regulación de este gen.

No obstante, es importante mencionar que la regulación de este gen no solamente es debida a la metilación de su promotor, ya que a pesar de que se encuentra parcialmente metilado sigue existiendo expresión de su mensajero y de su proteína. Sin embargo, otras modificaciones epigenéticas o un aumento en la concentración o tiempo de exposición de estas drogas podría aumentar los niveles de su expresión, esto para el diseño de experimentos futuros.

En células normales eucariontes diferenciadas, el 70% al 90% de las citosinas en los dinucleótidos CG se encuentran metiladas.¹⁹ Una de las principales alteraciones en la metilación del ADN reconocida en las células neoplásicas es la disminución de la metilación global; dicha hipometilación parece jugar un papel muy importante en la

tumorigénesis. La pérdida de metilación genómica correlaciona con la severidad de la enfermedad y el potencial metastático en varios tipos de tumores.⁵⁴ En nuestros ensayos se evaluaron los niveles de metilación global en las tres líneas celulares tumorales por electroforesis capilar (EC) como se describió anteriormente (Fig. 5).²²

Como podemos observar en la figura 5, hay una disminución en los niveles de metilación global del 20%, 14.8% y 10.8% en MDA231, CaLo y HeLa respectivamente, al tratar las células con LQM502 y comparándolas con el control, lo que significaría que esta molécula está actuando como un inhibidor de metilación. De cualquier forma es necesario evaluar este patrón de metilación después del tratamiento para ver si se re-establece este comportamiento.

Pero donde se encontraron más bajos niveles de metilación global fue en las células tratadas con 5-aza-CdR, donde se ven disminuciones entre el 40 y 50% con respecto al control, que también se ajusta a lo reportado anteriormente, donde observaban una disminución importante en estos niveles en pacientes con tumores sólidos después de 7 días de exposición a este fármaco.⁴⁹

Estos experimentos se hicieron también con el ácido valproico como monodroga, pero los omitimos en esta tesis ya que no encontramos cambios en ninguno de los ensayos al compararlos con el control de células sin tratamiento. Sin embargo, algo que cabe la pena resaltar es la acción por parte de esta droga al combinarla con LQM502, particularmente en la línea celular de cáncer de cérvix HeLa, tanto en la RT-PCR como en el Western blot observamos un aumento en los niveles del mensajero de GRIM 19 y consecuentemente de su proteína. Esto debido a la acción sinérgica por parte de estos dos tipos de drogas remodeladoras de cromatina, sin embargo, la secuenciación no la mostramos debido a que no observamos cambios en cuanto a su patrón de metilación que se ve reflejado de igual manera en los análisis de metilación global, en donde no distinguimos cambios en los niveles de 5mC comparados con el control sin tratamiento.

Esto también se puede correlacionar con la PCR específica de metilación que demuestra que aumentan los niveles del transcrito para los primers que reconocen los alelos metilados en las células tratadas con LQM502 y ácido valproico. Todo esto debido a la acción del ácido como remodelador de cromatina de otras regiones y de otros genes que

pueden estar favoreciendo que se revierta en esta línea celular la desmetilación por parte de LQM502.

Las implicaciones de este estudio son interesantes en el sentido de que hemos abierto una ventana más para la terapia epigenética del cáncer, ya que esta molécula LQM502 representa un candidato prometedor como inhibidor de la metilación, y podría ser útil como un agente remodelador de la cromatina que permitiría el acceso a otros fármacos que podrían potenciar sus efectos sobre ciertos tipos de genes. El estudio que le sigue a este hallazgo es inmenso y es necesario no retraerse puesto que es justo evaluar las capacidades de este fármaco en ensayos *in vivo* que nos puedan dejar entrever el panorama de un modelo más real al que vemos en las células en un universo unitario.

Pero algo que es interesante es que esta molécula comparte el grupo hidrazina en común con la hidralazina, lo que nos podría explicar su modo de acción con las DNMTs, inhibiendo la fosforilación de ERK (como habíamos mencionado anteriormente) ¹⁶, e induciendo de esta manera una reducción en los niveles de mensajero de alguna de estas enzimas, de la misma manera que lo hace la hidralazina. Por esto es importante evaluar la actividad de LQM502 como inhibidor de ERK y su actividad *in vitro* con las ADN metiltransferasas.

Otros estudios que deben seguir a estos hallazgos son los de analizar con profundidad los mecanismos que están regulando la expresión del gen GRIM 19, debido a su importancia en la cadena respiratoria mitocondrial y como inhibidor del factor de transcripción STAT3. Estos estudios deben involucrar tratamientos con ácido retinoico e interferón β , para ver si su reactivación se ve reflejada en su sensibilidad a estas moléculas.

CONCLUSIONES

En resumen, nuestros datos muestran que el compuesto LQM502 induce la expresión de GRIM 19, por una posible actividad desmetilante de este compuesto, en tres líneas celulares tumorales humanas. También observamos una disminución en los niveles de metilación global, lo cual nos podría estar dando a entender su importante actividad

desmetilante, efecto que podría llegar a ser pernicioso y nos sugeriría evaluar genes que se encuentren normalmente metilados, para ver si este compuesto es capaz de desmetilarlos indistintamente.

Nuestros datos también resaltan la relación conjunta que existe entre la desmetilación del ADN y la inhibición de las HDACs, puesto que vemos que este compuesto, que en teoría es un agente desmetilante, al combinarlo con un inhibidor de HDACs como lo es el ácido valproico, tiene una acción sinérgica que favorece los niveles de expresión de este gen en particular.

Sin embargo, aún no tenemos evidencia suficiente para poder afirmar que este compuesto análogo de la hidralazina sea más efectivo, puesto que hemos visto que cuando lo usamos sólo vemos casi el mismo efecto comparándolo con la hidralazina. De cualquier modo, sí observamos que al combinarlo con un inhibidor de HDACs se potencia su actividad.

El gen GRIM 19 que codifica para una proteína que regula de manera negativa a STAT3, parece estar regulado epigenéticamente en ciertas líneas celulares tumorales humanas y su condición aberrante puede ser revertida por acción de inhibidores de metilación o inhibidores de HDACs.

16.0 REFERENCIAS

1. Alchanati I, Nallar SC, Sun P, Gao L, Hu J, Stein A, Yakirevich E, Konforty D, Alroy I, Zhao X, Reddy SP, Resnick MB, Kalvakolanu DV. **A proteomic analysis reveals the loss of expression of the cell death regulatory gene GRIM-19 in human renal cell carcinomas.** *Oncogene*. 2006, 54;7138-47.
2. Angeles E, Vázquez-Valadez VH, Vázquez-Valadez O, Velzquez-Sanchez AM, Ramirez A, Martinez L, Diaz-Barriga S, Romero-Rojas A, Cabrera G, Lopez-Castañares R, Dueñas-Gonzalez. **A: Computational studies of 1-Hydrazinophthalazine (Hydralazine) as antineoplastic agent. Docking studies on methyltransferase.** *Lett Drug Design Discovery*. 2005, 2; 282-286.
3. Angell J, Lindner D, Shapiro P, Hofmann E, Kalvakolanu D. **Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach.** *J. Biol. Chem.* 2000, 275; 33416-33426.
4. Antequera F, Bird A. **Number of CpG islands and genes in human and mouse.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90; 11995-9.
5. Arce C, Pérez-Plasencia C, González-Fierro A, de la Cruz-Hernández E, Revilla-Vázquez A, Chávez-Blanco A, Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, Bargallo E, Villarreal P, Ramírez T, Vela T, Candelaria M, Camargo MF, Robles E, Dueñas-González A. **A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant Doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer.** *PLoS ONE*. 2006, 20;1:e98.
6. Baylin S, Ohm J. **Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?.** *Nat Rev Cancer*. 2006, 2; 107-16.

7. Bird A. **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** Genes Dev. 2002, 16; 6-21.
8. Bird, A. **CpG islands and the function of DNA Methylation.** Nature. 1986, 321; 209-213.
9. Boivin A, Momparler L, Hurtubise A, Momparler R. **Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells** Anticancer Drugs. 2002, 8; 869-74.
10. Bolden J, Peart M, Johnstone R. **Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.** Nat Rev Drug Discov. 2006, 9; 769-84.
11. Brueckner B, Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem H, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F. **Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases.** Cancer Res. 2005, 14; 6305-11.
12. Cameron E, Bachman K, Myohanen S, Herman J, Baylin S. **Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re- expression of genes silenced in cancer.** Nat Genet. 1999, 21; 103-7.
13. Cervoni N. and Szyf M. **Demethylase activity is directed by histone acetylation.** J Biol Chem. 2001, 276; 40778-87.
14. Cheng J, Matsen C, Gonzales F, Ye W, Greer S, Marquez V, Jones P, Selker E. **Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine.** J Natl Cancer Inst. 2003, 5; 399-409.

15. Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, Richardson B. **Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity.** *J Immunol.* 1988, 140; 2197-200.
16. Chun D, Qianjin L, Zhiyong Z, Tharaknath R, John A, Raymond Y, Bruce R. **Hydralazine May Induce Autoimmunity by Inhibiting Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Signaling.** *Arthritis Rheum.* 2003, 48; 746-756.
17. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P. **Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.** *Nature.* 2004, 429; 457-63.
18. Ehrlich M, Gama-Sosa M, Huang L, Midgett R, Kuo K, McCune R, Gehrke C. **Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.** *Nucleic Acids Res.* 1982, 10; 2709-2721.
19. Ehrlich M, Wang RY. **5-Methylcytosine in eukaryotic DNA.** *Science.* 1981, 450; 135-137.
20. Esteller M, Silva J, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin S, Herman J. **Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.** *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92; 564-569.
21. Fang M, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang C. **Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines.** *Cancer Res.* 2003, 63; 7563-7570.
22. Fraga M, Rodríguez R, Canal J. **Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis.** *Electrophoresis.* 2000, 21; 2990-2994.
23. Gius D, Cui H, Bradbury C, Cook J, Smart D, Zhao S, Young L, Brandenburg S, Hu Y, Bisht S, Ho A, Mattson D, Sun L, Munson P, Chuang E, Mitchell J,

- Feinberg A. **Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach.** *Cancer Cell.* 2004, 6; 361-71.
24. Graff J, Herman J, Lapidus R, Chopra H, Xu R, Jarrard D, Isaacs W, Pitha P, Davidson N, Baylin S. **E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas.** *Cancer Res.* 1995, 55; 5195-5199.
25. Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. **Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.** *Hum Genet.* 1989, 83;155-8.
26. Guochang H, Hao L, Aijun H, Dominic C, Sathivel P, Ke G, Chengchen L, Qi Z, Xinmin C. **Grim 19 a cell death regulatory pretein is essential for assembly and function of mitochondrial complex 1.** *Mol Cell Biol.* 2004, 24; 8447-56.
27. Herman J, Graff J, Myohanen S, Nelkin B, Baylin S. **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93; 9821–9826.
28. Herman J, Latif F, Weng Y, Lerman M, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan D, Gnarr J, Linehan W, Baylin S. **Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 21; 9700-4.
29. Herranz M, Esteller M. **New therapeutic targets in cancer: the epigenetic connection.** *Clin Transl Oncol.* 2006, 4; 242-9.
30. Jones P, Veenstra G, Wade P, Vermaak D, Kass S, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe A. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** *Nature. Genetics.* 1998,19; 187-191.

31. Kalakonda S, Nallar S, Lindner D, Hu J, Reddy S, Kalvakolanu D. **Tumor-Suppressive Activity of the Cell Death Activator GRIM-19 on a Constitutively Active Signal Transducer and Activator of Transcription 3** Cancer Res. 2007,13; 6212-20.
32. Kaminskias E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R; FDA. **Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes** Clin Cancer Res. 2005, 11; 3604–3608.
33. Kane M, Loda M, Gaida G, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup J, Kolodner R. **Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.** Cancer Res. 1997, 57; 808-811.
34. Klose R, Bird A. **Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.** Trends Biochem Sci. 2006, 31; 89-97.
35. Kramer O, Zhu P, Ostendorff H, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters M, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M. **The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2.** EMBO J. 2003, 22; 3411-3420.
36. Lee P, Fitzpatrick D, Beard C, Jessup H, Lehar S, Makar S, Tsai J, Tucker S, Weaver W.M., Kelso A., K.W., Perez-Melgosa M., Sweetser M.T., Schlissel M.S., Nguyen S., Jaenisch R. and Wilson C. **A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival.** Immunity. 2001,15; 763-774.
37. Li L, Dahiya R. **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** Bioinformatics. 2002, 18; 1427-31.
38. Li, E., Beard, C, Jaenisch, R. **Role for DNA methylation in genomic imprinting.** Nature. 1993, 366; 362-365.

39. Ling C, Poulsen P, Simonsson S, Rönn T, Holmkvist J, Almgren P, Hagert P, Nilsson E, Mabey AG, Nilsson P, Vaag A, Groop L. **Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUFB6 in human skeletal muscle.** J Clin Invest. 2007, 117; 3427-3435.
40. Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall G. **Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents.** Cancer Treat Res. 2006, 32; 157-165.
41. Lufe C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong C, X. Cao X. **GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction.** EMBO J. 2003, 22; 1325-1335.
42. Ma X, Kalakonda S, Srinivasula S, Reddy S, Plataniias L, Kalvakolanu D. **GRIM-19 associates with the serine protease HtrA2 for promoting cell death.** Oncogene. 2007, 33; 4842-9.
43. Malone C, Miner M, Doerr J, Jackson J, Jacobsen S, Wall B, Teitell M. **CmC (A/T)GG DNA methylation in mature cell lymphoma gene silencing.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98;10404-10409.
44. Merlo A, Herman J, Mao L, Lee D, Gabrielson E, Burger P, Baylin S, Sidransky D. **5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers.** Nat. Med.1995, 1; 686-692.
45. Migeon B. **Insights into X chromosome inactivation from studies of species variation, DNA methylation and replication, and vice versa.** Genet Res. 1990, 56; 91-98.
46. Phiel C, Zhang F, Huang E, Guenther M, Lazar M, Klein P. **Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen.** J Biol Chem. 2001, 276; 36734-36741.

47. Primeau M, Gagnon J, Momparler R. **Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells.** *Int J Cancer.* 2003, 10; 177-84.
48. Rong L, Xia W, Zhao-Fei C, Dang S, Xiao T and Jing F. **Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells.** *J Biol Chem.* 2007, 282; 12249-12259.
49. Samlowski W, Leachman S, Wade M, Cassidy P, Porter-Gill P, Busby L, Wheeler R, Boucher K, Fitzpatrick F, Jones DA, Karpf AR. **Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation.** *J Clin Oncol.* 2005, 17; 3897-3905.
50. Sandoval K, Revilla A, Segura B, Dueñas A. **Determination of 5-methylcytosine and cytosine in tumor DNA samples of cancer patients.** *Electrophoresis.* 2005, 26; 1057–1062.
51. Segura B, Trejo C, Pérez E, Taja L, Mariscal I, Chavez A, Acuna C, Salazar AM, Lizano M, Dueñas A. **Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy.** *Clin Cancer Res.* 2003, 9; 1596-1603.
52. Snezana M, Ana D'Alessio, Nancy D and Moshe S. **Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes.** *Carcinogenesis.* 2006, 28; 560-571.
53. Stewart D, Donehower R, Eisenhauer E, Wainman N, Shah A, Bonfils C, MacLeod A, Besterman J, Reid GK. **A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly.** *Ann Oncol.* 2003, 14; 766–774.

54. Wei-Guo Z, Lakshmanan R, Beal M, Otterson A. **DNA Methyltransferase Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors** Cancer Research. 2001, 61; 1327–1333.
55. Wolffe A, Matzke M. **Epigenetics: regulation through repression.** Science 1999, 286; 481-6.
56. Yang X, Phillips D, Ferguson A, Nelson W, Herman J, Davidson N. **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. 2001, 19; 7025-9.
57. Zambrano P, Segura B, Pérez E, Cetina L, Revilla A, Taja L, Chávez A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo C, Chanona J, Dueñas A. **A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes.** BMC Cancer. 2005, 5; 44
58. Zhu W, Otterson G. **The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells.** Curr Med Chem Anticancer Agents. 2003, 3;187-99.