



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

Cambios epigenéticos de los genes implicados en el transporte y activación del antimetabolito gemcitabina, como mecanismo de resistencia en cáncer cervicouterino.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE: DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS

PRESENTA:

MYRNA GLORIA CANDELARIA HERNANDEZ.

ASESOR: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ.

FEBRERO 2012



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.

INDICE:

Antecedentes	1
Justificación del proyecto e impacto	19
Hipótesis	21
Objetivos	22
Material y métodos	23
Resultados	36
Discusión	51
Referencias	58

RESUMEN

ANTECEDENTES: El cáncer cérvicouterino es una de las primeras causas de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. De acuerdo con el Globocan, en el año 2008 se registraron 530,232 casos nuevos y fallecieron 275,008 pacientes; ocupó el segundo lugar en frecuencia, con una tasa de incidencia de $15.3 \times 100,00$ habitantes y de mortalidad de $7.8 \times 100,000$ habitantes. Gemcitabina es un agente útil para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino: permite el manejo de las pacientes con insuficiencia renal; en enfermedad loco-regional incrementa la supervivencia global y la tasa de respuesta, al añadirse a quimioterapia. El silenciamiento de genes responsables del transporte y activación metabólica de gemcitabina se asocian a resistencia a este antimetabolito. El objetivo de este proyecto fue evaluar los mecanismos de regulación epigenética implicados en el desarrollo de resistencia a gemcitabina.

METODOLOGIA: Se indujo resistencia a gemcitabina en la línea celular Calo, con la exposición a dosis crecientes de gemcitabina. Se evaluó el estado de metilación de las regiones promotoras de los genes hENT1 y dCK, así como cambios en la actividad de desacetilasas de histonas y marcas permisivas y represivas en el código de histonas.

RESULTADOS: Se documentó silenciamiento de los genes hENT1 y dCK en la línea celular resistente a gemcitabina. Este silenciamiento no se asoció a metilación del promotor. El tratamiento con hidralazina revirtió la resistencia a gemcitabina y la re-expresión de estos genes. No se documentaron cambios significativos en la actividad de la desacetilasa de histonas, ni en los niveles de acetilación de H3 y H4. El análisis por inmunoprecipitación de cromatina mostró incremento en la marca H3K9me2 en las regiones promotoras de estos genes, que correlacionaron con hiper-expresión de la metilasa de histonas G9A. Así mismo, la hidralazina inhibió la actividad de metiltransferasa de G9A in vitro y la inhibición de este gen a través de iRNA contra G9a revirtió la resistencia a gemcitabina.

CONCLUSIONES: Estos resultados demuestran que la resistencia adquirida a gemcitabina se asocia a disminución en la expresión de hENT1 y dCK; esto se encuentra regulado por un mecanismo independiente de metilación del DNA y se asocia a hiperexpresión de la metiltransferasa G9A. La hidralazina revierte la resistencia a gemcitabina en la línea celular CaLo a través de inhibir a la metiltransferas de histonas G9A.

ANTECEDENTES.

I. Cáncer cervicouterino.

El cáncer cérvicouterino es una de las primeras causas de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. De acuerdo con el Globocan, en el año 2008 se registraron 530,232 casos nuevos y fallecieron 275,008 pacientes; ocupó el segundo lugar en frecuencia, con una tasa de incidencia de 15.3 x 100,00 habitantes y de mortalidad de 7.8 x 100,000 habitantes (Globocan,2008). De acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, el cáncer cérvicouterino invasor se clasifica en 4 etapas, I, II, III y IV, como se señala en la siguiente tabla (AJCC, 2010):

Tumor primario (T):

I Carcinoma cervical confinado al útero (sin extensión al cuerpo).

- | | |
|----|---|
| IA | Carcinoma invasor con invasión al estroma no mayor a 5 mm, medidos a partir de la base del epitelio y extensión horizontal de 7 mm o menor.
IA1: La invasión medida en el estroma no supera los 3 mm de profundidad y 7 mm de diámetro.
IA2: La invasión del estroma está entre 3 y 5 mm de Profundidad y no supera 7 mm de diámetro. |
| IB | Clínicamente visible, confinado al cérvix o con extensión mayor al IA. Toda lesión macroscópicamente visible incluso con una invasión superficial es un cáncer de estadio IB. |

IB1: Lesiones clínicas de tamaño máximo de 4 cm.

IB2: Lesiones clínicas de tamaño superior a 4 cm.

- II Carcinoma cervical con invasión al útero, sin extensión a la pared pélvica o al tercio inferior de vagina.
 - IIA Sin invasión de parametrios. La invasión afecta los dos Tercios superiores de la vagina.

IIA1: Lesión clínicamente visible, hasta de 4 cm. en su diámetro mayor.
II A 2: Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm. en su diámetro mayor.
 - IIB Con invasión de parametrios, pero la pared de la pelvis no está afectada.
- III El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina, y/o produce hidronefrosis o riñón no funcional.
 - IIIA Involucra el tercio inferior de vagina, sin extensión a la pared pélvica.
 - IIIB Extensión a la pared pélvica y/o hidronefrosis, o riñón no funcional.
 - IVA El tumor invade la mucosa de la vejiga o recto, y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
 - IV B Extensión a órganos distantes.

La etapa I se trata con cirugía o procedimientos locales con lo cual la mayoría se cura, sin embargo, las etapas (II-IV) también llamadas localmente avanzadas son las más frecuentes y se tratan con quimio-radioterapia. La adición de quimioterapia concomitante a la radioterapia estándar incrementó en 10 y 13 % la

supervivencia global y libre de enfermedad, respectivamente a 5 años, por lo que en la actualidad se considera que la administración concomitante de quimio-radioterapia basada en cisplatino es el tratamiento estándar del cáncer cérvicouterino localmente avanzado [Dueñas-González, 2010].

II. Farmacología de Gemcitabina.

La gemcitabina (2',2'-difluoro 2'deoxyctidine, dFdC) es un análogo del arabinósido de citosina, del que difiere estructuralmente por la presencia de dos derivados fluorinados en la posición 2' del anillo de la pentosa y ello le confiere propiedades farmacológicas distintas [Burris HA,1997; Sandler AB,2000; von der Maase H,2000; Cetina, 2004; Mini E, 2006; Gligorov J,2007; Candelaria, 2007b; Kaykaki A, 2008; Zucali PA, 2008; Dueñas-Gonzalez, 2010]. Inicialmente, la gemcitabina demostró ser un agente terapéutico eficaz en diferentes líneas celulares de tumores sólidos y hematológicos, así como también en modelos murinos in vivo y en xenoinjertos de tumores humanos en ratones desnudos. Así mismo, este antimetabolito ha demostrado eficacia clínica en diferentes tumores, incluyendo el cáncer de páncreas [Burris,1997], cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [Sandler,2000], de vejiga [von der Masse, 2000], mama [Gligorov, 2007], ovario [Kalykaki A, 2008], cabeza y cuello, mesotelioma [Zucali PA,2008], y cáncer cervical [Cetina, 2004, Candelaria, 2007b]. El papel de la gemcitabina en el tratamiento del cancer cervicouterino está demostrado: permite la administración de radioterapia en pacientes con enfermedad loco-regional e insuficiencia renal [Candelaria,2006a; Candelaria,2007b], y en adición a la

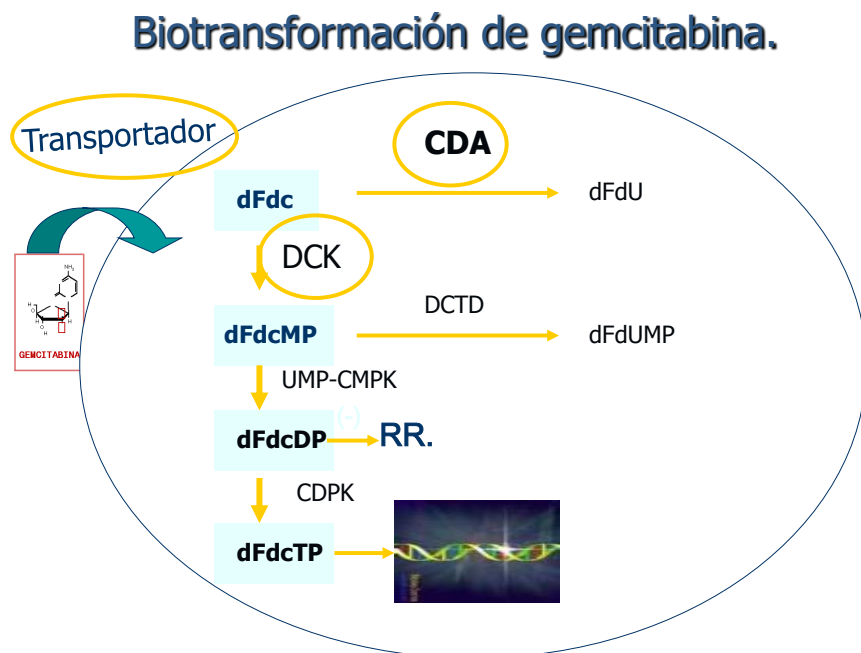
administración concomitante con quimio-radioterapia basada en cis-platino incrementa la tasa de respuesta patológica, lo que tiene un claro impacto en incrementar la supervivencia global [Candelaria 2006b] . Así mismo, un estudio prospectivo, aleatorio multicéntrico demostró que la adición de gemcitabina al tratamiento combinado de quimio-radioterapia con cisplatino, seguido de quimioterapia incrementa la supervivencia libre de progresión de 65 % a 74.4 % y la supervivencia global de 69 % a 77 % [Dueñas-González, 2011]. Lo anterior demuestra la utilidad de este antimetabolito en el manejo del cáncer cervical.

Las características farmacológicas de la gemcitabina son únicas, debido a que dos grupos de genes son esenciales para permitir su efecto antitumoral: genes que codifican para transportadores de membrana, cuyos productos son responsables del ingreso de este pro-fármaco al interior de la célula y genes que codifican enzimas, las cuales catalizan su activación e inactivación. Así, parece claro que la regulación de estos genes puede afectar la respuesta tumoral a este fármaco [Mini E, 2006; Candelaria, 2009].

La gemcitabina es un pro-fármaco que requiere de transportarse al interior de la célula por los transportadores de nucleósidos y subsecuente fosforilación intracelular por la deoxicitidina kinasa (dCK), para formar el derivado monofosfato (dFdCMP), el cual se convierte a los metabolitos di- y trifosforilados (dFdCDP y dFdCTP, respectivamente). La citidina deaminasa (CDA) cataliza la degradación

de gemcitabina. La actividad antiproliferativa de gemcitabina se atribuye a diferentes acciones de inhibición en la síntesis del DNA [Burris HA,1997; Sandler AB, 2000; Mini E, 2006]: el metabolito trifosforilado (dFdCTP) inhibe a la DNA polimerasa [Gandhi V, 1990] y también se incorpora al DNA. Después de su incorporación, por la DNA polimerasa en la cadena de DNA, hace que pare la elongación de la cadena [Huang P,1991]. La posición del dFdCTP en la cadena de DNA evita la detección y reparación del DNA [Gandhi V, 1996]. El metabolito difosforilado (dFdCDP) es un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RR) [Heinemann V,1990], y también disminuye el pool de deoxi-ribonucleótidos necesarios para la síntesis del DNA. Otros mecanismos de los metabolitos de la gemcitabina incluyen la inhibición de la citidina trifosfato sintetasa (CTP sintetasa) y la inhibición de la deoxicitidilato deaminasa (dCMP deaminasa) por el metabolito trifosforilado (dFdCTP) [Heinemann V, 1992]. Además, se ha señalado que este último metabolito se incorpora al RNA, aunque el mecanismo no está identificado. Estos proceso de biotransformación de gemcitabina se ilustran en la siguiente figura:

Figura 1: Transporte y biotransformación de gemcitabina.



Los mecanismos descritos en la actualidad, implicados en la resistencia a gemcitabina son los siguientes: 1) disminución en la expresión de la enzima deoxicitidina kinasa, que se encarga de la fosforilación inicial y activación de gemcitabina; 2) aumento en la actividad de enzimas encargadas del catabolismo de gemcitabina: citidina deaminasa y deoxicitidina mono-fosfato (dCMP) deaminasa; 3) disminución del transporte de nucleósidos al interior de las células; 4) competencia con nucleótidos fisiológicos trifosforilados (dCTP), a través de un aumento en la expresión de citidina trifosfato (CTP) sintetasa. [Kang SP,2008; Xu X, 2011].

Transportadores de nucleósidos.

Los transportadores de nucleósidos se dividen en dos grupos mayores y diferentes subclases, con base en la especificidad del sustrato, uso de co-transportadores de cationes y la sensibilidad a inhibidores farmacológicos.

Los transportadores de nucleósidos (ENT, SLC29) trabajan principalmente por difusión facilitada. Los transportadores concentrativos (CNT, SLC28) transportan nucleósidos con el co-transporte de un catión a favor de un gradiente de concentración [Huang Y, 2007, Guzman-Gutiérrez E, 2010; Paproski RJ, 2010].

Los transportadores de nucleósidos equilibrativos se expresan de manera ubícua. Existen cuatro subtipos humanos de (h)ENT, hENT1, -2, -3, and -4. El gen de *hENT1* se localiza en el cromosoma 6p21.1-21.2; el gen *hENT2* en 11q12.1; la localización de *hENT3* está en *hENT3* 10q22.1 y *hENT4* se localiza en 7p11.2. El inhibidor nitrobenzil mercaptopurina-ribonucleósido (NBMPR) distingue funcionalmente a hENT1, mientras que hENT2 no es sensible a NBMPR [Kong W, 2004].

El principal transportador de gemcitabina es hENT1. Se ha demostrado una correlación clínica entre la sensibilidad a análogos de nucleósidos y la expresión de este transportador [Gati WP, 1997; Achiwa H, 2004; Mine E, 2006]. Así mismo, las células deficientes de hENT1 son resistentes a análogos de nucleósidos [Griffiths 1997; Barnes K, 2006; Lane J, 2010].

La importancia de la expresión del gen de hENT1 y su relación con la sensibilidad a gemcitabina se ha demostrado en diferentes entidades, tales como cáncer de páncreas, [Spratlin J, 2004; Giovanetti E, 2006a; Giovanetti E, 2006b], cáncer de mama [Mackey JR, 2002], y cáncer de pulmón [Oguri T, 2007]. La evaluación por inmunohistoquímica (IHC) en el tejido de 21 pacientes con cáncer de páncreas avanzado demostró que la expresión detectable de hENT1 se asoció significativamente con un incremento en la mediana de supervivencia, en comparación con aquéllos en los que hENT1 estuvo ausente y/o con expresión débil (13 vs. 4 meses; $p = 0.01$) [Oguri T, 2007]. Otros autores demostraron resultados similares en 83 pacientes con cáncer de páncreas, en quienes la supervivencia global fue mayor en los pacientes con mayor expresión de hENT1, en comparación con niveles bajos de hENT1 (mediana, 25.7; 95% intervalo de confianza [95% CI], 17.6 a 33.7 meses, en comparación con una mediana de 8.5; 95% CI, 7.0 a 9.9 meses); el significado pronóstico de la expresión de hENT1 se confirmó por análisis multivariado [Giovanetti E, 2006b]. Así mismo, otros autores [Tanaka M, 2010] demostraron en 149 pacientes con cáncer de páncreas que la disminución de la función del transportador hENT1 se asoció a menor respuesta a quimio-radioterapia con gemcitabina. De igual forma, la disminución en los niveles de expresión de hENT1 por inmunohistoquímica correlacionó con el tiempo a la progresión (6.33 meses, en comparación con 2.83 meses) en pacientes con cáncer de vías biliares tratados con gemcitabina [Santini D, 2011]. La importancia de la expresión de hENT1 también se ha demostrado en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Oguri y cols. [Oguri T, 2007] demostraron que la

ausencia de este transportador de nucleósidos (por IHC) se asoció con ausencia de respuesta a quimioterapia con gemcitabina.

Debido a que la expresión relativa de hENTs, y en particular de hENT1 correlaciona con la eficacia de gemcitabina, se requiere de un mayor entendimiento de los genes hENT y en particular, de su regulación transcripcional.

Enzimas que participan en la biotransformación de gemcitabina:

a) Deoxicitidina kinasa.

Por otra parte, la expresión de dCK también se ha asociado con la sensibilidad a gemcitabina. Se ha demostrado en líneas celulares que la inactivación de dCK por mutaciones se asocia a resistencia a análogos de nucleósidos [Tanaka M, 2010]. Kroep y cols [Kroep JR, 2002] demostraron una relación directa entre los niveles de la proteína dCK y actividad enzimática, así como también una relación entre la actividad de dCK y la respuesta tumoral en modelos murinos. La importancia de esta enzima en la sensibilidad a gemcitabina se ha confirmado por otros autores, quienes reportan que la transfección de dCK produce resensibilización de las células a citarabina y gemcitabina [Manome Y, 1996; Sebastiani V, 2006; Funamizu N, 2010].

Sebastiani y cols [Sebastiani V, 2006] informaron en pacientes con cáncer de páncreas, que la expresión baja de dCK se asocia con menor supervivencia global

(14.6, en comparación con 21.7 meses; $p < 0.04$) aún después de ajustar con otros factores de respuesta clínica; estos resultados son consistentes con los de otros grupos de investigación [Galmarini CM, 2004]. Así mismo, los niveles de expresión de dCK son un factor pronóstico independiente que influye en la supervivencia libre de enfermedad y global, en pacientes con cáncer de páncreas resecado que reciben tratamiento adyuvante con quimio-radioterapia, basada en gemcitabina [Marechal R, 2010].

b) Ribonucleótido reductasa.

El metabolito difosforilado de la gemcitabina es un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa, enzima clave para la síntesis intracelular de deoxinucleótidos trifosforilados y cataliza su reducción a nucleósidos difosforilados. Esta enzima, en su forma activa está constituida por un heterotetramero, compuesto de dos homodímeros no idénticos. La subunidad mayor (RRM1) contiene el sitio de unión al sustrato y el sitio catalítico, así como los sitios efectores alostéricos, mientras que la subunidad pequeña (RRM2) tiene un sitio di-férrico y un radical tirosilo, esenciales para la catálisis.

La hiperexpresión de las subunidades RRM1 y RRM2 se han asociado con resistencia a gemcitabina [Jordheim LP, 2005; Boukovinas I, 2008]. La hiperexpresión de RRM1 en líneas celulares de cáncer, así como en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se asocian a pobre respuesta a la quimioterapia combinada con gemcitabina y cisplatino [Rosell R, 2004]. Así

mismo, un aumento en la expresión de mRNA de RRM1 y RRM2 se ha asociado con menor respuesta a gemcitabina y taxanos en pacientes con cáncer de pulmón [Rosell R, 2004; Boukovinas I, 2008; Souglakos J, 2008]. En contraste con estos resultados, otros autores [Sebastiani V, 2006; Tanaka M, 2010; Santini D, 2011] no han demostrado una relación entre la expresión de ribonucleótido reductasa y la sensibilidad a gemcitabina. Por otra parte, se ha reportado una tendencia a la quimiosensibilidad a gemcitabina y la presencia del polimorfismo RRM1 2462G>A en múltiples líneas celulares [Kwon WS, 2006].

c) Citidina Deaminasa y 5'Nucleotidasa.

La enzima citidin deaminasa (CDA) cataliza la deaminación de la deoxi-citidin citidina y análogos. Las nucleotidasas defosforilan los análogos de nucleósidos y su papel en la resistencia a fármacos es aún controversial [Chabner BA, 1974; Galmarini CM, 2004].

La enzima CDA se ha asociado con resistencia a citarabina y gemcitabina en casos aislados [Yonemori K, 2005; Gilbert JA, 2006], que evaluaron la toxicidad secundaria a gemcitabina, en relación con la presencia de polimorfismos de nucleótidos aislados. Por otra parte, Kroep y cols [Kroep JR, 2002] demostraron que los niveles de CDA no tienen valor pronóstico, así como tampoco la relación en la actividad de las enzimas dCK/CDA no influyen en la sensibilidad a gemcitabina. Así mismo, se han secuenciado 17 polimorfismos, incluyendo uno no sinónimo: cSNA, 79 A>C (Lys27Gln), el cual tuvo el 66 ± 5.1 (promedio \pm DS) de actividad, en comparación con la enzima silvestre y éste no se asoció con

diferencias en la sensibilidad a gemcitabina [Yonemori K, 2005]. La variación en los niveles de CDA entre diferentes tipos tumorales puede explicar la razón de que los niveles de CDA no sean un factor pronóstico para la respuesta a gemcitabina [Gilbert JA, 2006].

La actividad de 5'nucleotidasa también se ha asociado con la resistencia a antimetabolitos. Aún cuando la relación de las enzimas dCK/5'NT se ha asociado con resistencia a cladribina, no se ha demostrado resistencia cruzada a gemcitabina en la línea celular LH60 [Schirmer M, 1998]. Por el contrario, otros autores demostraron que los niveles de expresión de cN-II nucleotidasa pueden identificar a subgrupos de pacientes con cáncer de pulmón con diferente evolución, al tratarse con gemcitabina, pero se requiere de mayores estudios prospectivos para confirmar el valor predictivo de cN-II en estos pacientes [Seve P, 2005].

III. Epigenética y cáncer.

Las modificaciones epigenéticas afectan la expresión génica, principalmente por dos mecanismos: metilación de islas CpG en el DNA genómico y modificaciones en los residuos de lisinas e histidinas de las histonas [Sparmann A, 2006].

La metilación de los residuos de citocinas en las islas CpG silencia al promotor al impedir o dificultar la acción de factores de transcripción y la interacción con los

complejos de RNA polimerasa II. En la actualidad se conocen cuatro tipos de DNA metiltransferasas (DNMT): DNMT1, -3a, -3b, -3L [Chen T, 2004].

Las modificaciones postransduccionales (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otras) de las histonas H3 y H4 ocurren en los extremos amino terminales de residuos de lisina [Smith BC, 2009]. Las histonas son el componente proteico del nucleosoma sobre las cuales se enrolla el DNA. Los nucleosomas son la unidad básica de la estructura de la cromatina y están compuestos por un octámero de histonas acoplados a 147 pares de bases del DNA. Cada octámero de histonas contiene dos copias de las histonas H2A, -2B, -3, and -4 [Rice JC, 2001]. La acetilación de los residuos de lisina en las histonas H3 y H4 reduce su interacción con el DNA en el nucleosoma, lo cual permite el acceso de factores de transcripción al DNA [Thiriet C, 1998]. El proceso de acetilación de residuos de lisina se realiza por las histona-acetil transferasas (HATs) [Rice JC, 2001], por otra parte las deacetilasas de histonas (HDAC's) remueven grupos acetilo de los residuos de lisina [Rice JC, 2001]. De manera opuesta, la metilación de las colas de histonas aumenta la afinidad de unión del DNA al nucleosoma, lo cual produce una asociación estrecha entre los nucleosomas y el DNA genómico que confiere una configuración no permisiva para la expresión génica [Schotta M, 2004]. Por otra parte, las metil transferasas de histonas (HMT) no suprimen la transcripción en todos los casos, de hecho tienen efectos diferenciales en la expresión génica, en función del sitio de residuo de lisina metilado [Rice JC, 2001]. Como ejemplo, la metilación H3K4 se asocia a activación de la transcripción [Thiriet C, 1998] mientras que la metilación de la lisina 9 (H3K9) y/o de la lisina 27 (H3K27) de la

histona 3 se asocia a supresión de la actividad transcripcional. En particular, la metil-transferasa de histonas EZH2, que trimetila H3K27 (Enhancer de Zeste-homolog 2), y pertenece al grupo de proteínas Polycomb, interactúa con las DNMT's y es esencial para la metilación del DNA en los promotores para los cuales EZH2 es blanco, lo cual sugiere una acción directa entre la represión génica a través de proteínas del grupo Polycomb y la metilación del DNA [Cao R, 2002; Simon JA, 2008; Zhou X, 2008]. Las HMT también pueden desmetilar activamente y afectar la expresión génica. Se han identificado dos familias de desmetilasas de histonas: KDM1 (antes llamada LSD1) y las enzimas con dominio JmC [Zhou X, 2008].

Recientemente se ha descrito la importancia de mecanismos epigenéticos en el silenciamiento de genes relacionados con el transporte de sustratos, tales como el gen *ABCG2* y el *Transportador Aniónico orgánico Humano 3* [Kikuchi R, 2006]. La evaluación *in vitro* del estado de metilación de tres líneas de carcinoma renal demostró que metilación del promotor de UOK121 y UOK-143 se asoció con proteínas con dominio de unión a CpG (MBDs), tales como MBD2 y MeCP2. La desacetilasa de histonas 1 y el co-represor mSin3A se unen a la región del promotor que contiene islas CpG, así suprime la transcripción de *ABCG2*. El tratamiento *in vitro* con el desmetilante de DNA decitabina reactiva la expresión de *ABCG2*, de manera conjunta con la liberación de MBDs del promotor. Aún más, la asociación de H3K9 metilada, un marcador de metilación del promotor reduce con el tratamiento con decitabina [Kastrup IB, 2008]. Otros autores [Worm J, 2001] también han demostrado que la actividad del promotor de transportadores de

membrana, como hOAT3 se reprime in vitro por metilación del DNA y que el tratamiento con el desmetilante azacitidina, de forma concentración dependiente, aumenta la expresión del mRNA de *SLC22A8*, lo que sugiere que factores epigenéticos pueden tener un papel importante en la regulación de la expresión del gen *SLC22A8*.

Se ha informado que el miembro 8 de la familia de transportadores de solutos 5 (transportador del gen *SLC5A8*) también se silencia por metilación del promotor en carcinomas pancreáticos y de próstata y que el tratamiento con inhibidores de la metilación re-establecen su expresión [Park JY, 2008]. También se ha demostrado la regulación epigenética de otros transportadores. La hipermetilación aberrante del acarreador reducido de folatos (*RFC*) se asocia con resistencia a metotrexate en líneas celulares, osteosarcomas primarios, padecimientos linfoproliferativos [Shutoh M, 2005] y cáncer de mama [Worm J, 2001]. Así mismo, se ha demostrado reactivación de la proteína 1 de unión celular al retinol en cáncer gástrico [Shutoh M, 2005], así como del gen para el *sym transportador Na⁺/I⁻* en células de cáncer de tiroides, lo que re-establece su capacidad para la captura de yodo [Kastrup IB, 2008; Provenzano MJ, 2007].

El promotor de *hENT1* es rico en islas CpG, lo cual aunado a la localización ubícua de este transportador, sugirió inicialmente se tratara de un gen constitutivo [Abdulla P, 2007]. Sin embargo, la presencia de un sólo sitio de inicio de la transcripción, localizado río debajo de la caja TATA con variaciones temporales en la expresión sugieren que pareciera estar sujeto a una regulación transcripcional

y/o post-transcripcional. Así mismo, se han identificado diferentes secuencias relacionadas con factores de transcripción dentro del promotor, tales como ERE, MAZ, Sp1, AP.2, myogenin, IRF-2, CREB, y PTF-B. P. Adicionalmente, no se han encontrado regiones conservadas en el promotor dentro de otros genes hENT (*hENT2*, -3, y -4/*PMAT*), lo que sugiere que el promotor de cada gen humano tiene características únicas y solamente se ha demostrado una conservación en la secuencia entre *hENT1* y *mENT1* [Choi DS, 2000]. Aún cuando la ausencia de expresión de transportadores de nucleósidos, particularmente hENT1 en diferentes tumores se ha asociado a pobre respuesta clínica a antimetabolitos, como gemcitabina [Mackey JR, 2002; Spratlin J, 2004; Giovanetti E, 2006a; Giovanetti E, 2006b; Oguri T, 2007], no se han descrito mecanismos de silenciamiento en los genes asociados a resistencia a gemcitabina. No se ha descrito si la regulación epigenética controla la expresión de hENT1 a través de metilación del promotor, o si este control está influido por otros mecanismos y esto constituye un campo de investigación.

También se han explorado los factores que influyen en la función y regulación transcripcional del gen que codifica para la enzima deoxi-citidin kinasa. El análisis funcional del promotor de *dCK* demuestra que éste es rico en islas CpG y carece de caja TATA, pero tiene sitios de unión a SP1 en dos cajas GC y a USF en una caja-E, que son críticos para la actividad del promotor en cultivos de linfoblastos [Chen E, 1995]. Con base en estos resultados, otros autores [GE Y, 2003; Al-Madhoun AS, 2004] confirmaron que las dos cajas GC (denominadas GCa y GCb) y el elemento de caja-E son regiones reguladoras importantes: las cajas

GCa y -E son activadoras, en tanto que la caja GCb es represiva; también demostraron un efecto sinérgico de Sp1 y USF2a en la actividad del promotor del gen *dCK*. Adicionalmente, Antonsson [Antonsson BE, 1987] demostró un incremento hasta del 37 % en la actividad de *dCK* después de tratar líneas celulares linfoides humanas con 5,6-dihidro-5-azacitidina, lo cual sugiere un control epigenético implicado en el silenciamiento del gen *dCK* durante el desarrollo de resistencia a gemcitabina.

Recientemente, Peters y cols describieron que la metilación de la caja 3'GC, que constituye el sitio de unión a SP1, en la región promotora de *dCK* puede afectar la expresión [Peters GJ, 2010] de *dCK*. Lo anterior hace necesario un mayor entendimiento de los reguladores de la expresión del gen *dCK* que permita desarrollar potenciales aplicaciones terapéuticas para optimizar el tratamiento combinado con análogos de nucleósidos.

El papel de las enzimas ribonucleótido reductasa (RR) y citidina-deaminasa (CDA) en el desarrollo de resistencia a gemcitabina es controversial y la hiperexpresión de ambas se ha asociado a resistencia a este antimetabolito. Es importante investigar si la expresión de RR y/o CDA se asocia con hipometilación del DNA, hiperacetilación de histonas o metilación de lisinas en sitios específicos que favorezcan su transcripción. Existe evidencia que el tratamiento con 5-aza-2'-deoxycitidina, un inhibidor de la metilación del DNA, incrementa la actividad de CDA en la línea celular leucémica mieloide HL-60, y ello correlaciona con inducción a diferenciación. Sin embargo, no se conoce si el incremento en esta actividad se debe a la desmetilación del promotor o está relacionada con otros

mecanismos epigenéticos [Smid K, 2006; Abajo A, 2010; Zu X, 2011; Ciccolini J, 2011].

JUSTIFICACION DEL PROYECTO E IMPACTO.

Los resultados con el tratamiento actual del cáncer cérvico-uterino distan de ser satisfactorios. Recientemente, se ha demostrado la utilidad de gemcitabina para el tratamiento de esta neoplasia en etapas localmente avanzadas y también en enfermedad metastásica.

Existe una relación entre la expresión de *hENT1* y *dCK* y la sensibilidad a gemcitabina en diferentes neoplasias. Así mismo se ha demostrado que los cambios epigenéticos son factores que influyen en la quimiosensibilidad de diferentes tumores y en la actualidad existen estudios clínicos que demuestran la eficacia de agentes desmetilantes, como la hidralazina, o decitabina en neoplasias resistentes a quimioterapia. Aún cuando la falta de expresión de *hENT1*, así como de *dCK* se ha asociado con pobre respuesta a antimetabolitos, tales como gemcitabina, [Manome Y, 1996; Kroep JR, 2002; Mackey JR, 2002; Galmarini CM, 2004; Spratlin J, 2004 Giovanetti E, 2006a; Giovanetti E, 2006b; ; Sebastini V, 2006; Oguri T, 2007; Tanaka M, 2010; Santini D, 2011; Funamizu N, 2010;], no se han descrito los mecanismos de silenciamiento de estos genes en el carcinoma cervico-uterino. Por lo anterior, es importante evaluar si algún(os) mecanismo(s) de regulación epigenética influyen en la expresión de estos genes y ello constituye el fundamento de este proyecto.

De demostrarse que la resistencia inducida por gemcitabina en cáncer cérvico-uterino es debida a cambios epigenéticos en los genes implicados en el transporte y/o activación de este fármaco, la terapia epigenética sería una opción de tratamiento para pacientes con neoplasias resistentes a gemcitabina.

HIPOTESIS:

Los cambios epigenéticos que silencian a los genes involucrados en el transporte (*hENT1*) o vías de activación de gemcitabina (*dCK*,) producen resistencia a gemcitabina y la reversión de estos cambios restituye la sensibilidad a este antimetabolito.

OBJETIVOS:

1. Evaluar la sensibilidad a gemcitabina en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.
2. Evaluar la expresión de los genes *hENT1*, *dCK*, *RRM1*, *RRM2* y *CDA* y su correlación con la sensibilidad a gemcitabina en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.
3. Inducir resistencia a gemcitabina en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, mediante el tratamiento con este antimetabolito.
4. Evaluar los cambios en la expresión de los genes *hENT1*, *dCK*, *RRM1*, *RRM2* y *CDA* en líneas celulares de cáncer cervicouterino resistentes a gemcitabina.
5. Investigar los mecanismos epigenéticos asociados a los cambios de expresión de los genes *hENT1* y *dCK* y la resistencia a gemcitabina
6. Demostrar la reversión de la resistencia a gemcitabina con agentes epigenéticos.

MATERIAL Y METODOS.

Cultivo celular.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de cáncer cérvico-uterino: HeLa, CaLo, SiHa and C33A. Se cultivaron en cajas de cultivo de 25 ml con DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), en incubadora, a 37°C, con atmósfera humedificada con 5 % CO₂.

Ensayos de citotoxicidad:

Se cultivaron 2×10^3 células en placas Falcon de 6 pozos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con 200 µl de medio (DMEM, suplementado con 10 % de SFB) con gemcitabina a concentraciones crecientes de 1×10^{-8} hasta 1×10^{-4} M durante 24 horas. Después de este tiempo, se removió el sobrenadante y se añadió DMEM suplementado con 5 % de SFB durante 72 hrs. Después de este tiempo se removió el sobrenadante y las células se fijaron con formol al 10 % y se tiñeron con cristal violeta. El producto final se analizó con un lector de ELISA a 570 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Se tomó como viabilidad del 100 % la absorbancia mostrada en las células sin exposición al fármaco. Estas curvas se realizaron por triplicado y se obtuvieron concentraciones inhibitorias, que se expresaron como promedio \pm DS

Inducción de resistencia a gemcitabina:

La línea celular CaLo se cultivó en cajas de cultivo de 25 ml con DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), en incubadora, a 37°C, con atmósfera humidificada con 5 % CO₂. La sensibilidad a gemcitabina se definió operacionalmente como tener una CI 50 < 100 µM. Una vez obtenidas las concentraciones inhibitorias 30 a 90, se añadieron dosis crecientes de gemcitabina (CI 30, CI 50, y finalmente CI 90, en dos ocasiones) semanalmente para inducir resistencia a este antimetabolito. Después de la exposición en dos ocasiones a la CI 90, se repitió el ensayo de citotoxicidad para confirmar la resistencia a gemcitabina.

Tratamiento con hidralazina y ácido valproico.

La línea celular CaLo resistente a hidralazina se cultivó en cajas de cultivo de 25 ml con DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), en incubadora, a 37°C, con atmósfera húmeda 5 % CO₂. Posteriormente se añadió hidralazina (H) en las siguientes concentraciones: durante 5 días 10 µM y 30 µM y durante 10 días 2 µM. Esta línea celular también fue tratada en las mismas condiciones, adicionando al medio ácido valproico (AV) a concentraciones de 0.24 mM y 1 mM durante 10 y 5 días, respectivamente. Así mismo, se utilizaron las siguientes combinaciones: H 2µM+ AV 0.24 mM durante 10 días; H 10 µM + AV 1 mM por 5 días y H 30µM + AV 1mM por 5 días.

Extracción de RNA.

El RNA se extrajo por el método de trizol. En resumen: en las cajas de cultivo se removió el material sobrenadante y se adicionó trizol; las células se removieron con un gendarme y se extrajeron con una pipeta estéril, se mantuvo en hielo. Posteriormente se añadió cloroformo, se agitó e incubó en hielo y se procedió a centrifugar. La fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente y se dejó evaporar el sobrenadante. El botón de RNA se resuspendió con agua tratada con DEPC, se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -80 °C.

Extracción de DNA.

El DNA genómico se extrajo por el método de proteinasa K. En resumen: al botón celular se añadió buffer de extracción de DNA y proteinasa K, se homogeneizó y se dejó precipitar a 55 °C. Posteriormente se añadió un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se centrifugó. Se recuperó la fase acuosa superior y se adicionó un volumen igual de cloroformo. Después de recuperar la fase acuosa, se precipitó con un volumen de isopropanol y NaCl 5M, se mezcló por inversión suave y se dejó precipitar a -20°C por 12 hrs. Se centrifugó y se decantó el sobrenadante. El botón de DNA se lavó con etanol y se centrifugó, para decantar el sobrenadante y también la evaporación del alcohol excedente. El DNA se resuspendió con TE; se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C.

RT-PCR.

Se aisló RNA por técnicas estándares. Después 5 µg de RNA se trataron con DNAsa. Se realizó la reacción de reversa transcriptasa con el siguiente kit: RNA kit PCR Core Gene Amp^R (Applied Biosystems Roche), en un ciclo en las siguientes condiciones: 15 min 42°C, 5 min a 99 °C, 5 min a 5°C.

Amplificación por PCR:

Se amplificaron fragmentos de los siguientes genes: *hENT1*, *dCK*, *RRM1*, *RRM2*, *CDA*, con los siguientes oligonucleótidos:

hENT1: SE: 5'GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA-3'

AS: 5'CCCAACCAGTCAAAGATATTG-3'

dCK: SE: 5'-CGATCTGTGTATAGTGACAG-3'

AS: 5'GTTGGTTTTTCAGTGTCTATG-3'

RRM1: SE: 5'-GCAGCTGAGAGAGGTGCTTT-3'

AS: 5'-CAGGATCCACACATCAGACA-3'

RRM2: SE: 5'-GAGTTCCTCACTGAGGCC-3'

AS: 5'-TTAGAAGTCAGCATCCAAG-3'

CDA: SE: 5'-GTTGCCTTGTTCCCTTGTA-3'

AS: 5'-TCTTGCTGCACTTCGGTATG-3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo cDNA, primers a 20 pmol, dNTPs 200 uM, Taq polimerasa 0.25U y buffer 1 x

suplementado por el fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas las reacciones se realizaron en las siguientes condiciones: paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 35 segundos, 59°C por 35 segundos, and 72°C por 45 segundos; la extensión final se realizó a 72°C por 7 min. Los productos finales se conservaron a 4°C

Se realizó RT-PCR antes y después de la inducción de resistencia a gemcitabina, así como también después del tratamiento con H, AV o ambos.

También se evaluó la expresión de G9A por RT-PCR cuantitativa (iCycler iQ, Bio-Rad, Hercules, CA), con los siguientes primers: Sentido: 5'-CTCCGCTGATTTTCGAGTGTA-3' y el antisentido: 5'-GTCGAAGAGGTAAGAATCATCC-3'. Se utilizó como control endógeno primers específicos para beta glucuronidasa humana (*GUSB*); sentido 5'-CCTGTGACCTTCTGAGCAA-3' y antisentido 5'-AAACCCTGCAATGGTTTCTG-3'. La reacción de PCR inició después de una incubación a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos, a 94 °C, 35 segundos, a 59 °C, 50 segundos, y 72 °C por 45 segundos, con una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Se determinó el número de ciclos de PCR de manera experimental y los datos se analizaron utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se informaron como las repeticiones en el cambio de expresión génica, normalizadas con un control endógeno y en relación a las células sin tratamiento.

Análisis por Western blot:

Los extractos celulares completos se realizaron con buffer de lisis conteniendo tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 0.5%, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) 1mM, Na_3VO_4 0.2mM y cocktail de inhibidor de proteasas (sigma). Las proteínas extraídas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAG) con sulfato duodecil de sodio; el inmunoblot se realizó con anticuerpos contra la proteína G9A (policlonal de conejo: IgG, anti G9A protein; Millipore), EZH2 (policlonal de conejo, IgG anti EZH2, Millipore) y B-actina (Santa-Cruz). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se utilizaron anticuerpos secundarios peroxidados, especie-específicos, contra inmunoglobulina G (IgG-HRP, de Santa Cruz). Las membranas se revelaron con un sustrato de quimioluminiscencia (Millipore).

Ensayo de actividad de desacetilasas de histonas:

La evaluación de la actividad de desacetilasa de histonas se realizó con un método colorimétrico (BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA). Se diluyeron 50 ug de extracto nuclear de la línea celular CaLo en 85 μL de ddH_2O , 10 μL del buffer para HDAC 10 x y 5 μL del sustrato colorimétrico; las muestras se incubaron a 37°C por una hora. La reacción se detuvo al añadir 10 μL del revelador de lisina y permanecieron por 30 minutos a 37 °C. Las muestras se analizaron con un lector de ELISA a 400 nm. La actividad de HDAC se expresó como el valor relativo por μg de proteína. El kit contiene controles positivos y

negativos que consisten en extracto nuclear de células HeLa con y sin tratamiento con trichostatina A, respectivamente.

PCR específica de metilación (MSP).

El DNA genómico se extrajo con el kit de extracción *Wizard Genomic DNA purification kit* (Pomera, Madison, WI, USA). El DNA se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C.

La modificación con bisulfito se realizó con kit de metilación (Methylation Direct™ KIT [Zymo Research]), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sintetizaron oligonucleótidos dobles para analizar las regiones metiladas y no metiladas del promotor de los genes hENT1 y dCK, con ayuda del programa Methprimer:

La amplificación de dCK se realizó de la posición -245 a la -18 del promotor:

dCK U: SE: 5'- TGGGGTAGAGGTTTTTTGTTATATG- 3'

AS: 5'- AACTAAAAACACTAACAAACCTACAAA- 3'

dCK M SE: 5'- TGGGGTAGAGGTTTTTCGTTATAC-3'

AS: 5'- CAACTAAAAACACTAACGAACCTACG- 3'

La amplificación de hENT1 se realizó de la posición -560 a la -264 del promotor

hENT1 M SE: 5'- GGTTTTGTTTATTAGGAGAGAGTAGTC-3'

AS: 5'- ATTAAAAAATCTAAAAACCACCGAA-3'

hENT1 U: SE: 5'- TTTTGTTTATTAGGAGAGAGTAGTTGT -3'

AS: 5'- ATTAAAAAATCTAAAAACCACCAA -3'

Después de la modificación con bisulfito, se realizó la reacción de PCR en un volumen total de 25 µL, conteniendo DNA modificado, primers a 20 pmol, dNTps 200 µM, Taq polimerasa 0.25U y buffer 1 x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las reacciones de PCR se realizaron con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 50 ciclos a 94°C por 35 segundos, 57°C por 35 segundos, y 72°C por 45 segundos; con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos finales se conservaron a 4°C.

Secuenciación

Como se señaló anteriormente, el DNA se almacenó a -20 °C y se modificó con bisulfito y posteriormente se amplificó por PCR con los siguientes oligonucleótidos:

hENT1: (de la posición -1000 a la -115, con respecto al inicio de la transcripción, en dos fragmentos.)

SE: 5'-GGGTGGAGAGATTAGATTTGTAGAG-3'

AS: 5'-AATCAAAAAAACAACAAAAAAC-3'

SE: 5'-TTATATAAATGGGGAGTAGGAGAGG-3'

AS: 5'-CCCAAAAACCTTCCTAATTACTAACC-3'

dCK: de la posición -490 a la +5, con respecto al inicio de la transcripción (en dos fragmentos):

SE: 5'-TTTGTTTATTTTAAATAGGTTTATTAGAGA-3'

AS: 5'-TCTACCCCAAACCAACAAAC-3'

SE: 5'-GGTTTGGGGTAGAGGTTTTT-3'

AS: 5'-CTAAACCAAATCCTAACCTACC-3'

La PCR se realizó en un volumen total de 25 µL, conteniendo DNA modificado, primers a 20 pmol, dNTPs 200 µM, Taq polimerasa 0.25U y buffer 1 x suplementado por el fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las reacciones de PCR se realizaron con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 50 ciclos a 94°C por 35 segundos, 57°C por 35 segundos, y 72°C por 45 segundos; con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los amplicones se purificaron y clonaron con un vector pGEM-T-Easy (Promega) y se secuenciaron con el primer T7. Se seleccionaron 5 clonas al azar para secuenciación. Los electroferogramas se analizaron en las direcciones sentido y antisentido para la búsqueda de islas CpG metiladas y no metiladas. Las secuencias obtenidas se compararon antes y después de la adquisición de resistencia a gemcitabina, así como también en las células resistentes a gemcitabina, tratadas posteriormente con hidralazina (ver figura 2).

Ensayo de transfección con iRNA.

Las células con resistencia secundaria a gemcitabina se cultivaron en placas Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en un número de 1.5×10^5 células/pozo con medio optimem y después de 24 horas se transfectaron con lipofectamina y el siRNA G9A (Ambrion cat #439242). El control negativo se realizó con lipofectamina + siRNA *Scramble* (Ambrion, cat # 4390844). Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda, conteniendo CO₂ al 5 %. Después de 72 hrs se aspiró el medio y se extrajo RNA, así como también se hizo un ensayo de citotoxicidad para evaluar la sensibilidad a gemcitabina.

Análisis por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Las células se cultivaron en las condiciones antes descritas, en cajas de cultivo de 75 ml. Se decantó el sobrenadante y se fijaron las células con formaldehído al 37%, a temperatura ambiente por 10 minutos, bajo agitación constante. La reacción se detuvo con la adición de glicina 125 mM. Las células se lavaron con 10 ml de PBS frío con inhibidores de proteasas y se repitió el proceso 2 veces. Una vez obtenido el botón celular, se procedió a realizar la lisis celular con el buffer de lisis celular (Hepes-KOH 50 mM, pH7.9; EDTA 10 mM, pH 8.0; SDS 1%) con inhibidores de proteasas. Se utilizó una jeringa de 1 ml para la obtención de núcleos y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2000 RPM, a 4° C durante 5 minutos. El botón se resuspendió con el buffer de lisis nuclear y la cromatina aislada se fraccionó por sonicación en pulsos. Después de este proceso, la cromatina se diluyó 1:10 en el buffer de inmunoprecipitación (IP)

(Hepes-KOH 10 mM, pH 7.9; Triton X-100 1%; NaCl 150 mM, e inhibidores de proteasas). La cromatina se separó en dos fracciones: la primera se conservó a -80°C (input) y la segunda se procedió a pre-limpiar el extracto total con proteína A/G agarosa y esperma de salmón (Sigma-Aldrich) por 2- 4 horas. La proteína A/G agarosa se removió por centrifugación y la cromatina pre-limpiada se incubó con un anticuerpo (anticuerpo anti-acetil-histona H3, anti acetil-histona H4, anti-H3K4me₃, anti -H3K9me₂, anti- H3K27me₂; Millipore) durante 12-14 horas. Se obtuvieron los inmunoprecipitados con incubación con proteína A/G agarosa y centrifugación a baja velocidad. Los botones se lavaron 3-4 veces con el buffer IP, tres veces con el buffer de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; LiCl 0.25 mM; NP-40 0.5%; deoxicolato de sodio 0.5%; EDTA 1 mM, pH 8.0) y tres veces con Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Los precipitados obtenidos se incubaron con buffer de elución buffer (Tris 50 mM, pH 8.0; SDS 1%; NaHCO₃ 50 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0) y la reversión de los cruces se realizó con NaCl 5M, a un volumen 1:1 durante 8 horas a 65°C. Se extrajo el DNA por la técnica de fenol cloroformo y se precipitó con etanol y éste se amplificó por PCR.

a) Para la amplificación del promotor de dCK se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Se: 5'-CCTCCCCACCCGACTCCGGAACC-3'

As: 5'-CAGCTGAGGACACTGGCGGGCCTG-3'

Se utilizó un tiempo de desnaturalización a 90° C durante 5 minutos y 35 ciclos con TM de 59 °C y los siguientes tiempos de desnaturalización, alineamiento y

extensión: 35'', 35'', 45'', con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2 %.

b) Para la amplificación del promotor de hENT1 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Se: 5'-CCTGTGACAGAGAGGAACTAAG-3'

As: 5'-GCGACAACATCGATGATGACTG-3'

Se utilizó un tiempo de desnaturalización a 90 ° C durante 5 minutos y 35 ciclos con TM de 59 °C y los siguientes tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión: 35'', 35'', 45'', con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2 %.

Las regiones del promotor de los genes hENT1 y dCK que se amplificaron para RT-PCR, MSP y secuenciación y CHIP-PCR se muestran en las siguientes figuras:

Figura 2: Regiones amplificadas del promotor de hENT1:

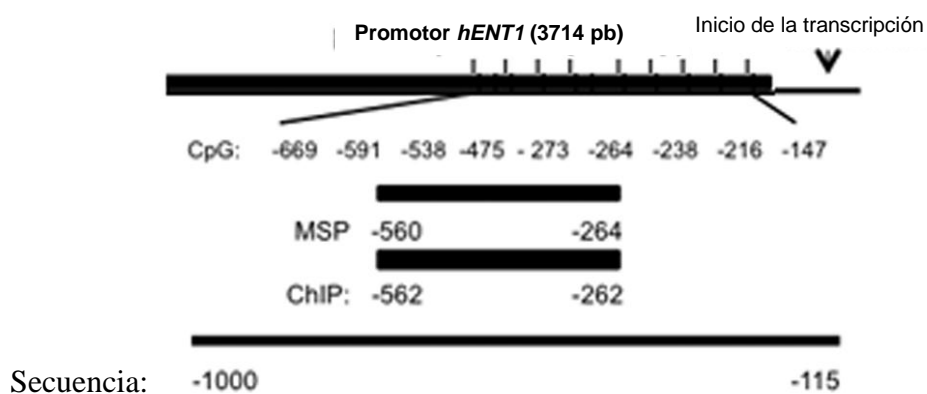
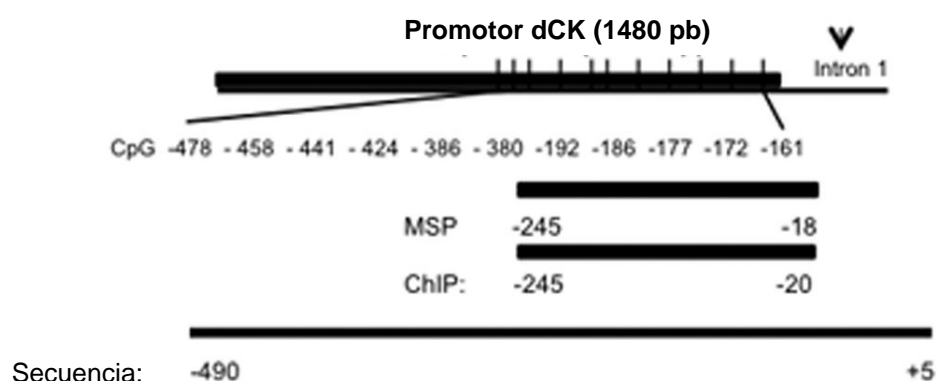


Figura 3: Regiones amplificadas del promotor de dCK:



Ensayo *in vitro* de metil-transferasa.

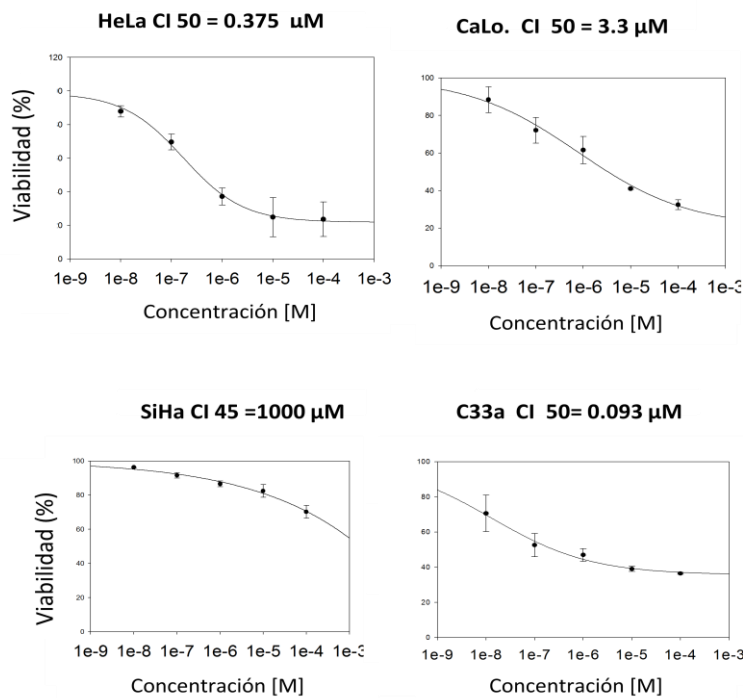
La inhibición *in vitro* de la metiltransferasa de H3K9 con hidralazina se evaluó con el Kit *EpiQuikTM Histone Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit* [(H3-K9) Epigentek, Brooklyn, NY] que contiene a la enzima G9A recombinante como control. Este ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS.

I.Sensibilidad a gemcitabina en líneas celulares de cáncer cervico-uterino:

Se evaluó inicialmente la sensibilidad a gemcitabina en las líneas celulares de cáncer cervical CaLo, HeLa, C33A y SiHa. La CI 50 en la línea SiHA fue $> 1000 \mu\text{M}$, por lo que se consideró con resistencia primaria. La CI 50 fue de $3.3 \mu\text{M}$, $0.3 \mu\text{M}$ y $0.1 \mu\text{M}$ en las líneas CaLo, HeLa y C33A, respectivamente, como se muestra en la siguiente figura:

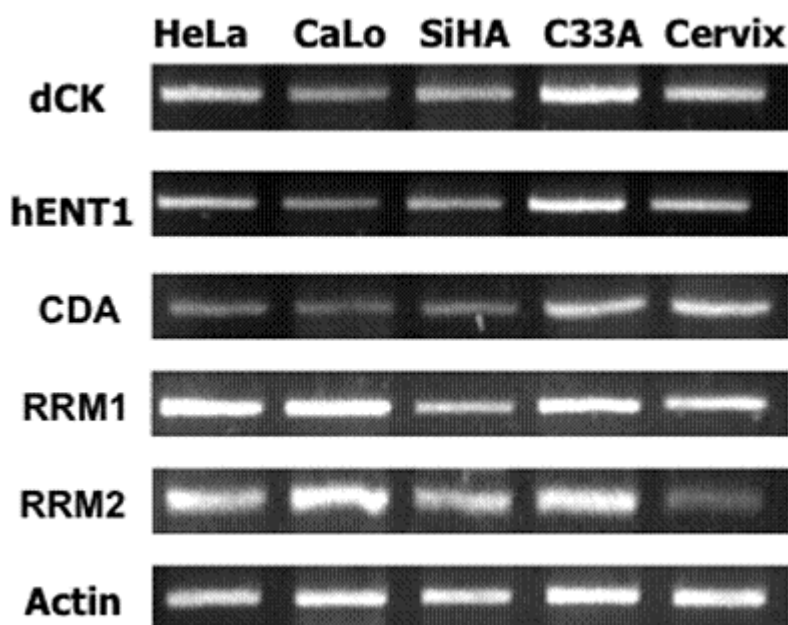
Figura 4: Sensibilidad basal a gemcitabina.



II. Expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de gemcitabina en líneas celulares de cáncer cervical:

La expresión de los genes involucrados en el transporte (hENT1) y metabolismo (DCK, CDA, RRM1, RRM2) fue similar en las líneas celulares estudiadas, como se muestra en la siguiente figura:

Figura 5: Expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de gemcitabina en líneas celulares de cáncer cervical:



Adicionalmente, como puede observarse en la siguiente tabla, no existió una correlación entre los niveles de expresión de los genes estudiados y la sensibilidad a gemcitabina (evaluada a través de CI 50) en las líneas celulares analizadas:

Tabla 1: Correlación de la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de gemcitabina y sensibilidad a este antimetabolito en líneas celulares de cáncer cervical:

Línea celular	CI50 (μM)	<i>hENT1</i> *	<i>dCK</i> *	<i>CDA</i> *	<i>RRM1</i> *	<i>RRM2</i> *
HeLa	0.375 ± 0.03	0.73	0.78	0.56	1.15	0.99
C33A	$0.093 \pm .07$	0.76	0.79	0.75	0.84	0.86
CaLo	3.3 ± 2.4	0.41	0.48	0.41	1.01	0.98
SiHa	1000 **	0.57	0.64	0.52	0.75	0.83

*Unidades normalizadas con actina

**CI 45

III.Inducción de resistencia a gemcitabina:

Después de exponer a la línea celular CaLo a dosis crecientes de gemcitabina la CI 50 incrementó de $3.3 \mu\text{M}$ a $927 \mu\text{M}$ (concentración 280 veces mayor). Así mismo, la expresión de los genes *hENT1* y *dCK* disminuyeron. Los genes *RRM1* y *RRM2* tuvieron cambios menores y la expresión de *CDA* disminuyó, como se muestra en las figuras 6 y 7.

Figura 6: Sensibilidad a gemcitabina en la línea celular CaLo, después de exposición a dosis creciente de este fármaco.

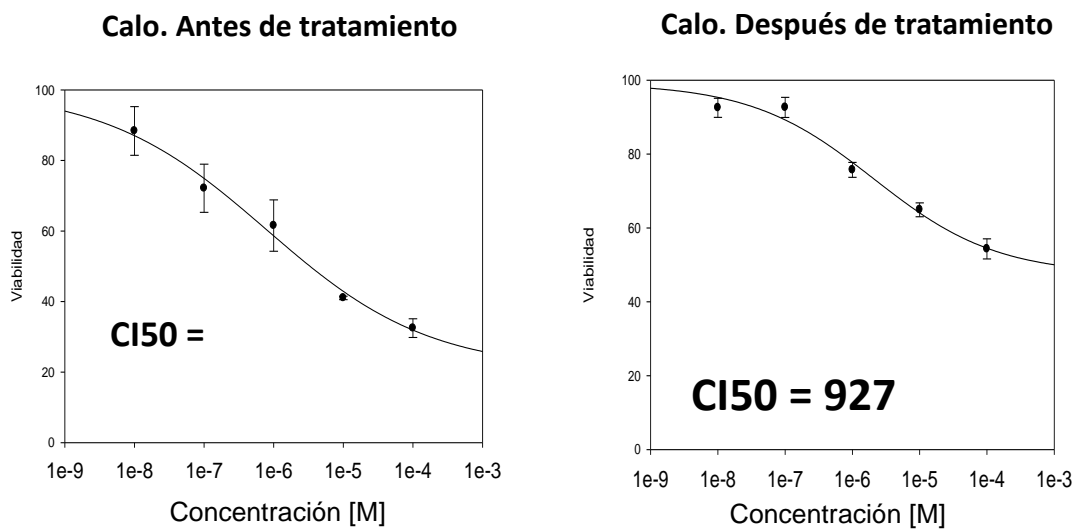
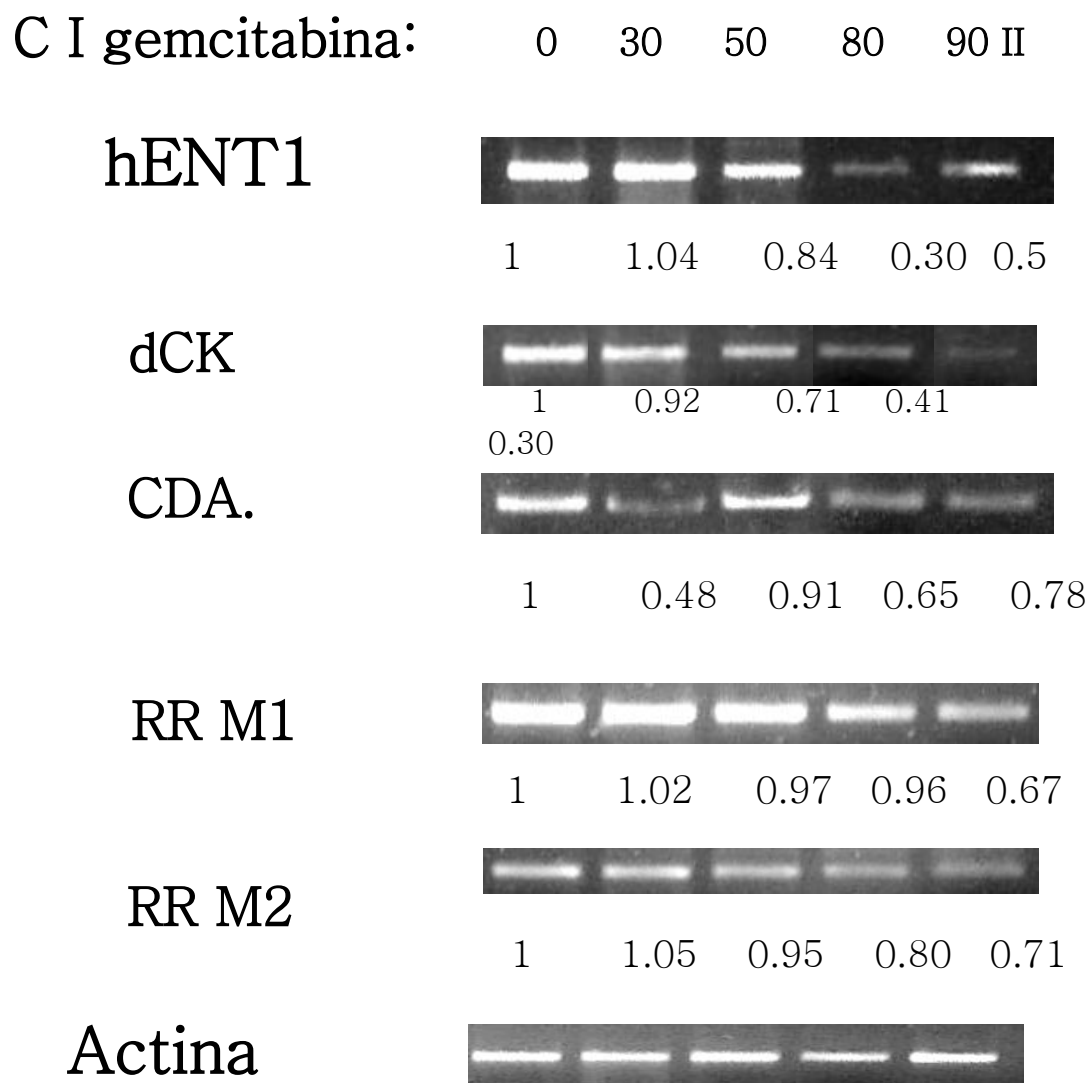


Figura 7: Expresión de los genes hENT1, dCK, CDA, RRM1 y RRM2 en la línea celular CaLo durante la inducción de resistencia a gemcitabina.



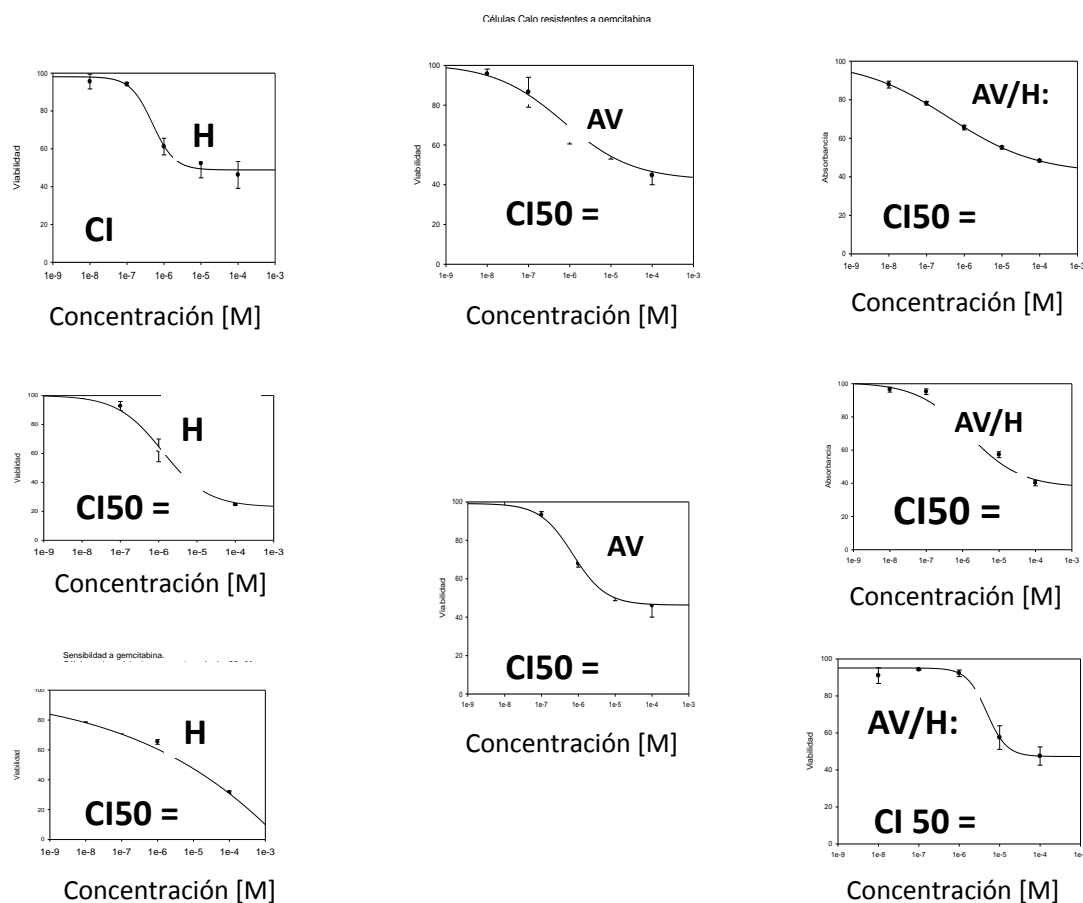
IV.Tratamiento epigenético de células CaLo resistentes a gemcitabina y su efecto en la sensibilidad a este antimetabolito.

Como se describió en el apartado de metodología, las células CaLo resistentes a gemcitabina se trataron con hidralazina (2µM x 10 días, 10 µM x 5 días y 30 µM x

5 días), ácido valproico 0.24m M y 1 mM durante 10 y 5 días, respectivamente. Así mismo, se utilizaron las siguientes combinaciones: H 2μM+ AV 0.24 mM durante 10 días; H 10 μM + AV 1 mM por 5 días y H 30μM + AV 1mM por 5 días.

La resistencia a gemcitabina revirtió después del tratamiento con hidralazina (figura 8).

Figura 8: Cambios en sensibilidad a gemcitabina en la línea celular CaLo resistente a este antimetabolito, después de tratamiento epigenético:



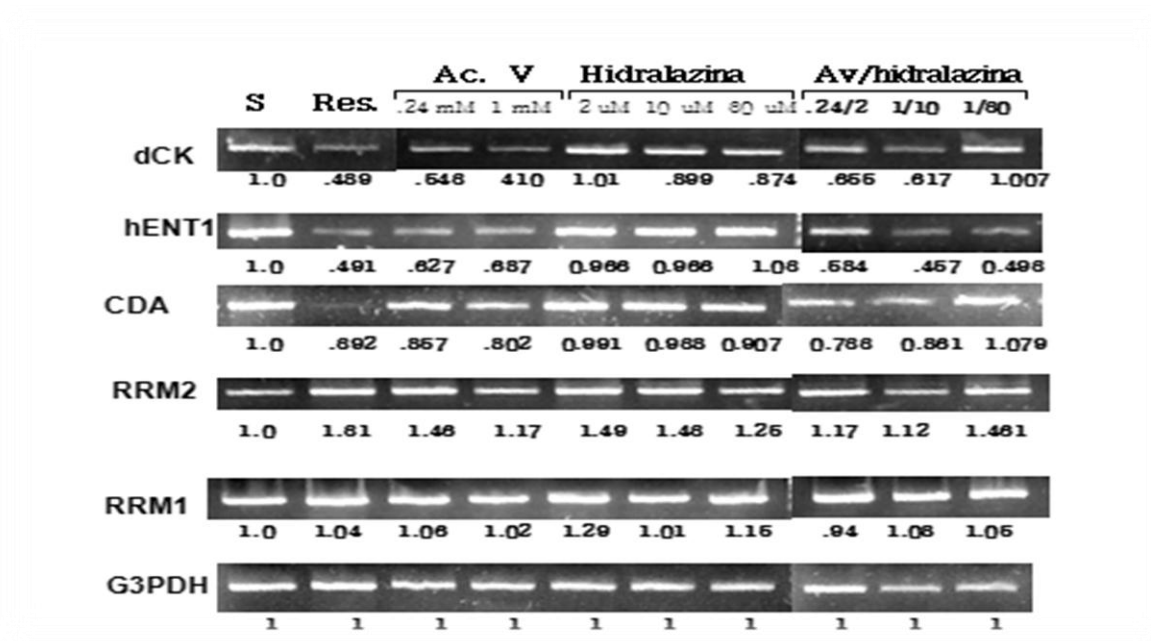
H= hidralazina

AV = Ácido valproico

AV/H= Ácido valproico/hidralazina

De igual forma, los genes hENT1 y dCK se re-expresaron después del tratamiento con hidralazina, en las tres dosis administradas (figura 9):

Figura 9: Cambios en la expresión de los genes involucrados en el transporte (hENT1) y metabolismo de gemcitabina (DCK, CDA, RRM1, RRM2) en la línea celular CaLo resistente a este antimetabolito, después de tratamiento epigenético.



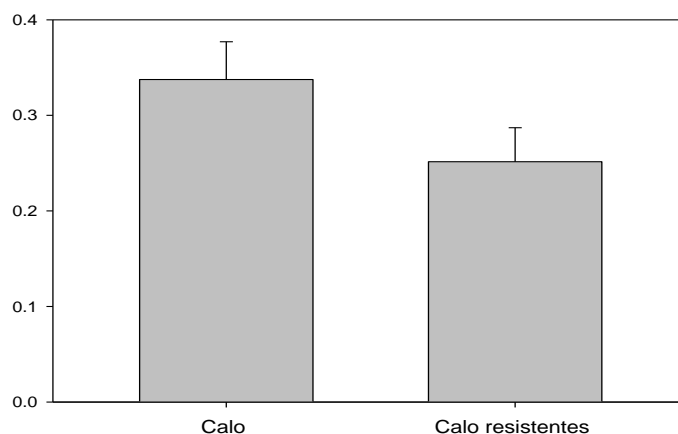
V. Evaluación de mecanismos epigenéticos implicados en el silenciamiento de *hENT1* y *dCK*, como mecanismo de resistencia adquirida a gemcitabina.

Actividad de HDAC.

La actividad de HDAC tuvo un decremento no significativo en las células CaLo resistentes a gemcitabina, que no explica el silenciamiento observado en los genes *hENT1* y *dCK* en estas células con resistencia adquirida.

Figura 10: Actividad de HDAC en células sensibles y resistentes a gemcitabina.

Actividad de HDAC en células Calo sensibles y resistentes a gemcitabina



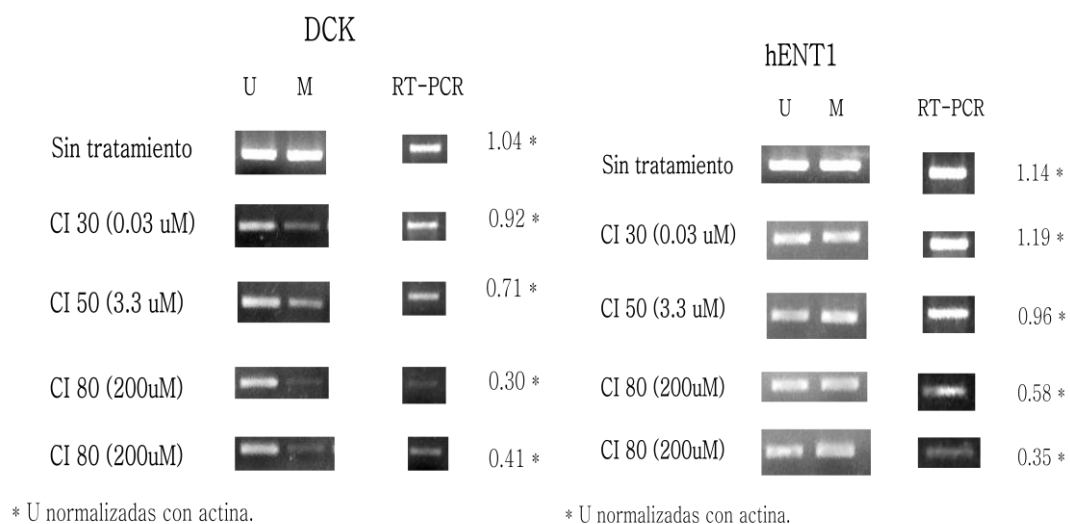
Así mismo, el tratamiento de células CaLo resistentes a gemcitabina con ácido valproico, un inhibidor de HDAC, no revirtió la resistencia a este antimetabolito, lo que apoya que éste no es el mecanismo de generación de resistencia.

Metilación del promotor.

El estado de metilación del promotor se evaluó mediante MSP antes y después de la inducción de resistencia a gemcitabina. En ambas situaciones se encontró una

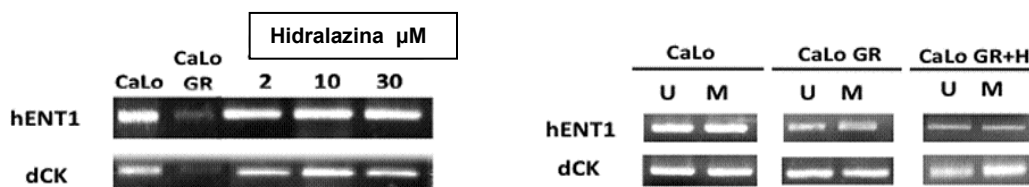
metilación parcial del promotor, que no correlacionó con los cambios en la expresión de los genes dCK y hENT, como se observa en la siguiente figura:

Figura 11: Estado de metilación del promotor y cambios en la expresión de los genes hENT y dCK, durante el desarrollo de resistencia a gemcitabina.



El estado de metilación del promotor tampoco se modificó con el tratamiento epigenético, como se muestra a continuación.

Figura 12: Estado de metilación del promotor de los genes hENT1 y dCK en la línea celular CaLo sensible, resistente a gemcitabina y resistente con tratamiento epigenético.

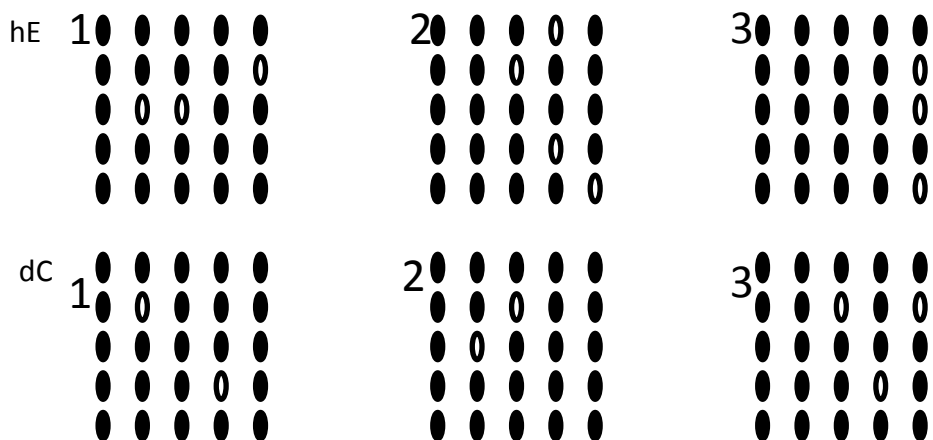


Los resultados documentados por MSP, se confirmaron por secuenciación del promotor de los genes hENT1 y dCK. Para el promotor de hENT1 se secuenció desde la posición -1000 a la -101, que incluye 9 islas CpG (ver figura 2) y las regiones funcionales conocidas: 5 regiones de sitios de unión a Sp1, 2 regiones Ap2 α y un sitio de unión para Rar α SRF.

En el análisis de dCK se secuenció desde la posición -420 a la +5, que incluye a 11 islas CpG (figura 3) y las siguientes regiones funcionales: dos regiones Cga, la caja E-box y el sitio de unión a E2F.

En el análisis de secuencia de ambos promotores no se documentaron cambios en el estado de metilación de citosinas, incluyendo la región 3'Cg, que ha sido descrita por otros autores como sitio potencial de metilación implicado en la resistencia a gemcitabina, como se observa en la siguiente figura:

Figura 13: Secuenciación del promotor de los genes *hENT1* & *dck* en la línea celular Calo (1) antes de la exposición a gemcitabina, (2) después de adquirir resistencia, (3) células resistentes a gemcitabina, tratadas con hidralazina.



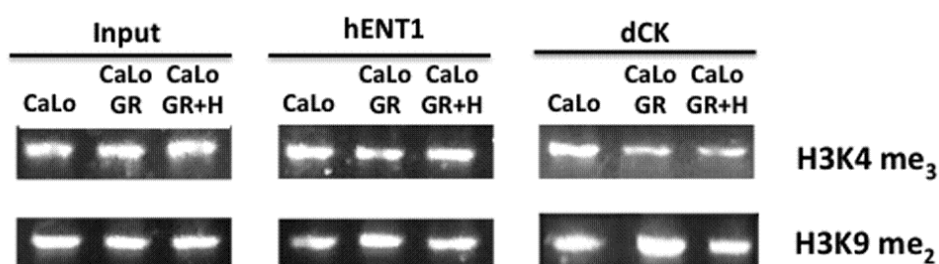
La ausencia de modificaciones en el estado de metilación del promotor de los genes estudiados antes y posterior al desarrollo de resistencia secundaria sugiere que el silenciamiento de *hENT1* y *dck* está controlado por una regulación, diferente a la metilación de islas CG en el promotor, lo que hizo necesario evaluar las modificaciones post-transcripcionales en las histonas.

Modificaciones en histonas.

A través de la técnica de CHIP-PCR se evaluaron modificaciones postranscripcionales a nivel de histonas. No se documentaron cambios significativos en la expresión de H3 total acetilada y H4 total acetilada, hallazgos que concuerdan con la ausencia de incremento en la actividad de HDAC.

Por otra parte, se evaluaron marcas permisivas ($H3K4me_3$) y represivas ($H3K9me_2$). Como se observa en la siguiente figura, a nivel de hENT1 se documentó un incremento de la marca represiva $H3K9me_2$. En el mismo sentido, a nivel del gen dCK se documentó aumento de esta marca represiva ($H3K9me_2$), con disminución de la marca permisiva $H3K4me_3$. Adicionalmente, el tratamiento de las células CaLo resistentes con hidralazina disminuyó las marcas represivas.

Figura 14: Cambios en histonas documentados por CHIP-PCR involucrados en el silenciamiento de hENT1 y dCK, después de inducción de resistencia a gemcitabina en la línea celular CaLo y su tratamiento con hidralazina.



CaLo= línea celular CaLo sensible a gemcitabina.

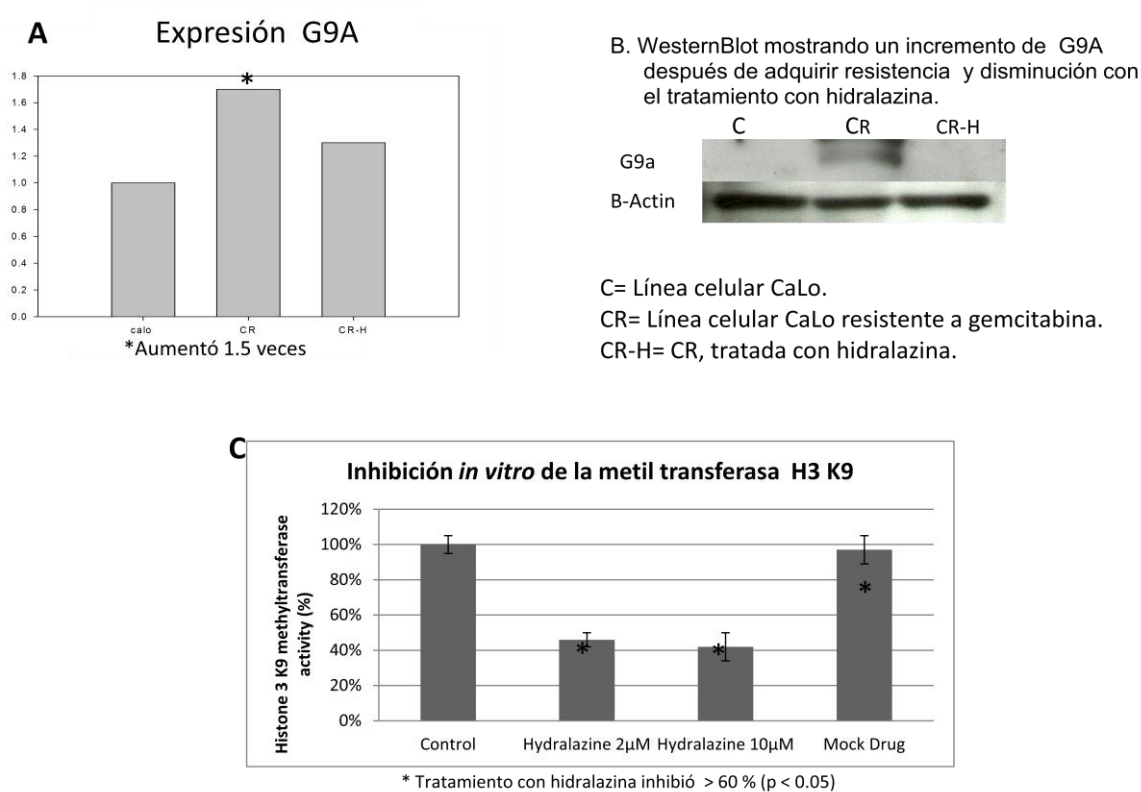
CaLo GR= línea celular CaLo resistente a gemcitabina.

CaLo GRH= línea celular CaLo resistente a gemcitabina, tratada con hidralazina.

Estos resultados sugieren que los cambios postransduccionales a nivel de histonas constituyen el mecanismo regulador del silenciamiento de estos genes en la resistencia adquirida a gemcitabina.

Por lo anterior, se evaluó por RT-PCR y Western Blot los niveles de expresión de metil-transferasas de histonas. Como se observa en la siguiente figura, los niveles de expresión de G9a incrementaron al adquirir resistencia a gemcitabina.

Figura 15: Niveles de expresión de G9A en las células resistentes y tratadas con hidralazina.



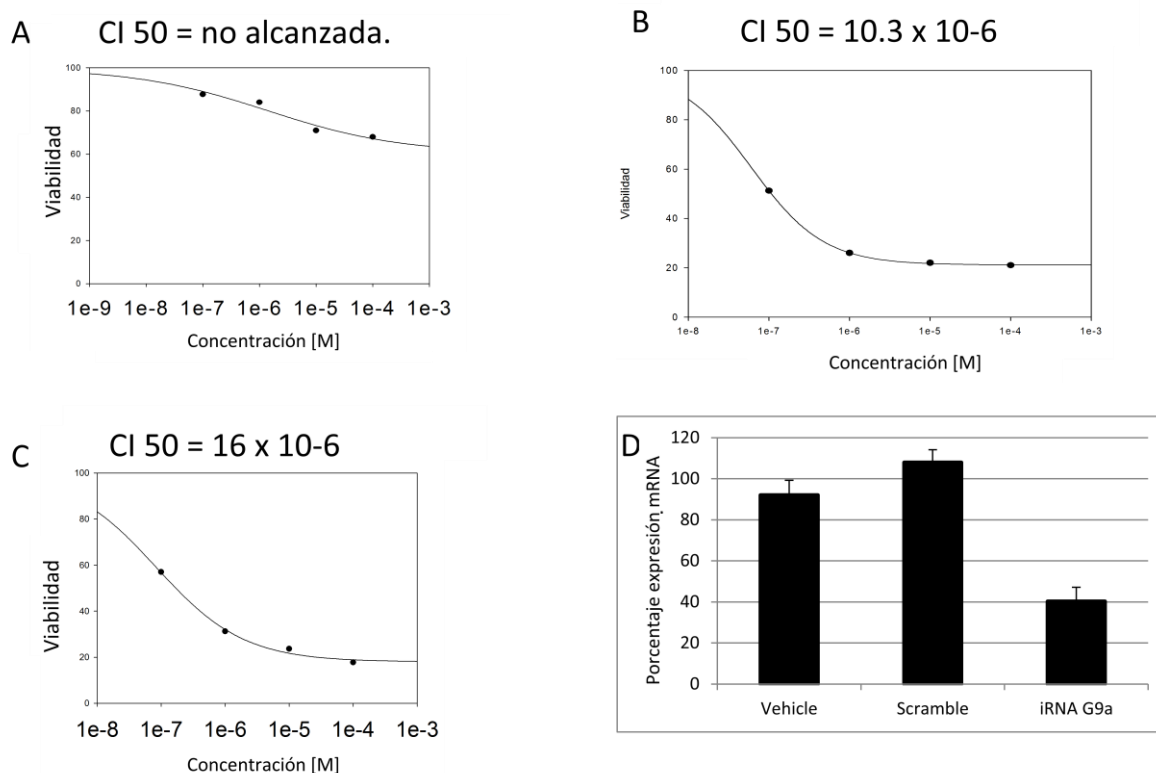
Así mismo, se observa en el WB, que los niveles de G9a incrementaron al adquirir resistencia a gemcitabina y posterior al tratamiento con hidralazina descendieron a niveles basales. Así mismo, para evaluar la capacidad inhibitoria de hidralazina

sobre G9A se realizó un ensayo de inhibición de la metiltransferasa de H3K9 in vitro con el Kit *EpiQuick™ Histone Methyltransferase Activity/Inhibition* (H3-K9), y las concentraciones 2uM y 10uM de hidralazina redujeron de manera significativa la metilación de H3K9, como se muestra en la figura 15C.

Como se señaló anteriormente, el tratamiento de células CaLo resistentes a gemcitabina con hidralazina revirtió la resistencia a gemcitabina (figura 8), además de que re-expresó hENT1 y dCK (figura 9). En la misma dirección, también disminuyeron las marcas represivas, como se observa en la figura 14.

Para comprobar estos resultados se realizó un *knockout* con iRNA contra G9A en la línea celular CaLo resistente a gemcitabina y se evaluó la sensibilidad a gemcitabina, a través de un ensayo de citotoxicidad. En la siguiente figura se muestra que las células transfectadas con iRNA revirtieron la resistencia (Figura 16 B), misma que no se modificó cuando también se trataron con hidralazina (Figura 16 C).

Figura 16: Sensibilidad a gemcitabina en células CaLo transfectadas con iRNA scramble (A), iRNA contra G9A (B), así como iRNA contra G9A + tratadas con hidralazina (C). Inhibición de la expresión de G9A con iRNA (D).



Estos resultados señalados sugieren que el mecanismo de resistencia adquirida a gemcitabina es a través cambios postransduccionales a nivel de histonas. Así mismo, la hidralazina revierte la resistencia adquirida a este antimetabolito a través de un efecto en la desmetilación de histonas, a través de G9A.

DISCUSIÓN.

El desarrollo de resistencia al tratamiento es un reto a vencer diariamente en el manejo de los pacientes con cáncer. Se conoce que diferentes mecanismos de regulación epigenética afectan la expresión de múltiples genes; su influencia en el desarrollo de resistencia que surge durante el tratamiento con quimioterapia constituye un área de investigación.

La actividad de gemcitabina se ha demostrado ampliamente en diferentes tumores, incluyendo el cáncer cervical [Cetina L, 2004; Candelaria M, 2007b], donde tiene un papel fundamental al permitir el manejo con quimio-radioterapia concomitante, en aquéllas con insuficiencia renal [Cetina L, 2004] y también incrementa la tasa de respuesta patológica completa y la supervivencia global [Candelaria M, 2006b] al añadirse al tratamiento combinado de quimio-radioterapia con cisplatino [Dueñas-González, 2011].

Los resultados aquí señalados muestran que la resistencia adquirida a gemcitabina en líneas celulares de cáncer cervical es reversible por el agente desmetilante hidralazina y que este desarrollo se acompaña de una disminución en la expresión de genes *hENT1* y *dCK*, que son determinantes fundamentales para la captura intracelular de gemcitabina y su metabolismo, respectivamente.

De manera interesante, se demostró que los cambios en la regulación de los genes *hENT1* y *dCK* durante el desarrollo de resistencia a gemcitabina no fueron

secundarios a hipermetilación de las regiones promotoras de estos genes, como se comprobó por MSP y secuenciación de DNA modificado con bisulfito. Sin embargo, el tratamiento con hidralazina revirtió la resistencia y permitió la re-expresión de estos genes. Estos datos sugieren que otros mecanismos epigenéticos influyeron en el silenciamiento de genes asociados con la resistencia a quimioterapia y que la hidralazina tiene efectos independientes de la metilación de DNA, aún más a través del programa METADRUG™ se predijo una regulación en la metilación a través de H3K9. Estos hallazgos son importantes para explicar los mecanismos de resistencia a quimioterapia.

La inactivación de genes por metilación de DNA fue el primer mecanismo que se describió como directamente involucrado en la resistencia adquirida a quimioterapia en modelos *in vitro* [Nice J, 1989; Nice J, 1997]. Sin embargo, conforme ha evolucionado el conocimiento de los procesos epigenéticos, se han descrito otros mecanismos, como son las desacetilasas de histonas (Zinc- y NAD-dependientes), así como las metiltransferasas de histonas, desmetilasas de histonas y los procesos de inactivación a través de microRNA's, implicados en el desarrollo de resistencia a quimioterapia [Choi DS, 2000; Huang Y, 2007; OugolKov AV, 2008; Inoue T, 2009; Huo H, 2010; Ma J, 2010; Jiang ZP, 2010].

Los resultados aquí presentados sugieren fuertemente que en este modelo de resistencia adquirida a gemcitabina en la línea celular CaLo, la metilación de H3K9 podría ser el principal mecanismo para el silenciamiento de la expresión de los genes *hENT1* y *dCK*. Este hallazgo es relevante, ya que actualmente se

encuentran en desarrollo inhibidores de la metil transferasa de histonas G9A [Liu F, 2010].

Estudios previos demostraron que los inhibidores de la metilación del DNA inducían la re-expresión de dCK en células CEM/dCK [Antonsson, 1987] y que la ausencia de la expresión de este gen es clave para la activación de análogos de nucleósidos, como gemcitabina, y ésta es debida a metilación del promotor [Avramis VI, 1989; Kig XB, 1991; Ohhashi S, 2008; Peters GJ, 2010]. Para investigar los mecanismos por los cuales las células tumorales adquieren resistencia a gemcitabina, Galmarini y cols [Galmarini CM, 2004] desarrollaron una línea de linfoma folicular humano con exposición repetida a gemcitabina. La exposición a gemcitabina disminuyó la inducción de apoptosis y esta alteración se asoció con ausencia de expresión de RNAm de dCK, evaluado por RT-PCR cuantitativa. Otros autores [Bergman AM, 2002; Ohhashi S, 2008] también demostraron una correlación entre la disminución en la expresión de dCK y el desarrollo de resistencia gemcitabina o citarabina, aún cuando no esclarecieron el mecanismo regulador de esta disminución de expresión. Hasta la actualidad, no se han descrito otros mecanismos de silenciamiento de este gen en los modelos de resistencia a quimioterapia.

Así mismo, la ausencia o disminución de los niveles de expresión de hENT1 correlacionan estrechamente con la resistencia a gemcitabina y a otros análogos de nucleósidos [Gati WP, 1997; Griffiths M, 1997; Mackey JR, 2002; Achiwa H, 2004; Spratlin J, 2004; Barnes K, 2006; Giovanetti E, 2006a; Dueñas-Gonzalez A,

2010]. Aún cuando se conoce que la expresión de varios genes que codifican para transportadores como hOAT3 se suprime a través de la metilación del DNA *in vitro*, y que el tratamiento con azacitidina aumenta la expresión del mRNA de *SLC22A8*, en proporción con la concentración del fármaco utilizada, lo cual sugiere que factores epigenéticos pueden tener un papel importante en la regulación de la expresión del gen *SLC22A8* [Worm J, 2001]. Así mismo, mecanismos de regulación epigenética similares, se han descrito en el miembro 8 de la familia 5 de transportadores de solutos (transportador de iodo) (*SLC5A8*), en carcinomas de páncreas y próstata [Park JY, 2008]. También se ha demostrado silenciamiento por regulación epigenética de los siguientes transportadores: hipermetilación aberrante del transportador de folatos reducido (RFC), en asociación con resistencia metotrexate en líneas celulares de osteosarcomas, padecimientos linfoproliferativos [Kastrup IB, 2008] y cáncer de mama [Worm J, 2001]. De manera similar, la administración de decitabina indujo la re-expresión del gen para el sym-transportador *Na⁺/I-symporter* en líneas celulares de cáncer de tiroides, las cuales recuperaron su capacidad de transporte de iodo [Provenzano MJ, 2007]. Estudios previos realizados por nuestro grupo [Arce C, 2006] demostraron que diferentes miembros de las familias de genes transportadores de solutos tienen regulación epigenética en pacientes con cáncer de mama y cervical tratadas con inhibidores de la metilación del DNA y de HDAC, como la hidralazina y el valproato de magnesio, respectivamente. Diferentes genes *SLC* se sobre-expresan después de 7 días de tratamiento con estos fármacos (GEO, números de acceso GSE6304 y -8604) [Arce C, 2006]. Estos hallazgos pueden explicar la re-inducción de sensibilidad a gemcitabina en la línea

celular CaLo resistente a este antimetabolito, a través de re-expresión de *hENT1*. A pesar de que se ha demostrado que la región promotora del gen *hENT1* contiene islas CpG [Abdulla P, 2007], en este estudio, demostramos que la disminución en la expresión del gen *hENT1* no era secundario a metilación del promotor. Adicionalmente, el tratamiento con hidralazina permitió su reactivación por un mecanismo independiente de la metilación de DNA, lo que sugiere que esta disminución en la expresión está regulada a través de la metilación de H3K9 por la metil-transferasa de histona G9A.

En la misma dirección, se ha demostrado de manera consistente la metilación del promotor del gen *dCK* en células resistentes a quimioterapia [Antonsson,1987]. Sin embargo, en nuestro modelo no se encontró una correlación entre la metilación de este promotor y su expresión. Estos resultados obligaron a la búsqueda de otros mecanismos epigenéticos que explicaran el silenciamiento de estos genes.

El papel de los agentes desmetilantes o inhibidores de HDAC para revertir la resistencia a quimioterapia se ha evaluado y publicado por nuestro grupo [Candelaria M, 2007a]. Tampoco encontramos hallazgos consistentes en la actividad de desacetilasas de histonas, ni en la acetilación de histonas que explicaran este mecanismo de modificación de histonas como causa del silenciamiento de genes en este modelo.

Debido a que la decitabina, agente inhibidor de las metiltransferasas de DNA ha mostrado tener otros mecanismos alternativos implicados en la reactivación transcripcional, tales como la desmetilación de la histona H3K9 en regiones regulatorias de genes silenciados [Wozniak, 2007], se realizó una búsqueda en el programa METADRUGTM sobre otros efectos posibles de la hidralazina. Esta búsqueda predijo que la hidralazina podría estar involucrada en la regulación negativa de la metilación de H3K9. Con estos resultados, se realizó un análisis por CHIP para evaluar los cambios en H3K9me₂ en los promotores de los genes *hENT1* y *dCK* en la línea celular CaLo resistente a gemcitabina. Ambos promotores contenían H3K9me₂ en las células no tratadas y disminuyó en las células con resistencia adquirida, así mismo ésta revirtió con el tratamiento con hidralazina. Estos cambios fueron débiles y consistentes en tres ensayos por separado, la magnitud de este cambio puede explicarse porque por lo menos ocho diferentes metiltransferasas, incluyendo G9A tiene a H3K9 como su blanco de metilación [Wozniak, 2007].

Para confirmar estos hallazgos, se demostró por RT-PCR cuantitativa un incremento en la expresión de G9A en las células resistentes, en comparación con las células sensibles a gemcitabina, además se demostró por WB una disminución importante en los niveles de proteína de esta metil-transferasa de histona en las células resistentes tratadas con hidralazina. Estos resultados son similares a los encontrados en un modelo de cáncer mama, en el cual el tratamiento con 5-aza-CdR, disminuyó los niveles de la metiltransferasa de histonas G9A y permitió la re-expresión de *MSPIN* [Wozniak, 2007]. Adicionalmente, se demostró en un

ensayo *in vitro* el efecto inhibitorio de la hidralazina en la actividad de esta metiltransferasa de histona. Estos hallazgos se demostraron con un *knockout* de G9A en la línea celular CaLo resistente a gemcitabina, la cual fue reversible y esta sensibilidad no incrementó al adicionar hidralazina a las células depletadas de G9A, lo cual descarta un mecanismo de silenciamiento diferente de la hidralazina. La evidencia actual sugiere que el silenciamiento génico secundario a cambios epigenéticos son capaces de modificar la respuesta a fármacos. Los datos actuales sugieren que los cambios epigenéticos están asociados con un fenotipo de resistencia en las líneas cancerosas. Estos resultados sugieren que la hidralazina tiene actividad no solamente como agente desmetilante del DNA, sino también como un desmetilante de histonas, puesto que se documentó una reducción de H3K9me₂ después del tratamiento con este fármaco. El demostrar que los mecanismos epigenéticos están implicados en el silenciamiento de los genes asociados con resistencia a gemcitabina sugiere que éstos son importantes para vencer la resistencia a fármacos y tiene potencial aplicación en el tratamiento de tumores quimio-resistentes.

CONCLUSIONES: Estos resultados demuestran que la resistencia adquirida a gemcitabina se asocia a disminución en la expresión de hENT1 y dCK; esto se encuentra regulado por un mecanismo independiente de metilación del DNA y se asocia a hiperexpresión de la metiltransferasa G9A. La hidralazina revierte la resistencia a gemcitabina en la línea celular CaLo a través de inhibir a la metiltransferasas de histonas G9A.

REFERENCIAS.

Abajo A, Rodríguez J, Bitarte N, Zarate R, Boni V, Ponz M, Chopitea A, Bandres E, García-Foncillas J. Dose-finding study and pharmacogenomic analysis of fixed-rate infusion of gemcitabine, irinotecan and bevacizumab in pretreated metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2010;103: 1529-35.

Abdulla P, Coe IR. Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transport gene, hENT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007; 26:99-110.

Achiwa H, Oguri T, Sato S, Maeda H, Niimi T, Ueda R. Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2004; 95: 753-757.

Al-Madhoun AS, Talianidis I, Ericsson S. Transcriptional regulation of the mouse deoxycytidine kinase: identification and functional analysis of nuclear protein binding sites at the proximal promoter. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 2397-2407.

American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7a. Ed. Edge E, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A Eds. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. Pp: 396-397.

Antonsson BE, Avramis VI, Nyce J, Holcenberg JS. Effect of 5-azacytidine and congeners on DNA methylation and expression of deoxycytidine kinase in the human lymphoid cell lines CCRF/CEM/0 and CCRF/CEM/dCK-1. *Cancer Res*. 1987; 47: 3672-3678.

Arce C, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Revilla-Vazquez A, Chavez-Blanco A, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Bargallo E, Villarreal P, Ramirez T, Vela T, Candelaria M, Camargo MF, Robles E, Duenas-Gonzalez A. A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant Doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PloS ONE*. 2006 Dec 20; 1:e98.

Avramis VI, Mecum RA, Nyce J, Steele DA, Holcenberg JS. Pharmacodynamic and DNA methylation studies of high-dose 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine before and after in vivo 5-azacytidine treatment in pediatric patients with refractory acute lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989; 24: 203-210.

Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER. Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenoside transporter activated at acidic pH. *Circulation Res.* 2006; 99: 510-519.

Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist. Updat.* 2002; 5: 19-33.

Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, et. al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS ONE.* 2008; 3:e3695

Burris HA, Moore MJ, Andersen J. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer. A randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 1997;15: 2403-2413.

Candelaria M, Garcia-Arias A, Cetina L, Dueñas-Gonzalez A. Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond. *Radiat Oncol.* 2006a; 1:15.

Candelaria M, Chanona-Vilchis J, Cetina L, Flores-Estrada D, Lopez-Graniel C, Gonzalez-Enciso A, Cantu D, Poitevin A, Rivera L, Hinojosa J, de la Garza J, Duenas-Gonzalez A. Prognostic significance of pathological response after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiation for locally advanced cervical carcinoma. *Int. Semin. Surg. Oncol.* 2006b, 3:3. Doi:10.1186/1477-7800-3-3

Candelaria M, Gallardo-Rincon D, Arce C, Cetina L, Aguilar-Ponce JL, Arrieta O, Gonzalez-Fierro A, Chavez-Blanco A, de la Cruz-Hernández E, Camargo MF, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Pérez-Plasencia C, Taja-Chayeb L, Wegman-Ostrosky T, Revilla-Vazquez A, Duenas-Gonzalez A. A Phase II study of epigenetic therapy with Hydralazine and Magnesium Valproate to overcome Chemotherapy Resistance in Refractory Solid Tumors. *Ann Oncol.* 2007a;18:1529-1538.

Candelaria M, Cetina L, de la Garza J, Dueñas-Gonzalez A. Clinical implications of gemcitabine in the treatment of cervical cancer. *Eur. J. Cancer.* 2007b; 5 (Supl 5): 37-43.

Candelaria M, de la Cruz-Hernández E, Pérez-Cardenas E, Trejo-Becerril C, Gutiérrez-Hernández O, Dueñas-Gonzalez A. Pharmacogenetics and pharmacoepigenetics of gemcitabine. *Med. Oncol.* 2009;26(2): 210-4.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 2002;298:1039-1043.

Cetina L, Rivera L, Candelaria-Hernández M, De la Garza J, Dueñas-González A. Chemoradiation for cervical cancer in patients with renal dysfunction. Experience with gemcitabine. *Anticancer drugs*. 2004;15: 761-766.

Chabner BA, Johns DG, Coleman CN, Drake JC, Evans WH. Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. *J. Clin. Investig.* 1974; 53: 287-290.

Chen E, Johnson EE, Vetter S, Mitchell BS. Characterization of the Deoxycytidine Kinase Promoter in Human Lymphoblast Cell Lines. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1660-1668.

Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004;60:55-89.

Choi DS, Handa H, Young H, Gordon AS, Diamond I, Messing RO. Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 200-208.

Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing—time for a change? *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8: 439-44.

Dueñas-González A, Cetina L, Coronel J, Martínez-Baños D. Pharmacotherapy options for locally advanced and advanced cervical cancer. *Drugs*. 2010; 70:403-32.

Dueñas-Gonzalez A, Zarbá JJ, Patel F, Alcedo JC, Beslija S, Casanova L, Pattaranutaporn P, Hameed S, Blair JM, Barraclough H, Orlando M. Phase III, open-label, randomized study comparing concurrent gemcitabine plus cisplatin and radiation followed by adjuvant gemcitabine and cisplatin versus concurrent cisplatin and radiation in patients with stage IIB to IVA carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1678-85.

Funamizu N, Okamoto A, Kamata Y, Misawa T, Uwawa T, Gocho T, Yanaga K, Manome Y. Is the resistance of gemcitabine for pancreatic cancer settled only by overexpression of deoxycytidine kinase? *Oncol Rep.* 2010; 23: 471-5.

Galmarini CM, Clarke ML, Jordheim L. Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol.* 2004; 4:8.

Gandhi V, Plunkett W. Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res.*1990; 50:3675-3680.

Gandhi V, Legha J, Chen F. Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphates residues from DNA. *Cancer Res.* 1996; 56: 4453-4459.

Gati WP, Paerson AR; LArratt LM. Sensitivity of acute leukemia cells to cytarabine is a correlate of cellular nucleoside transporter site content measures by flow cytometry with SAENTA-fluorescein. *Blood.* 1997;90: 346-353.

GE Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW. Physical and Functional Interactions between USF and Sp1 Proteins Regulate Human Deoxycytidine Kinase Promoter Activity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 49901-49910.

Gilbert JA, Salavaggione E, Pelleymounter YJL, Eckloff BW, Wieben ED, Ames MM, et.al. Gemcitabine Pharmacogenomics:Cytidine Deaminase and Deoxycytidylate Deaminase Gene Resequencing and Functional Genomics. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 1794- 1803.

Giovanetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Del Tacca M, Danesi R. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2006a; 5: 1387-1395.

Giovanetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, et. al. Transcription Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 Predicts Survival in Pancreas Cancer Patients Treated with Gemcitabine. *Cancer Res.* 2006b; 66: 3928-3935.

Gligorov J, Selle F, Khalil A, Abbas F, Namer M, Lotz JP. Updates on gemcitabine on metastatic breast cancer. *Bull Cancer.* 2007;94 Spec No Actualites:S90-94.

Globocan: <http://globocan.iarc.fr> (al 26 de noviembre, 2011).

Griffiths m, Yao W, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD, et. al. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (EI) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J.* 1997; 328: 739-743.

Guzman-Gutierrez E, Sandoval C, Nova E, Castillo JL, Vera JC, LampertiL, Krause B. Differential expression of functional nucleoside transporters in non-differentiated and differentiated human endotelial progenitor cells. *Placenta.* 2010; 31: 928-36.

Heinemann V, Xu YZ, Chubb S. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* 1990; 38:567-572.

Heinemann V, Xu YZ, Chubb S. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'triphosphate: a mechanism of self-potentiation. *Cancer Res.* 1992; 52: 533-539.

Huang P, Chubb S, Hertel LW. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 1991; 51: 6110-6117.

Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 183-201.

Huo H, Magro PG, Pietsch EC, Patel BB, Scotto KW. Histone methyltransferase MLL1 regulates MDR1 transcription and chemoresistance. *Cancer Res.* 2010; 70: 8726-8735.

Inoue T, Nakayama Y, Yamada H, LiYC, Yamaguchi S. SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle.* 2009; 8: 1279-1291.

Jiang ZP, Xu P, Wang GP, Zhao XL, Chen FP. Hypothesizing that histone deacetylase inhibitors can be used to reverse multiple drug resistance. *Med Hypotheses.* 2010; 74:92-94.

Jordheim LP, Guittet O, Lepoivre M, Galmarini M, Dumontest C. Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4: 1268-1276.

Kalykaki A, Papakotoulas P, Tsousis S, Boukovinas I, Kalbakis K, Vamvakas L, et. al; Hellenic Oncology Research Group. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in pretreated patients with advanced ovarian cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Anticancer Res.* 2008;28(1B):495-500.

Kang SP. Pharmacogenomics and Pancreatic Cancer Treatment. Optimizing Current Therapy and Individualizing Future Therapy. *J Pancreas.* 2008;9: 251-66.

Kastrup IB, Worm J, Ralfkiaer E, Hokland P, Gudberg P, Gronbaek K. Genetic and epigenetic alterations of the reduced folate carrier in untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 2008; 80: 61-66.

Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Shiota K, Kim I, Gonzalez F, Sugiyama Y. Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by

Hepatocyte Nuclear Factor 1 α / β and DNA Methylation. Mol. Pharmacol. 2006; 70: 887-896.

Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. Curr. Drug Metabolism. 2004; 5: 63-84.

Kroep JR, Loves WJP, van der Wilt CI, Alvarez E, Talianidis I, Boven E, et. al. Pretreatment Deoxycytidine Kinase Levels Predict in Vivo Gemcitabine Sensitivity. Mol. Cancer Ther. 2002; 1: 371-376.

Kwon WS, Rha SY, Choi YH, Lee JO, Park KH, Jung JJ, et. al. Ribonucleotide reductase M1 (RRM 1) 2464 G>A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines. Pharmacogenet. Genomics. 2006; 16: 429-438.

Lane J, Martin TA, McGuigan C, Mason MD, Jiang WG. The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. J Exp Ther Oncol. 2010; 8: 203-10.

Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance. Cancer Gene Ther. 2010; 17: 523-531.

Liu F, Chen X, Allali-Hassani A, Quinn AM, Wigle TJ. Protein lysine methyltransferase G9a inhibitors: design, synthesis, and structure activity relationships of 2,4-diamino-7-aminoalkoxy-quinazolines. Med Chem. 2010; 53: 5844-5857.

Mackey JR, Jennings LL, Clarke ML, Santos Ch, Dabbagh L, Vsianska M, et. al. Immunohistochemical Variation of Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Protein in Primary Breast Cancers. Clin. Cancer Res. 2002; 8: 110-116.

Manome Y, Wen PY, Dong YH, Tanaka T, Mitchell BS, Kufe ES, et.al. Viral vector transduction of the human deoxycytidine kinase cDNA sensitizes glioma cells to the cytotoxic effects of 1-B-D-arabinofuranosylcytosine *in vitro* and *in vivo*. Nat. Med. 1996; 2: 567-573.

Marechal R, Mackey JR, Lai R, Demetter P, Peeters M, Polus M, Cass CE, Salmon I, Deviere J, Van Laethem JL. Deoxycytidine kinase is associated with prolonged survival after adjuvant gemcitabine for resected pancreatic adenocarcinoma. Cancer. 2010; 116: 5200-6..

Mini E, Nobilli S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. Ann. Oncol. 2006; 17 (Suppl 5): v7-v12.

Nyce J. Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance in human tumors. Cancer Res. 1989; 49: 5829-5836.

Nyce JW. Drug-induced DNA hypermethylation: a potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. *Mutat. Res.* 1997; 386: 153-161.

Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, Ozasa H, Sato S, Shimizu S, et. al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2007;256: 112—119.

Ohhashi S, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Egami T, Yu J, et.al. Down-regulation of deoxycytidine kinase enhances acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2008; 28: 2205-2212.

Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 6790- 6796.

Paproski RJ, Wuest M, Jans HS, Granam K, Gati WP, McQarrie S, McEwan A, Mercer J, Young JD, Cass CE. Biodistribution and Uptake of 3'-Deoxy-3'Fluorothymidine in ENT1-knockout Mice and in an ENT-1 Knockdown Tumor Model. *J Nucl Med.* 2010; 51:1147-51..

Park JY, Helm JF, Zheng W, Ly QP, Hodul PJ, Centeno BA, et.al. Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2008;36: 32-39.

Peters GJ, Hodzic J, Ortega B, Giovannetti E, Adema AD, Broekhuizen R, Kaspers GJ, Hubeek I. Methylation specific PCR to characterize methylation of the promoter of deoxycytidine kinase. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2010; 29: 408-13.

Provenzano MJ, Fitzgerald MP, Krager K, Domann FE. Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC). *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;137:722-728.

Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: New insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;**13**:263—273.

Rosell R, Danenberg KD, Alberola V. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin- treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 1318-1325.

Sandler AB, Nemunaitis J, Denham C, von Pawel J, Cormier Y, Gatzemeier U, et. al. Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin vs cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 122-130.

Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Cass CE, Vasile E, Manazza AD, Catalano V. Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) Levels predict Presponse to Gemcitabine in Patients with Biliary Tract Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 123-9.

Schirmer M, Stegmann AP, Geisen F, Konwalinka G. Lack of cross-resistance with gemcitabine and cytarabine in cladribine-resistant HL60 cells with elevated 5'-nucleotidase activity. *Exp Hematol*. 1998; 26:1223-8.

Schotta M, Lachner M, Sarma K. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*. 2004;**18**:1251–1262.

Shutoht M, Oue N, Aung PP, Noguchi T, Kuraoka K. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric carcinoma: expression of the retinoid acid receptor beta, cellular retinol-binding protein 1, and tazarotene induced gene 1 genes is associated with DNA methylation. *Cancer*. 2005; 104: 1609-1619.

Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viquiera B, Kulesza P, Yeo CH, Hidalgo M, et. al. Immunohistochemical and Genetic Evaluation of Deoxycytidine Kinase in Pancreatic Cancer: Relationship to Molecular Mechanisms of Gemcitabine Resistance and Survival. *Clin. Cancer Res*. 2006; 12: 2492-2497.

Sève P, Mackey JR, Isaac S, Trédan O, Souquet PJ, Pérol M, et.al. cN-II expression predicts survival in patients receiving gemcitabine for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2005 Sep; 49:363-70

Shutoh M, Oue N, Aung PP, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H, et.al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric carcinoma: expression of the retinoid acid receptor beta, cellular retinol-binding protein 1, and tazarotene-induced gene 1 genes is associated with DNA methylation. *Cancer* 2005;104:1609-1619.

Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat. Res*. 2008; 647: 21-9.

Smid K, Bergman AM, Eijk PP, Veerman G, van Haperen VW, van den Ijssel P, et.a I. Micro-array analysis of resistance for gemcitabine results in increased expression of ribonucleotide reductase subunits. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*. 2006; 25: 1001-1007.

Smith BC, Denu JM. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine. *Biochem. Biophys. Acta*. 2009; 1789: 45-57.

Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, Tripaki M, et. al. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer*. 2008; 98:1710-5.

Sparmann A van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006;6:846–856.

Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet Ch, et. al. The Absence of Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Is Associated with Reduced Survival in Patients With Gemcitabine-Treated Pancreas Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 6956-6961.

Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer*. 2010; 116: 5325-35.

Thiriet C, Hayes JJ. Functionally relevant histone-DNA interactions extend beyond the classically defined nucleosome core region. *J. Biol. Chem*. 1998;273:21352-21358.

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J. Clin. Oncol*. 2000; 18:3068-3077.

Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 39990-40000.

Wozniak RK, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'deoxyctidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*. 2007; 26: 77-90.

Xu X, Strimpakos AS, Saif MW. Biomarkers and pharmacogenetics in pancreatic cancer. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011. *JOP*. 2011; 12: 325-9.

Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, Yamamoto N, Ikeda M, Saijo N, et. al. Severe Drug Toxicity Associated with a Single-Nucleotide Polymorphism of the *Cytidine Deaminase* Gene in a Japanese Cancer Patient Treated with Gemcitabine plus Cisplatin. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11:2620-2624.

Zhou X, Ma H. Evolutionary history of histone demethylase families: distinct evolutionary patterns suggest functional divergence. *BMC Evol Biol.* 2008;8:294.

Zucali PA, Ceresoli GL, Garassino I, De Vincenzo F, Cavina R, Campagnoli E, et. al. Gemcitabine and vinorelbine in pemetrexed-pretreated patients with malignant pleural mesothelioma. *Cancer.* 2008;112(7):1555-61.