

Tratamiento hipometilante de los Síndromes Mielodisplásicos. De la fisiopatogenia y la farmacología a la práctica clínica

Marcelo Iastrebnier, Alejandro Flores, Silvia Benasayag

Los autores agradecen a Julieta Muller por su importante aporte

*«(...) la hipometilación sólo sería un paso importante y
quizás necesario para obtener respuestas clínicas (...)»*

Oki Y. JCO 2005; vol 23

Fecha de recepción: 15/12/08

Fecha de aprobación: 27/04/09



REVISIÓN

HEMATOLOGÍA, Vol. 13 N° 1: 16-28
Enero-Abril, 2009

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos tratamientos altamente eficaces que presentan menores efectos secundarios para el paciente plantea un quiebre respecto a la terapéutica oncológica tradicional. Por un lado, ofrecen una mayor expectativa de supervivencia y una mejor calidad de vida; por el otro, alcanzan a un mayor número de enfermos.

Si bien estas terapias significan un verdadero avance de la ciencia en el arte de curar, las investigaciones respecto a los mecanismos intrínsecos que explican su real efectividad no han sido aún tan contundentes y muestran una verdadera brecha de conocimientos. En el escenario actual, este punto plantea grandes controversias, funcionando como un gran estímulo para muchas investigaciones que se realizan actualmente y que posibilitan vislumbrar ya prometedores resultados.

El presente trabajo analizará, en este sentido, una forma nueva de tratamiento oncológico, la **terapia epigenética**, que reestablece químicamente la expresión génica y permite recuperar funciones celulares perdidas.

Los cambios epigenéticos son modificaciones potencialmente reversibles de la expresión del ADN, pueden ser transmitidos desde una célula a su progenie y suceden sin que la secuencia ni la estructura de la doble cadena helicoidal se vea alterada¹. Cuando un gen se hipermetila, éste no se expresa y su función no se lleva a cabo. En los Síndromes Mielodisplásicos (SMD), por ejemplo, es frecuente encontrar hipermetilado al gen p15 que codifica una proteína reguladora del ciclo celular y asociado a una probable progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA)^{2,3}.

Estudios de fase I, II y III demostraron que los agentes hipometilantes (DNMTi), como azacitidina

(5-Aza) o decitabina (5-2'-DAC), han logrado resultados favorables para un grupo de pacientes con SMD^{4,5,6,7}.

A los fines expositivos este artículo desarrollará en el punto 1 los conceptos generales y el rol de la metilación en los seres vivos, mencionando los distintos tipos de metiltransferasas y explicando el funcionamiento del aparato transcripcional; en el punto 2 se señalarán los cambios importantes en los niveles de metilación en células cancerosas; en el punto 3 se presentarán las distintas características de las drogas hipometilantes, resaltando su metabolismo y modo de acción; en el punto 4 se describirán los métodos de estudio de la metilación del ADN; en el punto 5 se desarrollarán los conceptos generales de hipometilación y las controversias históricas; finalmente en el punto 6 se hará un análisis de los distintos ensayos clínicos que antecedieron a la actual terapia epigenética.

1. METILACIÓN DEL ADN: GENERALIDADES

La metilación es una reacción química en donde un metilo (CH_3) se adiciona a una molécula. Según el tipo de molécula puede o no tener connotaciones funcionales diferentes. Si se trata de la molécula del ADN, podría ocurrir un cambio epigenético, esto se lograría propiciando la estructura «cerrada» de la cromatina e impidiendo la unión de factores de transcripción.

Este proceso ocurre en todos los seres vivos (ya sea procariotas o eucariotas). En los organismos inferiores (como la drosófila, hongos, etc.) esta reacción química suele ser pobre o casi nula.

La metilación del ADN es llevada a cabo por la ADN Metiltransferasa (DNMT), que cataliza la adición covalente de un grupo metilo a la posición 5' de

la citosina del dinucleótido CpG (frecuente en áreas promotoras del gen). Dicho metilo proviene de un donante habitual que es la S-adenosilmetionina.⁸ Una vez metilado el ADN, éste es mantenido en estas condiciones por la acción de las DNMTs, que reconocen zonas promotoras del ADN recientemente sintetizado, permitiendo que los cambios epigenéticos puedan pasar a las células hijas, ya sea somáticas (mitosis) o gametas (meiosis).

Existen zonas muy extensas del genoma que al estar metiladas son transcripcionalmente inertes. Si fallara este mecanismo de silenciamiento, elementos repetidos de distinta longitud, secuencias virales insertadas y transposones (segmentos del ADN con capacidad de migrar dentro del genoma) dañarían a la célula.

Entre otras funciones, la metilación tendría un rol importante en el *Imprinting* (patrón de metilación que proviene del progenitor materno o paterno), en la inactivación del cromosoma X en mujeres (X-inactivación), en la modulación de la estructura de la cromatina y en la supresión de elementos transferibles (transposones).^{9,10}

Existen 3 proteínas activas diferentes, DNMT1, DNMT3A y la DNMT3B que han demostrado tener actividad catalítica en células de mamíferos.^{11,12} La variante DNMT3L es otro tipo de enzima de la misma familia sin actividad similar, pero que ha demostrado ser estimuladora de la actividad catalítica de la DNMT3A y DNMT3B.

Recientes estudios sugieren que el status de metilación del ADN está determinado y sostenido por un mecanismo complejo en donde las DNMTs interactúan entre sí y éstas a su vez con otras enzimas como las Histonas Deacetilasas (HDACs).^{13,14,15,16}

La DNMT1 es la más abundante, se la denomina DNMT «de Mantenimiento». Cumple funciones en la división celular, en la reparación del ADN y también es importante en la embriogénesis. Las DNMT 3A y 3B son principalmente responsables de la metilación durante la embriogénesis y se las denomina DNMT «de novo».

La DNMT1 es la principal enzima en el cáncer. Aparentemente, tanto las DNMT1, 3A y 3B son complementarias, cuando falta una, la otra la puede reemplazar funcionalmente. Las DNMT 2 y 3L no son funcionales.

El mecanismo involucrado en la metilación de regiones promotoras consiste en:

a) Activación de puentes de unión entre proteínas portadoras de metilo (MBPs, Methyl binding proteins, ej. MeCP2) y el ADN; aproximación de HDACs e histonas y, en consecuencia, modificación de la estructura de la cromatina hacia una forma condensada. El «empaquetamiento» de la cromatina previene

que la ARN polimerasa tenga acceso a la región promotora del gen, logrando el silenciamiento del mismo.^{1,2,17}

b) Desacetilación de las histonas que dispararía aún más metilación a través de un *feedback* positivo, reforzando el silenciamiento génico. Como consecuencia, el silenciamiento a través de la metilación y reforzado por la desacetilación es esencialmente estable una vez constituido y sólo puede ser reajustado («resetado») en la embriogénesis temprana.^{18,19}

La cromatina (ADN) junto con un grupo de histonas constituyen los nucleosomas. Están separados y distribuidos de tal manera que permiten el ingreso de proteínas que favorezcan la transcripción, como ser HAT (histonas-acetil transferasa), CA (proteínas coactivadoras), y FT (factor transcripcional). Las DNMTs y las MBPs facilitan a las HDAC a encontrar los sitios que deben ser silenciados.

Vale resaltar que la metilación es el mecanismo más importante del silenciamiento, mientras que la desacetilación, un complemento. (Figura 1)

2. CÁNCER Y METILACIÓN DEL ADN

En el genoma tumoral es habitual encontrar un patrón aberrante de metilación. La metilación global suele estar disminuida y en algunas regiones, hipermetilada.^{1,2}

Diferentes enfermedades malignas tienen genes hipermetilados; por ejemplo, la metilación del gen Rb1 en el retinoblastoma; el gen VHL en el carcinoma renal; y el gen p15ink4b en enfermedades hematológicas. Otros genes involucrados pueden ser: E-caderina, MGMT, p16ink4a y el ER.²⁰

Como dijimos, cada tipo de cáncer tiene un patrón aberrante de metilación. Con las nuevas técnicas de estudio -como las micromatrices- estos patrones constituyen entidades patológicas bien definidas denominadas «Fenotipos de metilación de las Islas CpG» (*CpG Island methylation phenotype or CIMP*).

En LMC y LLA la metilación del ADN aumenta a medida que la enfermedad avanza, asociándose generalmente a un mal pronóstico.^{21,22,23}

A continuación (Cuadro 1), se mencionan algunas rutas metabólicas (*pathways*) afectadas por la hipermetilación del promotor en cáncer:

Varios estudios han detectado altos niveles de DNMTs en células cancerígenas,^{24,25,26,27} algunos han descrito que altos niveles de expresión genética de DNMT 3A y 3B se asocian a un mal pronóstico en LMA.²⁸

La expresión de DNMTs está regulada por el estado de crecimiento de las células; por ejemplo, aquellas con rápida división son las que tienen mayor expresión de DNMT.

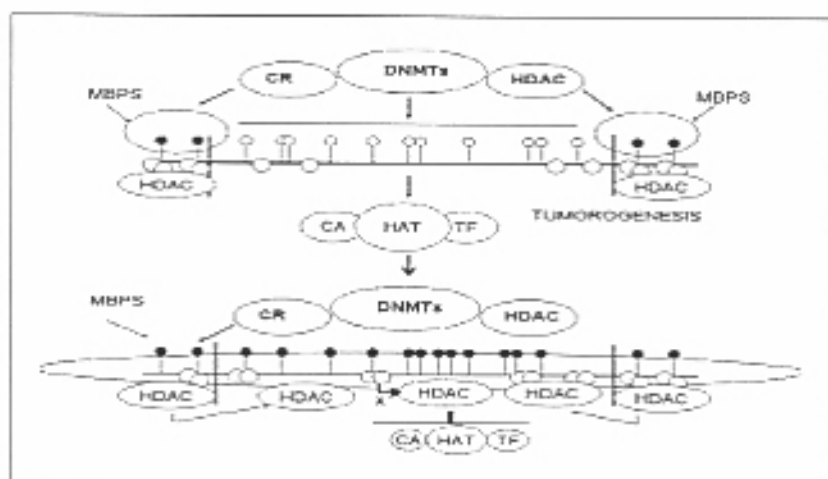


Fig. 1.- Mecanismo de silenciamiento o activación de genes en células normales y/o tumorales. Activación de genes: CA (co-activador), HAT (Histona Acetil Transferasa), dinucleótido CpG no metilado. Silenciamiento de genes: CR (co-represor), DNMT (ADN Metil Transferasa), HDAC (Histona Deacetilasa), MBPs (proteínas fijadoras de metilo, ej. MeCP2) y dinucleótidos CpG metilado. Fig. basada en NEJM 2003;349(21):2042-54 (16)

CUADRO 1

Rutas Metabólicas	Gen
1.- Control del ciclo celular	Rb, p16, p15, p14, p73
2.- Reparación del ADN	MLH1, 06-MGMT, GST-P, BRCA-1
3.- Apoptosis	DAP Kinase, caspasa 8, THS-1
4.- Respuesta a factores de crecimiento	ER, RARbeta, SOCS-1 (JACK-STAT)
5.- Invasión tumoral (MTS)	E-cadherina, DHL, APC, LKB1, TIMP3, THBS1

En un estudio, la sobreexpresión de DNMT1 y 3b se asoció con hipermetilación del p15ink4b en individuos con LMA²⁹. Similares resultados se encontraron en el cáncer gástrico primario y en el cáncer colorrectal en donde la sobreexpresión de DNMT1 se asoció a islas CpG promotoras hipermetiladas.

Sin embargo, los altos niveles de expresión de DNMT1 en los SMD no pudieron ser explicados sólo por presentar p15ink4b hipermetilado,³² ya que también se requeriría la hipermetilación de otros genes.³¹

3. DROGAS INHIBIDORAS DE LA ADN METILTRANSFERASA

Estudios preclínicos sugirieron que los análogos de la citosina, como la 5-AZA o la 5-2'-DAC (figura 2), podrían inhibir la DNMT, revertir la metilación e inducir diferenciación y apoptosis de células cancerígenas.

Comparados con la citosina, ambos inhibidores tienen un nitrógeno en la posición 5' y es allí, en dicha posición, donde se debería unir un metilo (figura 3).

Dentro del compartimiento intracelular, la decitabina es fosforilada por la deoxicitidina quinasa y

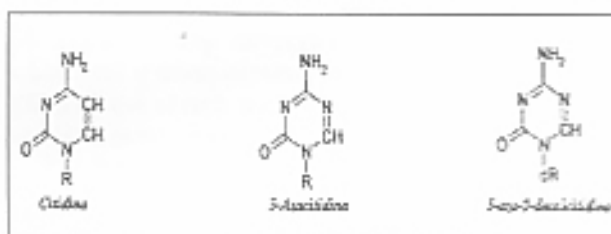


Fig. 2.- Basada en Oncogene (2002) 21, 5483-5495.

su último producto es la decitabina trifosfato que es incorporada al ADN (figura 4).

La incorporación de altas concentraciones de decitabina trifosfato al ADN puede inhibir la síntesis del mismo e inducir «arresto del ciclo celular» (como ocurre con los tratamientos citotóxicos) (figura 5).^{32, 33}

Por otro lado, las bajas concentraciones de decitabina se incorporan directamente al ADN y ocupan el lugar de la citosina. El hipometilante se une covalentemente a la DNMT pero al ser portador de un nitrógeno en la posición 5' no podrá incorporar el metilo a la molécula y se verá involucrada en un proceso denominado «captura» de la DNMT o *Trapping*, que finalizará con su degradación (figura 5).³⁴

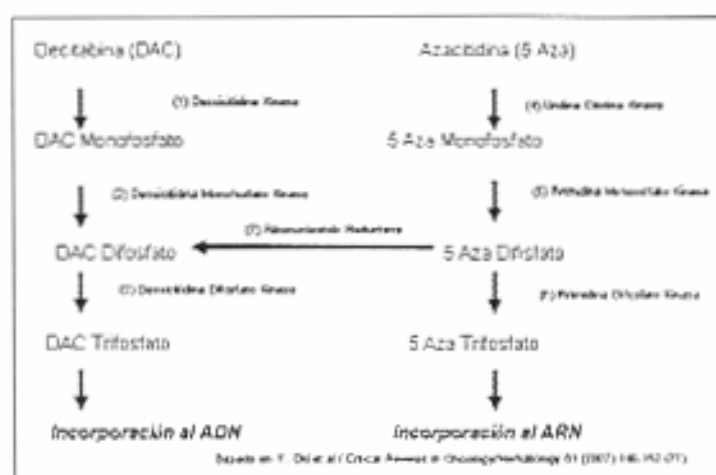


Fig. 3.- Incorporación de la Decitabina y la Azacitidina al ADN o ARN.

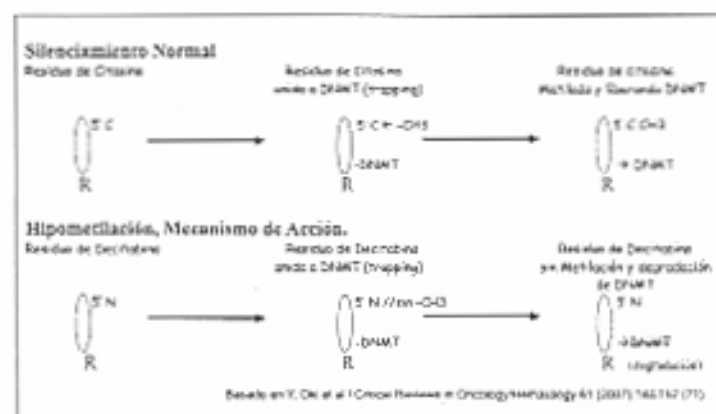


Fig. 4.- Mecanismo de acción de la DNMT y de sus Inhibidores.

Mecanismo de inhibición de las DNMTs. Normalmente las DNMTs forman uniones covalentes con los anillos de citosina y transfieren el grupo metilo desde la S-adenosilmetionina al anillo de citosina. La liberación de las DNMTs del anillo es dependiente de la adición del grupo metilo. Cuando la decitabina es incorporada al ADN, las DNMTs forman un lazo covalente con el anillo de decitabina, pero el grupo nitrógeno en la posición 5' impide la adición del metilo, por lo tanto, de esta manera se previene la metilación y se activa la degradación de las DNMTs.

La replicación del ADN en ausencia de DNMTs es inviable, conduce a la hipometilación global y/o de un gen específico.

La Azacitidina (5-Aza) es un análogo de la citidina, se diferencia de ésta por presentar una modificación (una molécula de nitrógeno en lugar de carbono) en la posición 5' del anillo nucleotídico. Se fosforila intracelularmente y activada por la uridina-citosina quinasa se incorpora principalmente al ARN. De esta manera, inhibe el proceso ribosomal del ARN, desarticula polirribosomas e induce una marcada inhibición de la síntesis proteica (traducción).³⁵ La 5-Aza es reducida por la ribonucleótido reductasa a Decitabina Difosfato, luego a trifosfato para, finalmente, incorporarse al ADN.³⁴

Ambos hipometilantes se inactivan por deaminación a través de la deaminasa citidina³⁷. La citosina metilada sufre habitualmente una deaminación espontánea a timidina –menos frecuentemente a uracilo–, de esta manera, pueden formarse uniones C - T que, si no son reparadas a tiempo, serían mutagénicas.

Como se explicó anteriormente, la ausencia de DNMT es inviable. Cuanto menor sea la expresión de DNMT1 en la célula –como sucede en las células con baja tasa de duplicación (habitual en los SMD de bajo riesgo)–, mayor será la citotoxicidad y los eventos adversos esperados al recibir hipometilantes. En los SMD de alto riesgo la tasa de replicación celular es más alta y, por ende, los niveles de DNMTs también estarán aumentados.

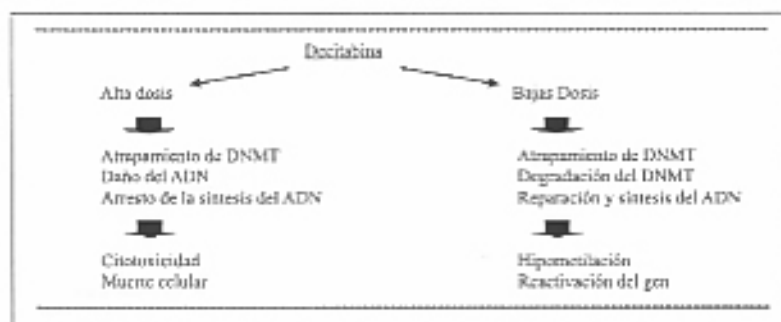


Fig. 5.- Diferentes mecanismos de acción de la alta dosis y baja dosis de la Decitabina. Alta dosis de decitabina causa daño del ADN y arresto de la síntesis del ADN, produciendo citotoxicidad. Baja dosis de Decitabina induce la inhibición del DNMT con mínima citotoxicidad.

Por otra parte, la pérdida de la metilación puede ser tumorigénica por debilitar regiones estructurales del genoma de células somáticas. Un ejemplo sería la pérdida del *imprinting* del gen *IGF2* (*Insulin-like growth factor-2*) de células somáticas o el «Síndrome de inestabilidad centromérica» por mutación de la *DNMT3B*, que se vincula a cánceres denominados «congénitos».

Es importante resaltar la diferencia existente entre una *mutación* y un cambio *epigenético*, la primera es una *falla irreversible*, mientras que el segundo, puede ser revertido.

Al comienzo de los '70, Knudson propuso como hipótesis que el cáncer sería el resultado de mutaciones acumulativas del ADN de una célula. Estudiando el Retinoblastoma, demostró que se necesitaban dos eventos (*two hits*) para que se pierda la actividad del gen, es decir que se requeriría la inactivación de ambos alelos para producir tumor.

La primera mutación podía ser heredada mientras que la segunda, adquirida, o bien ambos eventos podían ser adquiridos somáticamente. Su hipótesis «del doble golpe» quedó confirmada más tarde con nuevos estudios. Se denomina «pérdida de hetero-zigocidad» (*LOH, Loss of heterozygosity*) cuando se pierde el segundo alelo. Esta pérdida de la función de uno o ambos alelos puede darse por diversos mecanismos genéticos como ser delección, mutación, etc.

4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL ADN

Hasta los primeros años de la década del '90, la mayoría de los estudios de metilación del ADN se basaban en técnicas que utilizaban enzimas de restricción (endonucleasas), seguidas por el *Southern Blotting* o «Reacción en cadena de la Polimerasa» (*PCR*).²⁷ Esta última técnica combina la acción de enzimas de restricción seguida de amplificación, y

requiere de alta pureza celular para eliminar errores de interpretación.²⁸

En los últimos años ha surgido una prueba, denominada *Methylation Specific PCR* (*MSP*), que permite el análisis de múltiples áreas metiladas. Esta técnica ha sido extensamente utilizada y ha generado mucha información.

La comprobación de que las áreas amplificadas se encuentran metiladas se puede realizar mediante la técnica de *Bisulfite Sequencing*, con un alto grado de concordancia. El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina (C) no metilados en uracilos (U), mediante deaminación, pero cuando la citosina está metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina.

Los investigadores aprovecharon estas diferencias en la *PCR* para discriminar entre aquellas frecuencias metiladas y no metiladas.²⁹

A continuación, se enumeran diferentes técnicas para estudiar la metilación descritas en la literatura:^{30, 31, 32, 33}

1. La clonación secuencial con bisulfito (*Bisulfite cloning sequencing*). Es utilizada frecuentemente como técnica standard de metilación.³³
2. La *PCR* específica para metilación (*Methylation specific PCR, MSP*).
3. La metilación por *PCR real time* (*MSQPCR, Methyl Light*). Es un método poderoso que permite cuantificar el grado de metilación.³⁴
4. La pirosecuenciación de bisulfito (*Bisulfite pyrosequencing*). Ésta puede adecuadamente cuantificar el grado de metilación de 50 pares de bases.³⁵
5. El análisis de restricción de bisulfitos combinados (*Combined Bisulfite Restriction analyses, COBRA*).^{36, 37}
6. La extensión del primer del nucleótido-simple sensible a la metilación (*Methylation sensitive single-nucleotide primer extension, MS-SNuPE*). Ésta es otra técnica que cuantifica la metilación.³⁸

7. El estudio de los SNP (Polimorfismo Nucleotídico Simple o *Single nucleotide polymorphism*) por *Genotyping array*.

Con el advenimiento de estos últimos, los SNP, se ha logrado aumentar el poder de resolución para detectar aberraciones génicas y reconocer regiones del ADN que contienen UPD (*uniparental disomy*: disomía uniparental), es decir doble dosis de un alelo de un solo progenitor y ausencia del alelo del otro progenitor que suelen estar presentes en el ADN constitucional y que pueden también contener mutaciones y dominancias epigenéticas.

El análisis de los SNP por *Genotyping Array* permite además detectar microdeleciones, no disyunciones mitóticas o aumento de UPD en algunos cromosomas.

5. HIPOMETILACIÓN, CONCEPTOS GENERALES Y CONTROVERSIAS

Mientras que apenas el 1 a 2% del genoma de los eucariotes posee secuencias codificantes (genes) que se transcriben y se traducen expresando proteínas, la gran mayoría del genoma conforma un grupo de secuencias que no son codificantes y se distribuyen de manera dispersa y repetitiva «en tandem» e «intergénicas».

Estas secuencias repetidas pueden ser cortas o largas. Los elementos dispersos cortos, SINEs (*short interspersed nuclear elements*), tienen menos de 500 pares de bases de longitud y se encuentran hasta 500.000 de ellos en el genoma.

Los SINEs presentes en la especie humana mejor caracterizados son un conjunto de secuencias de nucleótidos muy relacionadas llamadas «familia Alu».

Los elementos LINEs, acrónimo del inglés *Long Interspersed Nuclear Elements* (Elementos nucleares dispersos largos), son otra categoría de ADN moderadamente repetido. LINE-1 ó L1 es una secuencia de 6 kb repetidas 800.000 veces de modo disperso por todo el genoma. La familia L1 en humanos tiene 6400 pares de bases de longitud y se estima que hay unos 40.000 en el genoma.⁴⁹

Las Secuencias LINE y los Alu están normalmente metiladas y, como fue expresado anteriormente, pueden ser cuantificadas por métodos como la pirosecuenciación con bisulfito.

Los cambios ocurridos en la metilación de LINE podrían reflejar el estado de la metilación global⁵². Yang y col.⁵¹ examinaron los cambios en la metilación del ADN global y de genes específicos en pacientes con leucemia luego de recibir decitabina y observaron una caída lineal de la metilación dependiente de la dosis. Describieron que la mínima dosis que con-

ducía a la hipometilación era de 5 mg y la máxima de 20 mg/m²/d (al 5to día de tratamiento). No hubo aumento de la hipometilación cuando la dosis superaba los 20 mg/m²/d, sugiriendo un efecto *plateau* a dosis más altas.

En un estudio clínico randomizado fase II con hipometilantes se estudiaron los cambios en la metilación global antes y después del tratamiento.⁵² En este análisis, la decitabina inducía una significativa hipometilación de LINE; como en el trabajo anterior, la mayor actividad también se alcanzó con 20mg/m²/d en el esquema de 5 días.

Al mismo tiempo, se observó que el grado de hipometilación de LINE era similar en pacientes con y sin respuesta clínica. Estos hallazgos sugirieron que la hipometilación de LINE sería un buen marcador del estado hipometilante pero no de respuesta clínica.

Una explicación de esta hipótesis, es que la hipometilación sólo sería un paso importante y quizás necesario para obtener respuestas clínicas. En este estudio se demostró además que la metilación global se recupera a las 4 semanas después de recibir Decitabina, pero no completamente.

Más aún, con los sucesivos ciclos de tratamiento, nunca se logró una completa hipometilación (ausencia de metilación en LINEs).⁵²

En un estudio de fase II con pacientes portadores de LMC resistentes a Imatinib, la metilación de los LINE 1 fue evaluada con la técnica de bisulfito-pirosecuenciación antes del tratamiento, en el día 5, día 12 y durante la recuperación en sangre periférica⁷. La metilación de LINE 1 disminuyó rápidamente después del tratamiento, alcanzando un promedio del 16% de cambio al día 12 y, recuperándose entre la 4ta y la 6ta semana de suspendida la decitabina. La metilación de los LINE 1 en el día 5 no se correlacionó con las respuestas clínicas subsecuentes.

En cambio, en el día 12, la disminución de la metilación en pacientes respondedores fue del 14.5%, mientras que en los no respondedores fue del 26% ($p=0.007$). Esta correlación inversa e inesperada en el día 12 fue atribuida a la activación de un mecanismo de muerte celular, en el cual células resistentes pueden aceptar mayor hipometilación sin lograr el efecto clínico esperado.⁷ Hallazgos similares fueron descritos en otros trabajos.^{53,54}

Permanece aún sin respuesta el hecho de que la demetilación del p15 solamente pueda ser suficiente para explicar algún tipo de respuesta clínica.

La demetilación de este promotor utilizando decitabina fue también estudiada por técnicas de pirosecuenciación en tres trabajos correlativos^{50, 51, 52}. En estos ensayos clínicos, 32 de 124 pacientes presenta-

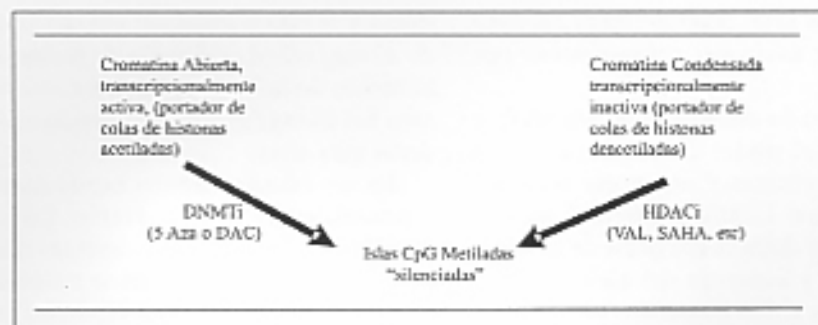


Fig. 6.- Control de la expresión génica.

ban el gen p15 hipermetilado; dichos pacientes tuvieron una tasa de respuesta clínica más baja pero no significativa ($p=0.31$).

En los SMD estudiados, aquellos pacientes que alcanzaron la remisión completa parecieron tener mayor demetilación del p15 cuando fueron comparados con los que no obtuvieron respuesta clínica. Estos últimos eran portadores de distintos grados de metilación y presentaban remetilación rápida pasado el día +10.

Sin embargo, cabe comentar nuevamente que el status de metilación durante la recuperación en sangre periférica puede reflejar no sólo el efecto demetilante de la droga en células previamente hipermetiladas, sino también el reemplazo de células clonales del SMD por células hematopoyéticas normales que no llevan el p15 hipermetilado.

En un estudio fase III, utilizando decitabina en pacientes con SMD,⁵⁹ se encontró que la hipermetilación de promotores que incluían p15 y E-cadherin esta vez sí se correlacionaba significativamente con sobrevida acortada.

En el mismo estudio, el status de metilación fue evaluado a los 3 y 6 meses de finalizado el tratamiento hipometilante y se observó que los pacientes con SMD tendían a ganar metilación con el tiempo, comparado con los que recibían decitabina permanentemente. Dicha hipometilación se correlacionaba con buena respuesta clínica. Estos hallazgos plantean la necesidad de un tratamiento de mantenimiento.

Utilizando Azacitidina en pacientes con tumores relacionados al Epstein Barr virus y extrayendo sangre a las 72 hs. de concluir el 1° ciclo de tratamiento, se observó un importante nivel de hipometilación en los promotores del genoma viral latente. Como consecuencia de dicha hipometilación, se especuló con que el hipometilante tendría un efecto reactivante viral.⁵⁹

Al contrario de lo presentado hasta acá, recientemente Lubber y col. demostraron que la recuperación granulopoyética post tratamiento hipometilante era

debida a la aparición de células granulocíticas no clonales, correspondientes a hematopoyesis normal. Descartaron la acción diferenciadora del hipometilante como principal mecanismo de acción y atribuyeron la respuesta clínica obtenida a la citoreducción del clon mielodisplásico por inhibición del crecimiento o apoptosis más que por diferenciación en sí.⁵⁷

Scott y col. concluyeron que la reexpresión del gen p21 luego del tratamiento con decitabina podría ser explicada no sólo por la hipometilación en sí, sino también por la actividad de la HDACi (figura 6).^{58, 59, 60}

Es posible que el hipometilante induzca respuestas inmunológicas, como sucede con la expresión de antígenos en el cáncer de testículo que, de ser así, por ejemplo la combinación con inmunomoduladores podría ser una terapéutica potencial.⁵⁰

6. ESTUDIOS CLÍNICOS

Realizando una síntesis de lo hasta aquí presentado, se reafirma que:

Las principales modificaciones epigenéticas se producen en el ADN y en las Histonas a través de las reacciones llamadas *metilación y/o desacetilación*. Los cambios epigenéticos afectan a los nucleosomas, estructuras dinámicas constituidas por Histonas y ADN.

Por otro lado, las moléculas acetiladas permiten la expresión génica, son «permisivas» y se encuentran en equilibrio con las moléculas «no permisivas» o desacetiladas.

Estas últimas están reguladas principalmente por dos enzimas: la Histona Acetil Transferasa (HAT) y la Histona Deacetilasa (HDAC). Existen varios subtipos de HDACs (potenciales objetivos terapéuticos) y la regulación del control epigenético del ADN se lograría, entre otros mecanismos, por inhibición de la metilación con drogas Hipometilantes, o por acción de drogas Inhibidores de la Desacetilación (HDACi).

La 5-Azacitidina se incorpora sobre el ARN y, por acción de una ribonucleótido reductasa, al ADN (esta última enzima puede ser inhibida por la Hidroxiurea); mientras que la decitabina actuaría directamente sobre el ADN.

En tres estudios clínicos del CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) que utilizaron 5-Azacitidina en un total de 193 pacientes con SMD, y en un estudio francés, la respuesta global promedio fue mayor del 40%, considerando las respuestas completas, parciales y mejorías hematológicas.^{23,29} El 75% de las respuestas ocurrieron promediando el 4to ciclo. Los efectos adversos fueron neutropenia, trombocitopenia, eritema local, infecciones en un promedio de 20 a 58% y, una mortalidad vinculable a la terapéutica de <1%. Se describió un aumento estadísticamente significativo de la sobrevida con 5-Azacitidina versus terapia de soporte. Este efecto se magnificó en pacientes >65 años con SMD de alto Riesgo.³¹

Con respecto a la decitabina, estudios en fase II y III, utilizando protocolos de infusión de 3 y 5 días respectivamente, presentaron los siguientes resultados: en 162 pacientes evaluables (4 estudios) la respuesta global promedio fue similares al anterior: 40% (contabilizando respuestas completas, parciales y mejorías hematológicas). En los estudios de fase III con 5 días de infusión se obtuvieron las mejores respuestas.^{31,32,36,37} La principal complicación de esta droga fue la mielosupresión, seguida por dolores óseos y disfunción hepática transitoria. Una diferencia estadísticamente significativa se hizo muy evidente en los grupos de riesgo INT-2 y Alto cuando se los comparó con pacientes que recibían sólo terapia de soporte.³²

En otro estudio en donde se comparó quimioterapia intensa versus decitabina, los resultados fueron significativamente favorables al segundo.³² La mayor parte de las respuestas alcanzadas con decitabine se logró con un promedio de 2 ciclos.³³

Los inhibidores de las histonas deacetilasas constituyen otra alternativa terapéutica. Este es un grupo heterogéneo de drogas (MS 275, Depsis-Péptido, Vorinostat o SAHA, MGCD 0103, LBH589 y Ácido Valproico) con respuestas clínicas muy variadas del 10 a 24% en leucemias asociadas a SMD.

Las combinaciones entre DNMTi e HDACi tendrían mayor actividad clínica que las monodrogas.³⁴ Estudios clínicos combinando hipometilantes con agentes dirigidos a otras rutas metabólicas epigenéticas, particularmente hipometilantes con inhibidores de las HDACs,³⁵ han abierto una fuerte expectativa y se encuentran actualmente en desarrollo.

La combinación de decitabina con ácido valproico se ha estudiado en LMA y SMD con una tasa de respuesta del 22%.³⁶

La azacitidina fue también evaluada con fenilbutirato (inhibidor de la HDAC), mostrando resultados prometedores en neoplasias mieloides.³⁷

Como fue expresado más arriba, la sinergia entre decitabina y ácido valproico (VAL)³⁸ en estudios fase I y fase II muestran efecto antileucémico pero con toxicidad neurológica.

En general, bastó con 1 a 3 ciclos para alcanzar algún tipo de respuesta clínica,^{33,35,36,37} la dosis máxima de VAL tolerada en estos estudios fue de 50 mg/kg, siendo ésta la limitación para su uso. La respuesta global obtenida fue de 22% promedio y la duración de la misma de 5.6 meses (R 2-10). Lo destacable de este sinergismo, fue la rápida respuesta lograda.

En estos ensayos, el 60% de los pacientes eran portadores de cariotipo de mal pronóstico y obtuvieron algún tipo de respuesta con la combinación.

Especialmente los pacientes con monosomía 7 fueron los más beneficiados con esta combinación. Soriano y col.³⁶ han publicado que con la combinación de 5 AZA + ATRA + VAL, se obtienen respuestas globales de aproximadamente 42% con sólo 1 a 3 ciclos y observaron que las respuestas eran superiores cuando los pacientes no habían sido tratados previamente.

En el trabajo de Ziyi Lim y col.³⁶ utilizando 5-Aza en 31 pacientes con monosomía 7 sola o combinada con otras alteraciones genéticas, mostraron una tasa de respuesta global del 34% con una sobrevida global (SG) media de 19.8 meses. Los pacientes que lograron remisión citogenética completa presentaron una sobrevida global mejor.

Steensma DP y col.³⁷ publicaron respuestas globales a esquemas con decitabina de 5 días (estudio en fase II) del 30%.

En otra serie de 66 pacientes publicada por Aziz AR,³⁸ con el esquema de 3 días de decitabine, obtuvieron una tasa de respuesta de 25, 48 y 64% en pacientes con riesgo Int-1, Int-2 y Alto respectivamente. La media de sobrevida del grupo de Alto Riesgo fue de 1,2 años significativamente mayor que con tratamiento de soporte. Esta serie incluye un caso anecdótico de un paciente de 82 años con Anemia Refractaria con exceso de Blastos-2 con alto requerimiento transfusional de glóbulos rojos y plaquetas, previamente tratado sin éxito con Lenalidomide y 5-azacitidina.

Estey E. y col.³⁹ utilizando el esquema de decitabina por 5 días en SMD o LMA, en pacientes que habían recibido ≥ 4 cursos de Decitabina, 6/10 lograron RC después del 3er. ciclo sugiriendo no dar más de 3 ciclos una vez alcanzada la RC.

Figueroa M. y col.⁴⁰ evaluaron la metilación de 24.000 promotores génicos en 13 pacientes con SMD, 16 pacientes con LMA y 8 individuos normales. Uti-

TABLA 1. – Estudios Clínicos en SMD con hipometilantes a dosis epigenéticas

Fase	Agente/dosis del protocolo	Número de enrolados (enfermedades)	Resultados	Autores
I	.5-Aza: 10 a 35 mgs/m2 en infusión continua por 14 días	15 (SMD)	ORR 20% (3/15) PR20% (3)	Chitambar y col Ref 72
I	.DAC 45 mgs/m2 o 50 mgs/m2 EV en 4 hs 3 v/día por 3 días	10 (SMD)	CR 40% (4/10)	Zagonel y col Ref 73
I	.DAC 5, 10,15 y 20 mgs/m2 EV 5 días/semana por 2 semanas	50 (SMD, LMA, LMC, LLA). Mejor respuestas en la cohorte de 10 mg/m2	ORR 32% (16/50) CR 18% (9) PR 2% (1) HI 8% (4)	Issa JP y col. Blood 2004 Ref 5
II	5-Aza: 75 mgs/m2 SC/día por 7 días c/ 4 semanas	43(SMD)	ORR 49% (15/43) CR 12% (5) PR 25% (11) HI 12% (5)	Silverman y col. Ref 74
II	DAC 50-75 mgs/m2 por IC EV por 72 hs cada 6 semanas	29 (SMD)	ORR 54% (15/29) CR 27% (8) PR 17% (5) HI 7% (14%)	Wijermans y col. Ref 75
Ensayos randomizados Fase II	DAC: 20 mgs/m2/día por 5 días 20 mgs/m2/día SC por 5 días 10 mgs/m2/día por 10 días	95 (77 SMD, 18 LMMC)	CR 34% (32/95) PR 1% (1) HI 14% (13%)	Kantarjian y col. Ref 76
Fase III	5-Aza 75 mgs/m2 SC por 7 días cada 28 días vs soporte hematológico	191 (SMD)	ORR 60% (60/99) CR 7% (7) PR 16% (16) HI 37% (37)	Silverman y col. Ref 77
Fase III	DAC 15 mgs/m2 cada 8 hs por 3 días cada 6 semanas vs soporte hematológico	179 (SMD)	ORR 17% (15/89) CR 9% (8) PR 8% (7) HI 13% (12)	Kantarjian y col Ref 62

Tabla 1 Abreviaciones: 5AC, 5'-azacitidina; DAC, 5'-aza-2'-Deoxicitidina; ORR: Tasa de respuesta global; CR: Respuesta completa; PR: Respuesta parcial; HI: Mejoría hematológica; IV: intravenosa; SC: Subcutánea; ALL, Leucemia linfoblástica Aguda; CML, Leucemia Mieloide Crónica; CMML, Leucemia Mielomonocítica Crónica.

- La hipometilación a dosis terapéutica, en general, se correlaciona con respuestas clínicas.

- Dado que si superamos la dosis máxima de decitabina no se logra mejores resultados (*plateau*), y hasta pueden empeorar, se infiere que la citotoxicidad no sería la llave del mecanismo de acción de esta droga, sino más bien la inhibición de la DNMT y sus consecuencias.

- Permanece aún sin aclarar cuál es el evento más importante de la cascada de activación de las DNMTs. Posiblemente, incluye la activación de genes supresores tumorales, de otros genes independientes de la hipometilación, de la inmunomodulación, de retrotransposones (acúmulo de material genético que controla funciones celulares y son transferibles) y mecanismos como la apoptosis, diferenciación, senescencia, etc.

lizando micromatrices, observaron que existía un número significativamente mayor de promotores metilados en pacientes con SMD en comparación con LMA y/o individuos normales. La «firma molecular» o patrón de micromatrices mostró metilación aberrante en 736 genes (incluyendo p16, CEPBZ, MSH2, AKT1, Caspasa 3, etc.) comparados con las células pro-genitoras normales. Una significativa proporción de genes metilados estaban subexpresados, incluyendo p16, DAP, BMP3, HOXA2 y HOXB8. Por lo que quedó muy remarcado el rol auspicante que tienen las drogas hipometilantes en los SMD.

Kantarjian H. y col.^{51,52} describieron resultados favorables en una población de mal pronóstico utilizando decitabina por 5 días. La remisión completa se obtuvo en el 39% de los pacientes, la respuesta global fue del 81% y el tiempo medio para alcanzar algún tipo de respuesta fue de 2,3 meses. Los efectos adversos fueron leves y manejables sin compromiso extramedular grado 3 ó 4.

Desde el punto de vista histórico, la decitabina fue inicialmente desarrollada como agente antitumoral y evaluada en ensayos clínicos fase I y II en dosis más altas que las actuales. Se la estudió en tumores sólidos incluyendo melanoma, carcinoma colorectal, de cabeza y cuello, renal, testicular y de ovario. En contraste a los pobres resultados en estos tumores, se observó actividad antitumoral significativa en enfermedades hematológicas malignas.

La respuesta global en Leucemia Aguda pediátrica en recaída fue de 37%, con RC de 22%.⁴⁰

La mielosupresión severa fue siempre la toxicidad principal observada. Con el uso de bajas dosis en hemopatías se obtuvo actividad hipometilante sin citotoxicidad.

Las respuestas megacariopoyéticas suelen ser significativas y pueden ser observadas desde el primer ciclo en algunos pacientes. Se pueden obtener respuestas citogenéticas $\geq 31\%$ después de recibir un promedio de 3 ciclos.

Un ensayo en Fase III en donde los pacientes eran randomizados, ya sea para recibir decitabina o tratamiento de soporte,⁴² la tasa de respuesta global fue de 17% con 9% de RC y la duración media de la respuesta fue 10.3 meses (Rango 4.7-12.4 meses). La rama correspondiente al tratamiento de soporte no tuvo respuestas y se correlacionó con una peor calidad de vida. Optimizando los esquemas terapéuticos con decitabina, en un ensayo randomizado en fase II,⁴³ basado en los criterios modificados del IWG,⁴⁴ se utilizó 100 mg/m²/por curso, en infusión intravenosa (iv) de 1 hora diaria, durante 5 días y ciclos de 4 semanas. La remisión completa (RC) obtenida fue de 39%. Se compararon 2 esquemas distintos al mencionado, uno de 10 días (iv) y otro subcutáneo

de 5 días pero las respuestas alcanzadas con los 2 esquemas últimos mencionados no fueron superiores.

La azacitidina tiene una potencia hipometilante tan eficaz como la decitabina,^{45,46} ambas requieren entre 2 y 5 cursos repetidos para obtener respuesta clínica.

Se especula que la efectividad de los hipometilantes esté basada en el efecto de diferenciación sobre las células displásicas estromales o hematopoyéticas normales.

Por otro lado, esta terapéutica hipometilante en neoplasias hematológicas pareciera tener mayor eficacia en la estirpe mieloide que en la linfóide.⁴⁷

Las drogas que inhiben las HDAC sinergizan y aumentan la hipometilación pero no la inducen salvo que utilizemos previamente un hipometilante.

El Dr. Pierre Fenaux⁴⁸ publicó resultados satisfactorios utilizando 5'-Aza. Demostró que puede prolongar la sobrevida media de pacientes con SMD de alto riesgo comparados con pacientes que recibieron el mejor tratamiento de soporte. Los de peor pronóstico que recibieron 5-aza tuvieron una sobrevida de 17.2 meses, mientras que el grupo que recibió soporte solamente tuvo una sobrevida de 6 meses. En el mismo estudio, el grupo riesgo Intermedio alcanzó los 26.3 meses versus 17 meses para el grupo de soporte.

Con respecto a trasplante de médula ósea en los SMD, Rossetti JM y col.⁴⁹ demostraron utilidad de bajas dosis de 5-Aza en pacientes recaídos post-trasplante de médula ósea (se utilizó 25mg/m²/d durante 5 días), la respuesta hematológica fue evidentemente favorable.

Por otro lado, Teresa Field y col.⁵⁰ obtuvieron buenos resultados administrando azacitidina antes del trasplante de médula ósea. La 5-aza permitiría llegar en mejores condiciones al trasplante debido a la reducción de blastos y a la estabilización de la enfermedad.

En una publicación reciente de EA Griffiths y SD Gore se hace una revisión de los ensayos clínicos del tema (Tabla 1).⁷¹

RESUMEN

- Los estudios hasta aquí mencionados nos permiten afirmar que los hipometilantes son activos en distintas enfermedades hematológicas malignas.

- Hipometilar el p15 no debería ser el objetivo principal, dado que otros genes supresores tumorales podrían intervenir activamente.

- Posiblemente existan otros mecanismos de acción, tal vez relacionados, más allá de la hipometilación, que expliquen los efectos clínicos.

- Sin embargo, vale subrayar aquí que el blanco terapéutico principal de los hipometilantes es la metilación en sí y, secundariamente, los efectos pleiotrópicos mencionados más arriba, como pueden ser los posibles efectos inmunogénicos.

- Durante el tratamiento hipometilante se producen daños colaterales del ADN (*off-target activity* y las *on-target activity*) que podrían afectar otras células no mielodisplásicas.

- Aparentemente, el efecto de la terapia hipometilante no es puramente inductora de diferenciación y el mecanismo de eliminación del clon afectado se encontraría en revisión.

- No hay por el momento, factores predictores de respuesta clínica y/o molecular, los mecanismos de resistencia ocurren en aproximadamente todos los pacientes pero aún su modalidad es desconocida.

- Los resultados obtenidos son satisfactorios y permiten asegurar que estos agentes modificarían la historia natural de algunos pacientes, especialmente la de aquellos con peor pronóstico.

- Existiría una correlación directa entre los genes promotores hipermetilados evaluados por micromatrices y los SMD de alto riesgo con menor sobrevida y performance status.

COMENTARIO FINAL

Si bien el conocimiento de la fisiopatogenia de los SMD es cada vez mayor, los blancos terapéuticos son cada vez más variados y los resultados obtenidos, contundentes; los mecanismos intrínsecos que explican la respuesta a los agentes hipometilantes son aún insuficientes.

Médicos y científicos tienen el gran desafío de encontrar un correlato teórico que anule la actual brecha existente y sustente este importante avance con tratamientos menos cruentos y con excelentes pronósticos tanto en efectividad como en una mejora de la calidad de vida.

Queda pues un largo camino por recorrer, pero la orientación ya está enmarcada con nuevos enfoques sobre esta problemática, tan grave y generalizada en nuestra sociedad actual.

REFERENCIAS

- Jones PA et al. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat rev Genet* 2002; 3(6): 415-28.
- Bhalla KN et al. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *JCO* 2005; 23(17): 3971-93.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1): 6-21.
- Kantarjian HM. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1997;11: 1617-20.
- Issa JP, et al. Phase I study of low dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103(5): 1635-40.
- Kantarjian HM, et al. Results of decitabine therapy in 130 patients with CML. *Cancer* 2003; 98(3): 522-8.
- Issa JP, et al. Phase II study of low dose decitabine in patients with CML resistant to imatinib mesylate. *JCO* 2005; 23(17): 3945-56.
- Herman JG, et al. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *NEJM* 2003; 349(21): 2042-54.
- Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases and cancer. *Oncogene* 2001; 20(24): 3139-55.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet* 2002; 3(9): 662-73.
- Okano M, et al. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA methyltransferases. *Nat Genetic* 1998; 19(3): 219-20.
- Okano M, et al. DNMTs DNMT3a and DNMT3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99(3): 247-57.
- Rountree MK, et al. DNMT1 binds HDAC2 and a new corepressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25(3): 269-77.
- Fuks F, et al. DNMT1 associates HDAC activity. *Nat Genet* 2000; 24(1): 88-91.
- Y. Oki, et al. Decitabine. *Critical Reviews in Oncology: Hematology* 2007; 61: 140.
- Herman JG, et al. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *NEJM* 2003; 349: 2042-54.
- Nan X, et al. transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393(6683): 386-9.
- Bachman KE, et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3(1): 89-95.
- Morgan HD, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005 [14specN°]: R47-58.
- Santini V et al. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001; 134(7): 573-86.
- Issa JP, et al. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(12): 988-93.
- Nguyen TT, et al. Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in CML: biological implications. *Blood* 2000; 95(9): 2990-2.
- Roman-Gomez J, et al. Promoter hypermethylation of cancer related genes: a strong independent prognostic factor in ALL. *Blood* 2004; 104(8): 2492-8.
- Nass SJ, et al. Expression of DNMT and the cell cycle in human breast cancer cells. *Oncogene* 1999; 18(52): 7453-61.
- De Marzo AM, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3855-55.
- Christman JK, et al. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation. *Oncogene* 2002; 21: 5483-95.
- Goffin J & Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors: State of the art. *Annals of Oncology* 2002; 13: 1699-716.
- Girault I, et al. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in sporadic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(12): 4415-22.
- Mizuno S, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3a y 3b in hematopoiesis and in acute and CML. *Blood* 2001; 97 (5): 1172-9.
- Aoki E, et al. Expression levels of DNA methyltransferase genes do not correlate with p15^{INK4b} gene methylation in MDS. *Leukemia* 2003; 25(3): 338-42.

31. Fucks F, et al. DNMT3a binds deacetylases and its recruited by a sequence specific repressor to silence transcription. *EMBO J* 2001; 20(10): 2536-44.
32. Li LH, et al. Phase specificity of 5'-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer research* 1970; 30(11): 2770-5.
33. Li LH, et al. Cytotoxicity and mode of action of 5'-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer research* 1970; 30(11): 2760-9.
34. Creusot F, et al. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5'-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 1982; 257(4): 2041-5.
35. Christman JK, et al. 5-Aza and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21(35): 5483-95.
36. Jones PA, et al. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20(1): 85-93.
37. Pfeiffer GP, et al. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 1999; 246(4931): 810-3.
38. Kazin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* 1991; 55: 451-8.
39. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
40. Shapiro R, et al. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem* 1973; 248(11): 4060-4.
41. Wang RY, et al. Comparison of Bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(20): 4777-93.
42. Clark SJ, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(15): 2990-7.
43. Frommer M, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(5): 1827-31.
44. Eads CA, et al. MethyLight: a high throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(3): E32.
45. Colella S, et al. Sensitive and quantitative universal-pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35(1): 146-50.
46. Sadri R, et al. Rapid analysis of DNA of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(24): 5058-9.
47. Xiong Z, et al. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2532-4.
48. Gonzalo ML, et al. rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation sensitive single nucleotide primer extension (M-SNuPE). *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2529-31.
49. Lewin B, «GENES VIII» DNA structure: chapter 3. Edit Pearson-Prentice Hall Ed.-2004.
50. Sigalotti L, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine treatment of hematopoietic malignancies: a multimodal therapeutic approach? *Blood* 2003; 101(11): 4644-6.
51. Yang AS, et al. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* 2006; 66(10): 5495-503.
52. Oki Y, et al. Hypomethylation induction in MDS after treatment with decitabine at three different doses. *JCO* 2005; 23 (16S) (ab6546).
53. Oki Y, et al. Phase II study of decitabine in combination with imatinib in patients with accelerated (AP) or blastic phase (BP) of CML. *Blood* 2005; 106(11) (ab1099). ASH 2005.
54. Mund C, et al. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with MDS. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7986-90.
55. Shen L, et al. CpG island methylation is a poor prognostic factor in MDS and is reversed by decitabine therapy-results of a phase III randomized study. *Blood* 2005; 106(11) (ab5790). ASH 2005.
56. Chan AT, et al. Azacytidine induces demethylation of the Epstein Barr virus genome in tumors. *JCO* 2004; 22(8): 1373-81.
57. Lubbert M, et al. Non clonal neutrophil responses after successful treatment of MDS with low dose 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leuk res* 2004; 28(12): 1267-71.
58. Scott SA, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine can relieve p21waf1 repression in human AML by a mechanism involving release of HDAC1 without requiring p21waf1 promoter demethylation. *Leuk Res* 2006; 30(1): 69-76.
59. Tatum L, et al. Decitabine: where is the target? *Blood* 2005; 106 (11) abstract 495. ASH 2005.
60. Mottarler RL, et al. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol ther* 1985; 30(3): 277-86.
61. Wijermans P, et al. Low dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high risk MDS: a multicenter phase II study in elderly patients. *JCO* 2000; 18(5): 956-62.
62. Kantarjian H, et al. Decitabine improves patient outcomes in MDS: results of phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106(8): 1794-1803.
63. Kantarjian H, et al. Results of a randomized study of three schedules of low dose decitabine in higher risk MDS and CMML. *Blood* 2007; 109: 52-7.
64. Cheson BD, et al. Clinical application and proposal for modification of the international working group (IWG) response criteria in MDS. *Blood* 2006; 108: 419-25.
65. Yang AS, et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(3): e38.
66. Kaminskas E, et al. Approval summary: azacytidine for treatment of MDS subtypes. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3604-5.
67. Aparicio A, et al. Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors. *Curr Opin Invest Drugs* 2002; 3(4): 627-33.
68. Cameron EE, et al. Synergy of demethylation and HDACi in the reexpression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21(1): 103-7.
69. Garcia-Manero G, et al. Phase I/II study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 2006; 108: 3271-9.
70. Gore SD, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006; 66(12): 6361-9.
71. Elizabeth A Griffiths and Steven D Gore. Epigenetic treatment in MDS. Review. *Semin Hematol* 2008; 45: 23-30.
72. Chittambar CR, et al. Evaluation of continuous infusion low dose 5 azacytidine in the treatment of MDS. *Am J Hematol* 1991; 37: 100-4.
73. Zagonel V, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine induces trilineage response in unfavorable MDS. *Leukemia* 1993; (suppl 1) 7: 30-5.
74. Silverman LR, et al. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with MDS. *Leukemia* 1993; (suppl 1) 7: 21-9.
75. Wijermans PW, et al. Continuous infusion of low dose 5-aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high risk MDS. *Leukemia* 1997; 11: 1-5.
76. Kantarjian H, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low dose decitabine in higher risk MDS and CMML. *Blood* 2007; 109: 52-7.

77. Silverman LR, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with MDS: a study of the cancer and leukemia group B. *JCO* 2002; 20(10): 2429-40.
78. Silverman LR, et al. Further Analysis of Trials With Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group. *JCO* 2006; 24: 3895-903.
79. Fabre et al., Treatment of High Risk MDS and AML Post-MDS with Azacitidine (AZA): Preliminary Results of the French ATU Program. *Blood* 2006;108: abstract 2664 (ASH 2006).
80. Fenaux P et al., Azacitidine (AZA) treatment prolongs overall survival (OS) in higher risk MDS Patients compared with conventional care regimens (CCR): results of the AZA-001 Phase III study. Abstract 817, ASH 2007.
81. Steensma et al. Preliminary Results of a Phase II Study of Decitabine Administered Daily for 5 Days Every 4 Weeks to Adults with Myelodysplastic Syndrome. Abstract 1450, ASH 2007.
82. Kantarjian H et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2007; 109: 899-906.
83. Estey et al. Use of Post-Treatment Clinical Data To Predict Response to decitabine; Abstract 1448, ASH 2007.
84. Gojo et al. Phase I and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leucemias. *Blood* 2007; 109: 2781.
85. Yang H. Methylation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Research* 2005; 29: 739-48.
86. Soriano et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic Blood 2007; 110: 2302-8.
87. Garcia-Manero et al. Phase I/II Study of MGCD0103, an Oral Isotype-Selective Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor, in Combination with 5-Azacitidine in Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Acute Myelogenous Leukemia (AML) Abstract 444, ASH 2007.
88. Ziyi Lim et al. Outcomes of MDS Patients with Chromosome 7 Abnormalities Treated with 5-Azacitidine. Abstract 1449, ASH 2007.
89. Aziz AR et al. Good Response to Decitabine in an Elderly Patient with MDS (Refractory Anemia with Excess Blasts RAEB-2) after Failure of Azacitidine. Abstract 4597, ASH 2007.
90. Figueroa ME et al. Myelodysplastic Syndrome (MDS) Displays Profound and Functionally Significant Epigenetic Deregulation Compared to Acute Myeloid Leukemia (AML) and Normal Bone Marrow Cells, abstract 345, ASH 2007.
91. Kantarjian H et al. Survival and Efficacy of Decitabine in Myelodysplastic Syndromes (MDS), analysis of the 5-Day IV dosing regimen. Abstract 115, ASH 2007.
92. Kantarjian H et al. Survival Advantage With Decitabine Versus Intensive Chemotherapy in Patients With Higher Risk Myelodysplastic Syndrome. *Cancer* 2007; 109: 1133-7.
93. Rossetti JM et al. Low dose Azacitidine for relapse of MDS/AML after unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. Abstract 5034, ASH 2007.
94. Field T. et al. Allogeneic Hematopoietic cell transplantation.