

Metilación de genes supresores de tumores en pacientes venezolanos con leucemia linfocítica aguda.

Rutmelania Brito Acosta¹, Alicia Rojas de Atencio¹, Carem Prieto², Sandra Gonzalez Ferrer¹, Karelis Urdaneta Gutierrez¹, Raquel Atencio Rojas¹, Jenny Zadis Cañizalez¹ y Maribel Quintero³.

¹Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

²Centro de Enfermedades Endocrino Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

³Departamento de Morfopatología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: silenciamiento transcripcional; leucemia linfocítica aguda; genes supresores de tumores.

Resumen. La leucemia linfocítica aguda (LLA) es la neoplasia maligna hematológica más común en niños. Se ha podido demostrar un perfil específico de metilación de islas CpG en las regiones promotoras de genes supresores de tumor, que desempeña un papel crítico en el silenciamiento transcripcional y puede ofrecer nuevas opciones de tratamiento. Con el objetivo de determinar este perfil, se analizó el estado de metilación de las islas CpG de la región promotora de cuatro genes supresores de tumor asociados a diferentes etapas del proceso de carcinogénesis, dos p15 y p73 asociados a la regulación del ciclo celular y a la apoptosis y dos E-cadherin y RAR β 2, involucrados en la migración y metástasis tumoral. Se analizaron 30 muestras de sangre periférica mediante modificación del ADN con bisulfito sódico y reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación y se obtuvo en todos los pacientes, al menos la metilación de un gen (100%) y frecuencias específicas de metilación de 76,67% para el gen p73 (23 pacientes); 56,67% para el p15 (7 pacientes); 16,67% para el E-cadherin (5 pacientes) y 20,0% para el RAR β 2 (6 pacientes). La frecuencia de metilación observada en los genes p15 y p73, sugiere el papel importante de esos genes en la patogenia de la LLA y su probable utilidad en el asesoramiento de riesgo y en la selección del tratamiento más adecuado.

Autor de Correspondencia: Alicia Rojas de Atencio. Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: arojasa26@gmail.com

Methylation of tumor suppressor genes in Venezuelan patients with acute lymphoid leukemia.

Invest Clin 2017; 58(2): 128 - 139

Keywords: transcriptional silencing; acute lymphoid leukemia; tumors suppressors genes.

Abstract. Acute lymphocytic leukemia (ALL) is the most common hematologic malignancy in children. A specific methylation profile of CpG islands in the promoter regions of tumor suppressor genes has been demonstrated, which plays a critical role in transcriptional silencing and may offer new treatment options. In order to determine this profile, the methylation status of CpG islands was analyzed in the promoter region of four tumor suppressor genes associated with different stages of carcinogenesis: two associated with the regulation of cell cycle and apoptosis: p15 and p73; and two involved in migration and tumor metastasis: E-cadherin and RAR β 2. Thirty peripheral blood samples were analyzed by modification of DNA with sodium bisulfite and chain reaction polymerase specific for methylation. In all patients, the methylation of at least one gene was observed (100%) and additionally, there were specific methylation frequencies of 76.67% for the p73 gene (23 patients); 56.67% for p15 (seven patients); 16.67% for E-cadherin (five patients) and 20.0% for the RAR β 2 (six patients). The frequency of methylation observed in p15 and p73 genes suggests the important role of these genes in the pathogenesis of ALL and its usefulness in risk assessment and the selection of the most appropriate treatment

Recibido: 09-06-2015 Aceptado: 27-04-2017

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), es un trastorno maligno que se origina en una célula hematopoyética única progenitora de linfocitos B o T y está caracterizada por la pérdida de diferenciación de progenitores linfocitos y un aumento de células linfoblásticas inmaduras. (1,2). Es la neoplasia más frecuente en la población menor de 15 años y constituye el 80 % de todas las leucemias diagnosticadas. Tiene dos picos de frecuencia por edad, el primero de dos a cinco años y el segundo alrededor de la sexta década de la vida (3). En Venezuela no se conocen datos estadísticos exactos, pero se sabe que las enfermedades hematológicas malignas ocupan el cuarto lugar en frecuencia de cáncer

y la LLA es la más frecuente malignidad en los niños venezolanos, (4).

Desde el punto de vista etiológico, la LLA, se considera tradicionalmente como la consecuencia de alteraciones genéticas, que incluyen varias anomalías citogenéticas no aleatorias, que dan lugar a defectos irreversibles de las funciones de genes críticos, tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la transcripción de los genes asociados a la leucemogénesis (2). Sin embargo, en los últimos años, han surgido cada vez mayores evidencias que demuestran que el fenotipo neoplásico y el comportamiento biológico diferencial de las células tumorales, incluidas las leucemias podría explicarse por alteraciones epigenéticas (5). La epigenética incluye cambios en la estructura y

organización del ADN, sin alterar la secuencia del mismo; implicándose diversos mecanismos, que modulan la expresión génica induciendo cambios en el fenotipo, que incluyen modificaciones del ADN y las histonas (6-8).

La metilación del ADN, es el mecanismo epigenético más conocido, que es capaz de alterar la expresión génica, como por ejemplo en los genes supresores tumorales (GST), los cuales tienen como función principal, regular el crecimiento y proliferación de la célula. Recientemente se ha demostrado en pacientes con LLA, que varios GST presentan hipermetilación de las áreas promotoras (9-12). Es por esto que, desde hace más de una década se están realizando investigaciones para determinar un patrón o perfil de metilación de GST típico de leucemias, en este caso enfocadas en el tipo linfocítico agudo; este perfil se ha utilizado como un biomarcador de diagnóstico, pronóstico y predicción de la respuesta al tratamiento. (5). Los genes involucrados se asocian a diferentes etapas del proceso de carcinogénesis, como la regulación del ciclo celular y la apoptosis (p15, p16, Rb1, p27, p73), la reparación del ADN (MGMT/DAPK), la migración y metástasis tumoral (E-cadherin, RAR β), los factores de crecimiento (ER, EphA3), la diferenciación celular y la respuesta inmune (C/EBPs), (SOCS-1), entre otros.

Si bien, existen varios trabajos en la literatura internacional dedicada al estudio de estos perfiles génicos y de su aplicación en la práctica clínica, desde hace varios años, en Iberoamérica es poco lo que se ha estudiado; se ha determinado el perfil de metilación de las áreas promotoras de algunos genes supresores de tumores en cáncer y específicamente en LLA. Como ejemplo de esto están los estudios en Chile, de los genes APAF1, ASSP1, p73 y FHIT, p15, p16, ESR1, IGSF4, SOCS1(9); en Colombia, de los genes RARB y DAPK; CDKN2B y DBC1(10); en Brasil, del gen CDKN2B (p15) (11) y en España de CDH1, p73, p16, p15, p57, NES-1, DKK-3,

CDH13, p14, TMS-1, Apaf-1, DAPK, Parkin, LATS-1(12).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil de metilación de cuatro genes GST en pacientes venezolanos con LLA. La selección de los GST para establecer el perfil de metilación en pacientes, se basó en el papel que tienen en muchos tipos de malignidades. La hipermetilación del gen CDKN2B o p15 ocurre en el 80% de los pacientes estudiados a nivel internacional (15) y el gen E-cadherin puede asociarse a recuentos elevados de células leucémicas en sangre periférica. (5-14). Del mismo modo, la frecuencia de metilación del gen RAR β que produce silenciamiento epigenético y es considerado asociado a mal pronóstico (14) y la del gen p73, que puede inducir detención del ciclo celular, apoptosis y envejecimiento. (14,15).

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra en estudio estuvo representada por 30 pacientes (67%) de sexo femenino y el resto (33%) del sexo masculino. El rango de edad de los pacientes estuvo entre 1 y 18 años, con una media de 9 años, todos ellos referidos del Hospital de Especialidades Pediátricas de Maracaibo, Venezuela, con diagnóstico de LLA, sin tratamiento previo con quimioterápicos. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética, del Instituto de Investigaciones Genéticas de la Universidad del Zulia y todos los representantes de los pacientes, firmaron el consentimiento informado.

Para la extracción del ADN se utilizó la técnica combinada de fenol/Sevag e inorgánica o *salting-out* (16,17), desarrollada en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. La integridad del ADN fue confirmada mediante la amplificación de secuencias no metiladas posterior a la modificación con bisulfito. Para la modificación

específica del ADN mediante PCR (MSP) con bisulfito de sodio se utilizó el estuche Methyledge Bisulfite Conversion System del Laboratorio Promega (18).

El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir todos los residuos de citosina no metilados, en uracilos, mediante desaminación; la citosina metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina. Los iniciadores de PCR utilizados aprovechan estas diferencias para discriminar entre las secuencias metiladas y las no metiladas. (19). Para el estudio de la metilación específica se utilizaron los siguientes iniciadores, Tabla I.

Como control positivo de metilación, se usó ADN genómico 100% metilado (Promega). El análisis de las áreas metiladas se evidenció a través de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El índice de metilación se utilizó como un indicador de las proporciones de regiones promotoras metiladas respecto de la totalidad de

los genes estudiados y se calculó dividiendo el número de genes metilados entre el número de genes analizados.

RESULTADOS

La distribución de la frecuencia de metilación de cada GST en estudio, de los 30 pacientes, dió como resultado: 17 pacientes con metilación para p15 (56,67%), 5 pacientes para E-cadherin (16,67%), 23 pacientes para p73 (76,67%) y 6 pacientes para RAR β 2 (20,0%). Ver Tabla II.

En relación con el índice de metilación se pudo observar, que todos los pacientes tuvieron al menos un gen metilado (Tabla III).

DISCUSIÓN

La LLA representa el 25% de todas las malignidades y el 72% de las leucemias en edad pediátrica. Afecta tanto la población adulta como la infantil, y es más frecuente en niños menores de 5 años (1,2). La distribución por sexo es me-

TABLA I
INICIADORES

Gen	Locus	Primers	Tamaño de Fragmento	Referencia
p15	9p22	5'-GCGTTCGTATTTTGCGGTT- 3' 5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'	147pb	20
p73	1p36	5'-GGACGTAGCGAAATCGGGGTTC-3' 5'-ACCCCGAACATCGACGTCGG-3'	60 pb	9
E-adhe- rin	16q	5'TGTAGTTACGTATTTATTTTGTAGTG- GCGTC3' 5'-CGAATACGATCGACTCGAACCG-3'	106pb	21
RAR β 2	3p24	5'-TGTCGAGAACGCGAGCGATTC -3' 5'-CGACCAATCCAACCGAAACGA-3'	146pb	20

TABLA II
FRECUENCIA DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMORES
SEGÚN LA EDAD, EN PACIENTES CON LEUCEMIA

p15	E-CADHERINE	p73	RARB2	NºG.METILADOS	SEXO	EDAD
X		X	X	3	F	9 AÑOS
X	X		X	3	F	7 AÑOS
	X			1	F	9 AÑOS
X		X		2	M	5 AÑOS
X	X	X	X	4	M	11 AÑOS
		X		1	F	8 AÑOS
X			X	1	F	7 AÑOS
		X	X	1	F	13 AÑOS
X	X	X		4	M	1 AÑO
		X		1	F	15 AÑOS
X				2	F	15 AÑOS
X		X		1	F	12 AÑOS
X		X		2	F	6 AÑOS
X		X		2	F	9 AÑOS
X		X		2	F	11 AÑOS
				1	M	10 AÑOS
X				1	M	4 AÑOS
X		X		1	M	1 AÑO
X		X		2	F	14 AÑOS
		X		1	M	14 AÑOS
		X		1	F	13 AÑOS
		X		1	F	7 AÑOS
		X		1	F	18 AÑOS
		X		1	F	12 AÑOS
		X		1	F	15 AÑOS
X		X		2	F	4 AÑOS
X		X		2	F	11 AÑOS
		X		1	F	1 AÑO
X	X	X	X	4	F	15 AÑOS

TABLA III
RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE METILACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMORES Y EL SEXO

GENES METILADOS	INDICE DE METILACION %	FEMENINO	MASCULINO
1	0,25	11	6
2	0,50	5	3
3	0,75	2	0
4	1,00	2	1

nor en niñas que en varones. Los datos obtenidos en esta investigación y estudios similares de LLA y otras leucemias, son de vital importancia ya que reafirman la presencia de los efectos epigenéticos (metilación), sobre la región promotora de los genes y sus efectos en las leucemias de cualquier tipo, y ponen de manifiesto el origen epigenético y en este caso sobre la LLA. (1,2)

Los 30 pacientes de este estudio, presentaron metilación de al menos un gen (100%), resultado muy cercano al de Gutiérrez y col. (22) en la India, en el año 2003, en una población infantil de 129 pacientes con LLA. Autores como Takeuchi y col. (21), aseguran que la metilación de varios genes se correlaciona con patrones prematuros vinculados con inmunofenotipos y edad, lo que indica que la metilación es un evento frecuente en el desarrollo de la LLA en la niñez.

La mayoría de los pacientes presentó solo un gen metilado (0,25% de metilación), predominando el sexo femenino; esta preferencia se repite en pacientes con 2, 3 y 4 genes hipermetilados (Tabla III). Esto podría corresponder a como estuvo constituida la muestra, en la cual el doble de los pacientes fueron del sexo femenino. La predilección por ese sexo es similar a lo encontrado en el estudio de Melo y col. (9), en Chile en el año 2013, quienes estudiaron 38 pacientes infantiles con LLA, de los cuales 21(55,3%) fueron niñas y donde encontraron

un 42% de genes metilados. Este hecho puede deberse solo al azar, al pequeño tamaño de la muestra en estudio o a verdaderas diferencias dadas por la localización geográfica. Lo reportado en estos dos trabajos no concuerda con lo observado en la literatura donde se reporta que la frecuencia de LLA y de la hipermetilación de genes es mayor en varones (23).

La LLA tiene como sello característico, la aparición progresiva de una acción celular maligna, ocasionada por daños en las funciones de algunos genes. Sin embargo, este tipo de leucemia tradicionalmente se conoce como una enfermedad de origen genético y es cada vez más obvio, que las alteraciones epigenéticas también desempeñan un papel protagónico en la nosogénesis y la progresión de dicha enfermedad. Es más frecuente la metilación de las regiones promotoras de los genes y se asocia con la pérdida de su función. La metilación de varios genes que controlan la proliferación, la adhesión y la apoptosis es un fenómeno común en las células de la LLA y constituye el mecanismo más importante para inactivar genes relacionados con en esta enfermedad (24,25).

Las mutaciones epigenéticas que se dan en la región promotora de genes supresores de tumores en pacientes con LLA, ocurren cada vez con mayor frecuencia, estos procesos están relacionados tanto con el inicio de la enfermedad como con las recaídas (26). Gómez y col.

en 2009 (13), señalaron que la metilación en la LLA participa en la inactivación de 5 vías moleculares esenciales:

1-Desregulación de la proliferación celular, alterando el punto de control tardío en la transición G1-S del ciclo celular, bien directamente (inactivando p21, p15, p16 y p57) o indirectamente (inactivando p73, PTEN, NES1 y LATS2) y también alteran la transición G2-M (inactivando LATS1, REPRIMO)

2-En el programa apoptótico mediante la inactivación de DAPK, p14, TMS1, APAF1, DIABLO, DBC1 y ASPP1.

3-La inhibición de los antagonistas de la vía de señales WNT/beta-catenina, permitiendo la activación constitutiva de esta (metilación de DKK3, sFRP1, sFRP2, sFRP4, WIF1 y HDPR1)

4- La adhesión celular con la inactivación de la familia de las cadherinas (H-cadherin y E-cadherin) y la familia de las metaloproteasas (ADAMTS1 y ADAMTS5).

5- La inactivación de varias proteínas con actividad cinasa o fosfatasa, las cuales se modulan mediante diversos receptores de citocinas (SHP1 y SYK1)

Todas estas anomalías no deben sorprendernos ya que, subyacente a la complejidad de cada tumor, todos ellos presentan un cierto número de «misiones críticas» que conducen a la célula tumoral y a su progenie hacia la expansión incontrolada. La serie que se presenta en este trabajo estudia 3 genes supresores tumorales involucrados en la inhibición de las quinasas independientes de ciclinas, cuyo papel todavía se considera controversial lo cual sugiere que podría ser importante en un no determinado aún subtipo de leucemia.

El gen p73 en esta serie resultó ser el más frecuentemente metilado (23 pacientes)(Fig. 1), con un 76,67%; estos resultados son más altos que los reportados en la literatura, el más cercano al nuestro corresponde al citado por Melo y col. (9) en Chile en 2013, quienes encontra-

ron una frecuencia de metilación de 42% en 38 muestras de médula ósea de pacientes pediátricos de ambos sexos y edades entre 10 meses a 14 años. Mucho más bajas fueron las frecuencias reportadas por Gutiérrez y col. (22) en el año 2003 y Gómez y col. en el año 2009 (13), quienes estudiaron 129 y 251 pacientes pediátricos con LLA en India y España y encontraron 26% y 18% respectivamente de metilación de este gen. Asimismo, las cifras reportadas en pacientes adultos son también bajas, como las de Egipto en el año 2010 por El Hamid y col. (27), quienes reportaron 27,5 % de metilación en 51 pacientes con LLA, muy similar a la frecuencia de 21,2%, citada en Estados Unidos, por García y col. en el 2002 (3), en 80 pacientes adultos con LLA.

Estas diferencias con la muestra estudiada en el presente trabajo, pudiera deberse a factores étnicos, ambientales o geográficos, los cuales podrían estar jugando un papel importante en las frecuencias de metilación de los pacientes estudiados (28). En esta casuística se obtuvo el porcentaje más alto de todos los trabajos publicados lo cual sugiere que no puede descartarse que se deba al tamaño y tipo de la muestra.

El segundo lugar en la frecuencia de metilación de los genes supresores de tumor analizados, fue el que corresponde al gen p15, donde el 56,67% de los pacientes presentó hipermetilación de ese gen, (Fig. 2) el cual ha sido señalado como uno de los más frecuentemente metilados en todas las series como la de Pereira y col. (11), en Brasil en el año 2008, quienes encontraron hipermetilación en 4 de seis pacientes (67%). Muchas otras investigaciones han reportado frecuencias menores al 50%. El Hamid y col. (27), en el año 2010 evidenciaron 41,2% de metilación en una población adulta con LLA en un total de 51 pacientes, mientras que en otra investigación hecha por Afifi y col. (29), en el año 2012, en Egipto, en 30 pacientes infantiles con LLA y 42 adultos reportaron un 36% de

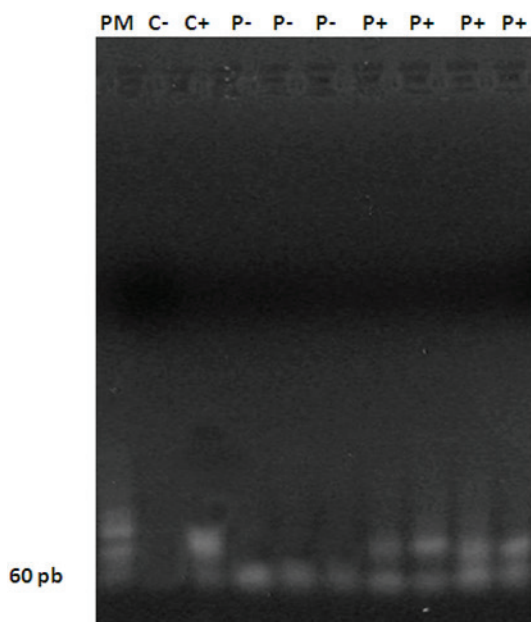


Fig.1. Gel de agarosa al 3%, muestra corrida del gen p73, PM: marcador de peso molecular 50pb, c+: control positivo, c-: control negativo, p+: paciente positivo, p-: paciente negativo.

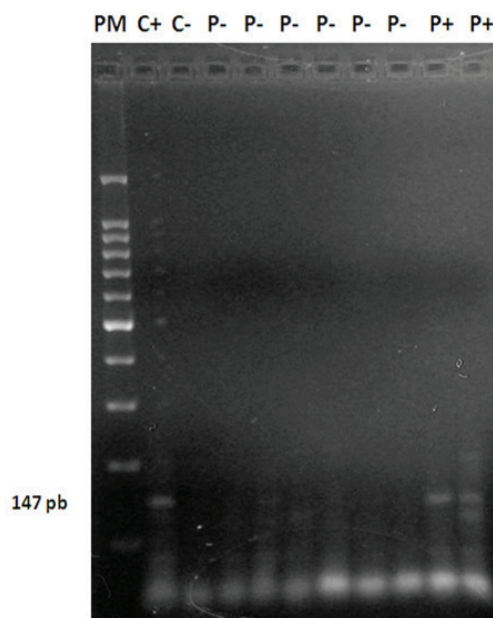


Fig.2. Gel de agarosa al 2%, muestra corrida del gen p15, PM: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, P-: pacientes negativos, P+: pacientes positivos.

metilación. Igualmente, Gutiérrez y col. (22), en el año 2003 reportaron 23% de metilación en 129 pacientes con LLA en una población infantil y Gómez y col. (24), en el año 2009 en una población de 251 pacientes infantiles, de edad promedio de 14 años, obtuvo solo un 29%. Aun menores han sido los porcentajes de metilación obtenidos en 80 pacientes adultos por García y col. (30) en el año 2002, de 11,3%. Esta heterogeneidad en la frecuencia de metilación de este gen podría deberse a la gran variabilidad que existe en las poblaciones estudiadas en los diferentes reportes, tanto en poblaciones infantiles como en adultos. Ya que el gen p15 es un inhibidor de ciclina dependiente de quinasa (CDKI), conocido por controlar el ciclo celular en la fase temprana (G1) por inhibición de la activación de las ciclinas dependientes de quinasa 4 y 6, la pérdida de expresión de este gen se ha asociado

con varios tipos de cáncer, pero es frecuentemente silenciado en leucemias sobre todo en el inicio.

El gen RAR β 2 que funciona como supresor tumoral, por silenciamiento epigenético vía metilación o por deacetilación de histonas, ocupó el tercer lugar en relación con la frecuencia de metilación (Fig.3). En la búsqueda exhaustiva de literatura al respecto, solo se encontró una publicación que estudió este gen, Takeuchi y col. (21), en 2011, mostraron un 33% de metilación del gen RAR β 2 en 95 pacientes pediátricos alemanes, además ocupó el primer lugar en la frecuencia de metilación de su muestra. Los autores reconocieron que este era el primer trabajo que estudió este gen en LLA, por lo que se podría proponer que el presente hallazgo sería el primero en Latinoamérica y el segundo en la literatura mundial.

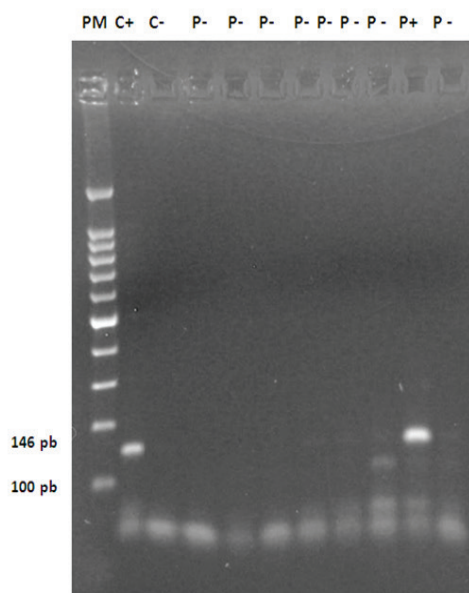


Fig.3. Gel de agarosa al 2%, muestra corrida del gen RAR β 2, PM: marcador de peso molecular 100pb, C+: control positivo, C-: control negativo P+: paciente positivo, P-: paciente negativo.

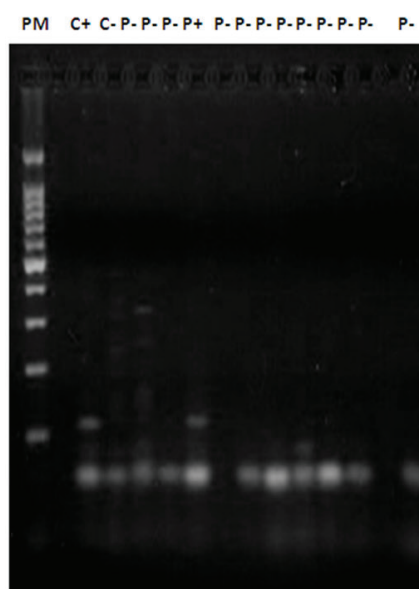


Fig.4. Gel de agarosa al 2%, muestra corrida del gen E-cadherin PM: marcador de peso molecular 100pb, C+: control positivo, C-: control negativo, P+: paciente positivo, P-: paciente negativo.

Sin embargo, dada la escasa literatura al respecto, y basándonos en el principio básico de la epigenética en el ciclo celular se compararon los presentes resultados con los hallazgos en diferentes malignidades hematológicas, y se encontraron similitudes con trabajos hechos en poblaciones con leucemia mieloide aguda (LMA). Reyes y col. en Chile (19) y Ekmerci y col. en Turquía (31), reportaron un 27% y 18% respectivamente, en pacientes con LMA. Sin embargo, Galm y col. (32), en el año 2004 en Estados Unidos, no encontraron metilación de este gen en ninguno de los 56 pacientes con mieloma múltiple estudiados. Takeuchi y col. (21) reportaron metilación frecuente (89%) en mielofibrosis con metaplasia mieloide y en el mismo trabajo citaron a Chim y col. (33), quienes reportaron 21% de metilación de este gen en leucemia promielocítica aguda. Lo discutido sugiere que la influencia de este gen es importante en el de-

sarrollo de la leucemia y de otras malignidades hematológicas y establece una relación entre los cambios genéticos y epigenéticos durante la transformación y el papel de la hipermetilación en las etapas tempranas de la leucemogénesis.

Por último, la frecuencia de metilación del gen E-cadherin, ocupó el último lugar en la frecuencia de metilación de los genes supresores de tumor analizados, hallándose en 5 pacientes (16,67%) (Fig.4). Esta frecuencia resulta muy baja si se compara con la citada por Corn y col. (34), en el año 2000, en 18/33 pacientes estudiados (53%), y la de Melki y col. (35), en el año 2000, en Australia, quienes estudiaron 18 muestras de pacientes con diversas leucemias y demostraron un fenotipo de hipermetilación en todos los subtipos de leucemia. Asimismo, Gutiérrez y col. (22), en el año 2003, reportaron 72 % de metilación en 129 pacientes infantiles con LLA, siendo este gen el de mayor frecuencia de

metilación de dicho estudio.

Podemos concluir que es necesario ampliar los datos a estudiar, ya que en su mayoría el número de pacientes estudiados es pequeño. Esto resultaría interesante, ya que a través de los años se ha demostrado que la metilación de genes supresores de tumores, es más frecuente en tumores sólidos que en leucemias agudas, en las cuales su papel aún está en estudio, conociéndose de las múltiples funciones de estos genes en el ciclo celular (36). La ocurrencia de un daño en estos genes, como lo es la metilación, hace que la función de las células se pierda, contribuyendo al inicio, la invasión tumoral y la metástasis (20,32,37). Es importante señalar la aparición de medicamentos que pueden utilizarse para eliminar esta metilación y se traduciría en la probable curación de estos pacientes (38).

AGRADECIMIENTO

Este proyecto fue financiado por el FONACIT bajo el N° 201201023

REFERENCIAS

1. **Ortega M, Osnaya M, Rosas J.** Leucemia linfocítica aguda. *Med. Int Mex* 2007;23: 26-33.
2. **Inaba H, Greaves M, Mullighan C.** Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013;381:1943-1955.
3. **García R, Ayala A, Perdomo S.** Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev Cienc Salud* 2012; 10:59-71.
4. **Gobierno Bolivariano de Venezuela.** Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2014.
5. **Figueroa M, Chen S, Andersson A, Phillips L, Li Y, Sotzen J.** Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2013; 123 :3099-3111.
6. **Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W.** Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:162-169.
7. **Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251-260.
8. **Florea C, Schnekenburger M, Grandjenett C, Dicanto M, Diederich M.** Epigenomics of leukemia: from mechanisms to applications. *Epigenomics* 2011; 3: 581-609.
9. **Melo A, Artigas C, Muñoz S, Brebi P, Hoffstetter R, Roa J.** Perfil de metilación de genes supresores de tumores APAF, ASSP1, p73, FHIT en pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil. *Int J Morphol* 2013; 31:973-979.
10. **Medina L, Palacios G, Peña C.** Estandarización de PCR específica de metilación para la detección de metilación en los promotores de los genes CDKN2B y DBC1 en pacientes con leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica. *Actual Biol* 2012; 96: 133-176.
11. **Pereira P, Andreati G, Góes A, Zago M, Araújo W.** DNA methylation analysis of the tumor suppressor gene CDKN2B in Brazilian leukemia patients. *Genet Mol Biol* 2008; 31: 632-638.
12. **Gomez J, Jimenez J, Castillejo J, Aguirre X, Navarro G, Molina J, Calasanz M, Prosper F, Heiniger A, Barrios M.** Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 104: 2492-2498.
13. **Gómez J, Jiménez A, Torres A, Prosper F, Heinigerb A, Aguirre X.** Alteraciones epigenéticas en la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Med Clin (Barc)* 2009;

- 129:15-22.
14. **Gen Database.** [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center For Biotechnology Information. [Acceso 1 de mayo de 2015]. Gen Database;[1página] Disponible <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5915>
 15. **Wei J, Zaika E, Zaika A.** P53 family: Role of protein isoforms in human cancer. *J Nucleic Acids* 2012; 687359.doi: 10.1155/2012/687359.
 16. **Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J.** Preparation of genomic DNA. Phenol extraction and concentration DNA from aqueous solutions. In: *Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from current protocols in molecular biology.* New York: Ed. Reene Publishing associates and Willey Interscience; 1989.
 17. **Miller S, Dykes D, Polesky H A.** Simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16: 1215.
 18. **Methyl Edge Bisulfite conversion system technical manual.** [Citado el 18 de Enero de 2014]. Disponible en:<http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/MethyEdge%20Bisulfite%20Conversion%20System%20Protocol.pdf>.
 19. **Herman J, Graff J, Myöhänen S, Nelkin B, Baylin S.** Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 9821-9826.
 20. **Reyes S, Brebi P, Ili CG, Muñoz S, Melo A, Guerrero R.** Perfil de metilación de genes supresores de tumores como factor pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Int J Morphol* 2011; 29:151-157.
 21. **Takeuchi S, Matsushita M, Zimmermann M, Ikezoe T, Komatsu M, Seriu T, Scharappe M, Bartram C, Phillip H.** Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2011; 35:1345-1349.
 22. **Gutierrez M, Siraj A, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary M, El Solh H, Bhatia K.** Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* 2003; 17:1845-1850.
 23. **Nordlund J.** Gene expression and DNA methylation in acute lymphoblastic leukemia. [Dissertation]. University of Uppsala, Suecia.2012. Disponible en: <http://www.diva.portal.org/smash/get/diva2:545964/FULLTEXT01.pdf>
 24. **Herceg Z, Vaissiere T.** Epigenetic mechanisms and cancer. An interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 2011; 7:804-819.
 25. **Gómez J, Jiménez A, Torres A, Prosper F, Heinigerb A, Aguirre X.** Alteraciones epigenéticas en la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Med Clin.* 2007; 1:15-22.
 26. **Burke M, Bhatla T.** Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediat* 2014; 2:1-7.
 27. **EL Hamid T, Mossallam G, Serisher M.** The clinical implications of methylated p15 and p73 genes in adults acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Nat Cancer Inst* 2010;3:175-184.
 28. **American Cancer Society.** Datos y estadísticas sobre el cancer entre los hispanos/latinos. Atlanta 2012-2014.
 29. **Afifi H, Khloussi N, Saad A, Zarouk W, El Biaty R, Shaisha E, Ibrahim R.** p15 INK4B gene methylation in acute lymphoblastic leukemia and its pronostic value. *Life Sci J* 2012; 9:1414-1420.
 30. **Garcia G, Daniel J, Smith T, Kornblau S, Sheng M, Kantarjian H, Pierre I.** DNA methylation of multiple promoter-as-

- sociated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2217-2224.
31. **Chim CS, Wong SY, Kwong YL.** Aberrant gene promoter methylation in acute promyelocytic leukaemia: profile and prognostic significance. *Br J Haematol* 2003;122:571-578.
 32. **Ekmekci M, Gutiérrez M, Siraj A, Ozbek U.** Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2004; 77:233-240.
 33. **Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman J, Osieka R.** DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1687-1692
 34. **Corn P, Smith D, Ruckdeschel E, Douglas D, Baylin S, Herman J.** E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4243-4248.
 35. **Melki J, Vincent P, Brown R, Clark S.** Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood* 2000; 95:3208-3213.
 36. **Sun W and Yang J.** Functional mechanism for human tumor suppressors. *J Cancer* 2010; 1:136-140.
 37. **Marzese D, Hoon D, Chong K, Gago F, Orozco Jh, Tello O, Vroqué M.** DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors. *J Mol Diagn* 2012; 14: 613-622.
 38. **Iastrebnner M, Flores A, Benasayag S.** Tratamiento hipometilante de los síndromes mielodisplásicos. de la fisiopatogenia y la farmacología a la práctica clínica. (Revisión). *Hematología* 2009; 1: 1-13.