

UTILIDAD DEL BANDEO CROMOSÓMICO CON LA ENZIMA *Alu* I PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ZONAS METILADAS EN LEUCEMIAS AGUDAS

UTILITY OF CHROMOSOME BANDING WITH *Alu* I ENZYME FOR IDENTIFYING METHYLATED AREAS IN ACUTE LEUKEMIAS

MARIBEL QUINTERO^{1,6}, ALICIA ROJAS-ATENCIO², ANA RUIZ³, MACZY GONZÁLEZ³,
OLGA BRICEÑO³, KARELIS URDANETA², MELVIS ARTEAGA-VIZCAINO⁴, MIRIAM DUERTO⁵,
JENNY CAÑIZALES²

*Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, ¹Cátedra Práctica Profesional de Hematología, ²Instituto de Investigaciones Genéticas, ³Cátedra de Hematología, ⁴Instituto de Investigaciones Clínicas, ⁵Instituto Hematológico de Occidente, ⁶Hospital Central "Dr. Urquinaona", Maracaibo, Venezuela
E-mail: maribelquintero610@hotmail.com / maribelquintero610@yahoo.es*

RESUMEN

Las leucemias agudas son proliferaciones malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos mieloides normales. La transcripción inactiva de genes supresores de tumores por la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras, ha sido un foco de interés de los investigadores como un factor causal en malignidades hematológicas. El propósito del presente estudio fue determinar regiones hipermetiladas en muestras de extendidos cromosómicos mediante la utilización de *Alu* I y relacionarlas con sitios de genes supresores de tumores asociados con leucemias agudas. En este sentido, se analizaron 30 muestras de médula ósea, 18 con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda y 12 con Leucemia Linfóide Aguda, a 12 de las cuales se les realizó cultivo celular. Los extendidos cromosómicos fueron teñidos con Giemsa, luego de ser previamente digeridos con la enzima *Alu* I. En los pacientes con leucemia mieloide aguda y leucemia linfóide aguda se observó que 16/18 (88%) y 12/12 (100%) presentaron regiones anormalmente teñidas, solo en cuatro y tres de las regiones metiladas observadas, en leucemia mieloide aguda y leucemia linfóide aguda, respectivamente, no se encontró asociación en la literatura con genes metilados, lo cual resultó altamente significativo ($p < 0,01$) en ambas patologías. Queda en evidencia la utilidad de esta técnica para la identificación de zonas metiladas, ya que las mismas han proporcionado el fundamento y las bases moleculares para un mejor enfoque terapéutico dirigido con agentes demetilantes tanto en leucemias agudas como síndromes mielodisplásicos.

PALABRAS CLAVE: Metilación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfóide aguda, tinción cromosómica.

ABSTRACT

Acute leukemias are malignant hematopoietic cells of immature proliferations of the blastic type, whose progressive accumulation is accompanied by a decrease in the production of normal myeloid elements. Transcription of inactive tumor suppressor genes by hypermethylation of CpG islands in promoter regions, has been a focus of researchers as a causal factor in hematological malignancies. The purpose of this study was to determine hypermethylated regions of chromosomal spread samples using *Alu* I and relate these regions with sites of suppressor gene associated to acute leukemia tumors. From an analysis of a 30 bone marrow samples, 18 were diagnosed with Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoid Leukemia, and 12 underwent cell culture. Chromosomal spreads were stained with Giemsa after being previously digested with the enzyme *Alu* I. In patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoid leukemia it was observed that 16/18 (88%) and 12/12 (100%) had abnormally stained regions, single in four and three methylated regions observed in acute myeloid leukemia and acute lymphoid leukemia, respectively, no association was found in the literature with methylated genes, which was highly significant ($p < 0.01$) in both conditions. This shows the usefulness of this technique for the identification of methylated areas, since they have provided the foundation and the molecular basis for a better targeted therapeutic approach with demethylating agents, both in acute leukemias and myelodysplastic syndromes.

KEY WORDS: Methylation, acute myeloid leukemia, acute lymphocytic leukaemia, chromosomal staining.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas son proliferaciones malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos mieloides normales, se dividen en enfermedades agudas y crónicas sobre la base

de sus signos y síntomas de presentación, y el tipo celular involucrado. Las leucemias agudas se dividen desde el punto de vista citomorfológico en leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Sans *et al.* 2001). La incidencia de las leucemias agudas a nivel mundial es de 1 a 3 casos por cada 100.000 habitantes por año, y se observa un ligero predominio sobre el género

masculino. La leucemia linfocítica aguda (LLA) en el adulto constituye, aproximadamente, el 15-20% de las leucemias agudas, es principalmente una enfermedad de la niñez: la mayoría de los casos se produce entre los 2 y los 10 años. Si bien es rara en los adultos, el segundo pico en la incidencia se produce en los pacientes ancianos (Sans *et al.* 2001, Rodak 2004). La leucemia mieloide aguda (LMA) es la más común en los niños menores de 1 año. Es rara en niños mayores y adolescentes, y el segundo pico de incidencia se produce entre los adultos de 40 años. Su etiología es desconocida, siendo los factores genéticos los de mayor importancia (Sans *et al.* 2001).

Alteraciones de vías de control celular se han reconocido como un evento obligado en la carcinogénesis (Vogelstein y Kinzler 2004). Tanto los cambios genéticos como epigenéticos son responsables de la disrupción en las vías de señales celulares en cáncer. Los proto-oncogenes pueden ser sobreexpresados por ganancia de cromosomas, amplificación génica, translocaciones y mutaciones activadoras, y los genes supresores de tumores (GST) pueden ser inactivados por pérdidas cromosómicas, deleciones y mutaciones puntuales. Sin embargo, es claro que actualmente el silenciamiento génico de los GST asociado a la hipermetilación, podría ser considerado como un equivalente funcional de las mutaciones y deleciones, jugando un rol fundamental en el desarrollo del cáncer (Herman y Baylin 2003).

En forma temprana durante el desarrollo embrionológico, olas alternantes de metilación y demetilación programan el crecimiento celular y la diferenciación (Haaf 2006). Los patrones de metilación del ADN que se establecen durante este tiempo se mantienen relativamente estables en los tejidos normales. La metilación del nucleótido citosina es la única modificación conocida que ocurre de forma endógena en el ADN de los mamíferos y es debida a la adición enzimática de un grupo metilo al carbono en la posición 5 de la citosina. La mayoría de la 5'-metilcitosinas (5mC), en el ADN humano están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' (citosina-fosfato-guanina, CpG) (Bestor 2000, Roman-Gómez 2005). Sin embargo, en células madres y células cancerosas, puede ocurrir la metilación de ADN previamente no metilado. Esta es la llamada metilación de *novo* y es preferencialmente mediado por ADN metiltransferasas (DNMT3a y DNMT3b) (Okano *et al.* 1999). El proceso que inicia este fenómeno es aún desconocido y en contraste con las alteraciones genéticas, estas modificaciones epigenéticas son fenómenos reversibles (Boulton y Wainscoat 2007).

El silenciamiento de la transcripción génica por

hipermetilación de islas CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores es uno de los eventos epigenéticos fundamentales en la carcinogénesis, y es probablemente el mecanismo más común de inactivación de GST en cáncer (Knudson 2001). Un aspecto de extraordinaria importancia es el hecho de que existen metilación de genes diferentes para cada tipo de tumor, así por ejemplo los genes APC y p14 están más relacionados con tumores gastrointestinales, mientras que p73, p15 o p21 son casi exclusivos de hemopatías, por otro lado, no siempre se encuentran los mismos genes metilados en cada uno de los pacientes afectados de un mismo tipo de cáncer, sino que existe variabilidad y esta variabilidad se ha señalado como factor pronóstico en cada uno de ellos (Román-Gómez *et al.* 2005).

La enzima *Alu* I es una endonucleasa de restricción la cual reconoce las secuencias ALU, estas son secuencia de ADN altamente repetidas que cubren aproximadamente el 10% del genoma humano siendo distribuidas de manera heterogénea, están presentes en aproximadamente 300.000-600.000 copias, encontrándose principalmente de un 3-6% en las regiones promotoras de los genes relacionados con cáncer (Mezzanotte *et al.* 1983, Baylin y Herman 2000). La enzima *Alu* I corta el ADN cromosómico a lo largo de los ejes (Bianchi *et al.* 1985). En citogenética, en los patrones de bandeado inducido por esta enzima se observa la distribución de los patrones de una secuencia normal altamente repetitiva del ADN Satélite; su sitio específico de reconocimiento es en las uniones citosina-guanina, donde existe una secuencia palindrómica específica de reconocimiento conocida como 5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5' (Bianchi *et al.* 1985, Bikle y Krüger 1993, Maniotis *et al.* 2005, Rojas-Atencio *et al.* 2012), al cortar con la enzima se visualizarían luego de la tinción, bloques claros, los cuales corresponderían a áreas no metiladas (Xiang *et al.* 2010). Una investigación anterior, identificó áreas metiladas del genoma humano relacionadas con cáncer de mama, observando más del 80% de áreas metiladas (Rojas-Atencio *et al.* 2012). Aprovechando esta propiedad, se planteó la utilización de la enzima *Alu* I, colocada sobre una lámina portaobjeto contenido de una muestra cromosómica de pacientes con leucemias agudas; para la visualización de zonas oscuras que indicarían la presencia de regiones hipermetiladas en el genoma de pacientes con esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 30 muestras de médula ósea (MO) de pacientes de ambos sexos, 18 de ellos con diagnóstico de LMA y 12 con diagnóstico de LLA, con promedio de

edad de 27 y 13 años respectivamente, referidas de los hospitales públicos y privados de la región zuliana de Venezuela, durante el período enero 2010 a diciembre 2012, y 30 muestras de médula ósea de pacientes de ambos sexos con un promedio de edad de 32 años, con enfermedades hematológicas no malignas como control para el bandeo con la enzima *Alu I*. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Genéticas de la Universidad del Zulia y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes. Las muestras de MO se extrajeron mediante aspiración a nivel esternal y todas pertenecían a pacientes que no se habían sometido a quimioterapia. Las muestras de MO se procesaron para cultivo cromosómico, siguiendo la técnica descrita por Yunis (1981), con una modificación importante representada en la utilización del medio de cultivo, Amniomax C-100 (Gibco, BRL). Obtenido el botón de células, se procedió a realizar los extendidos cromosómicos en láminas porta objetos, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se inicia la técnica de bandeo utilizada para la *Alu I*, descrita por Kaelbling *et al.* (1984) y Verma y Babu (1995). En cada uno de los porta objetos, que contenían las preparaciones cromosómicas, se colocaron 10 μ L de la enzima *Alu I*, previamente preparada, siguiendo el protocolo de preparación recomendado por la casa del fabricante (Promega). Incubadas por 20 h a 37°C e inmediatamente fueron teñidas con Giemsa al 15% durante 2 minutos. Posteriormente se observaron al microscopio óptico para su análisis y verificar la variación en el bandeo de los cromosomas, las metafases fueron fotografiadas y visualizadas con el equipo computarizado de cariotipo (Software de Leica Chantal© 2010 Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd). Se analizaron 20 metafases por paciente. Las regiones hipermetiladas localizadas en los cromosomas, según la región teñida, fueron llevadas a la base de datos del GenBank para identificar en la región metilada los genes comprometidos con leucemias agudas.

El análisis estadístico se realizó a partir de la escala de distribución de frecuencia y porcentajes y se analizaron mediante la utilización de la prueba χ^2 (Hernández Sampieri *et al.* 2006).

RESULTADOS

Se realizó la digestión de las muestras cromosómicas de los casos y los controles, observándose en los controles patrones normales de digestión, los cuales coinciden con la presencia de regiones centroméricas teñidas solo en los cromosomas 1, 9 y 16. En los pacientes con LMA se observó que 16/18 (88%) presentaron regiones

anormalmente teñidas (Tabla 1), solo en cuatro de las regiones metiladas observadas no se encontró asociación en la literatura con genes metilados en LMA (Tabla 2). En 100% de los pacientes con LLA se encontraron regiones anormalmente teñidas (Tabla 3), solo tres de las regiones metiladas observadas no se encontró asociación en la literatura con genes metilados en LLA (Tabla 4), lo que resultó altamente significativo ($p > 0,01$) en ambas patologías.

Tabla 1. Total de áreas metiladas por caso en pacientes con leucemia mieloide aguda.

Muestra	Número de zonas metiladas	Zonas metiladas
1	5	1q32-q44
		2q31-q34
		5q32-qter
		9q21-q34
		17p12-p13
2	1	17p12-p13
3	3	1p33-p36
		3q13-q22
		16p12-p13
4	3	1p33-p36
		2q14-q23
		3p21-p26
5	2	1q22-q25
		5q32-qter
6	2	2q14-q23
		9q21-q34
7	2	1q22-q25
		3p21-p26
8	4	1p33-p36
		2q31-q34
		5q32-qter
9	1	9q21-q34
10	3	3p21-p26
		10q24-qter
		12q23-qter
11	3	9p21-p24
		16q22-q24
		19q13-qter
12	2	3p21-p26
		5q32-qter
13	2	16q22-q24
		9p21-p24
14	2	1q22-q25
		16p12-p13
15	3	3p21-p26
		9p21-p24
		19q13-qter
16	2	12q23-qter
		16p12-p13

Tabla 2. Áreas cromosómicas metiladas y su asociación a genes relacionados con leucemias mieloides agudas.

Zona metilada	Gen comprometido	Autores que lo avalan
1p33-p36	P73	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005
1q22-q25	MUC	Stroopinsky <i>et al.</i> 2013
2q12-q23		Sin reporte de asociación con LMA
3p21-p26	RARB2	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005 Galm <i>et al.</i> 2005
3q13-q23	CRBP1	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005
5q32-qter		Sin reporte de asociación con LMA
9p21-p24	P15 P16	Sakashita <i>et al.</i> 2001 Shimamoto <i>et al.</i> 2005 Boulwood y Wainscoat 2007 Béguelin <i>et al.</i> 2012
9q21-q34	DAPK	Galm <i>et al.</i> 2005 Reyes <i>et al.</i> 2005 Román-Gómez <i>et al.</i> 2005 Boulwood y Wainscoat 2007
10q24-qter	MGMT	Galm <i>et al.</i> 2005
12q23-qter	SLC5A8	Whitman <i>et al.</i> 2008
15p11-p13		Sin reporte de asociación con LMA
16q22-q24	CDH1	Shimamoto <i>et al.</i> 2005 Béguelin <i>et al.</i> 2012
17p12-p13	HIC-1 P53	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005
17q21-q24		Sin reporte de asociación con LMA
19q13-qter	CEBPA	Hollink <i>et al.</i> 2011 Béguelin <i>et al.</i> 2012

Tabla 3. Total de áreas metiladas por caso en pacientes con leucemia linfocítica aguda.

Muestra	Número de zonas metiladas	Zonas metiladas
1	4	2q31-q35 8q23-qter 3p12-p21 5q31-qter
2	2	10q23-q25 7q21-q22
3	3	1p32-pter 2q31-q35 9p21-p24
4	3	6p21-p32 2q31-q35 11p14-pter
5	2	3p12-p21 5q31-qter
6	2	8p12-p22 1p32-pter
7	3	2q31-q35 3p12-p21 10q23-q25
8	3	2q31-q35 6p21-p32 11p14-pter
9	2	8q23-qter 3p12-p21
10	2	1p32-pter 7q21-q22
11	2	6p21-p32 9p21-p24
12	4	1p32-pter 3p12-p21 5q31-qter 8p12-p22

Tabla 4. Áreas cromosómicas metiladas y su asociación a genes relacionados con leucemias linfoides agudas.

Zona Metilada	Gen Comprometido	Publicaciones que lo avalan
1p33-p36	P73 RSPO1	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005 Boultonwood y Wainscoat 2007 García-Manero <i>et al.</i> 2002 Melo <i>et al.</i> 2013 Kuang <i>et al.</i> 2008
2q31-q35		Sin reporte de asociación con LLA
3p14-p21	FHIT	Melo <i>et al.</i> 2013
5q31-qter		Sin reporte de asociación con LLA
6p21-p32	P21 ASSP1	Román-Gómez <i>et al.</i> 2002 Boultonwood y Wainscoat 2007 Barrios García <i>et al.</i> 2005 Melo <i>et al.</i> 2013
7q21-q22	MDRI	García-Manero <i>et al.</i> 2002
8p12-p22		Sin reporte de asociación con LLA
9p21-p24	P15(CDKN2B) P16(CDKN2A)	Román-Gómez <i>et al.</i> 2005 Boultonwood y Wainscoat 2007 García-Manero <i>et al.</i> 2002
10q24-q25	MGMT	Boultonwood y Wainscoat 2007
11p14-pter	MYF3 P57(CDKN1C) CALCA	Román-Gómez J <i>et al.</i> (2005). Boultonwood Jacqueline y James S. Wainscoat(2007). García-Manero Guillermo <i>et al.</i> (2002).

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, grandes avances han contribuido a un mayor entendimiento del proceso biológico de las células neoplásicas, que subyace al inicio y progresión de la enfermedad. Varios estudios evidencian cambios terapéuticamente reversibles en el nivel de expresión génica sin modificaciones en la secuencia del ADN (cambios epigenéticos), como son las alteraciones de la estructura de la cromatina mediada por metilación de los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG, la modificación de histonas mediante acetilación o metilación y cambios en la estructuración jerárquica de la cromatina de orden mayor (Blum y Marcucci 2005, Reyes *et al.* 2011, Béguelin *et al.* 2012).

La transcripción inactiva de genes supresores de tumores por la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras; ha sido un foco de interés de los investigadores como un factor causal en malignidades hematológicas (Herman *et al.* 1997). Estudios moleculares han demostrado que alteraciones epigenéticas comparten un papel protagónico en el desarrollo de las leucemias agudas (Reyes *et al.* 2011). Apoyando el papel de la metilación del ADN en la patogenia de la leucemia aguda,

los pacientes con genes metilados mostraron un período de tiempo más corto para el desarrollo de una leucemia secundaria relacionada con la terapia que los pacientes con genes no metilados (Uehara *et al.* 2003)

Las modificaciones epigenéticas podrían ser potencialmente útiles en el diagnóstico temprano de enfermedades, como factores pronósticos, predictores de respuesta al tratamiento farmacológico, de la evolución de la enfermedad, así como también blancos terapéuticos (Ross *et al.* 2005, Mesa-Cornejo *et al.* 2006, Béguelin *et al.* 2012).

Se ha demostrado que varios genes supresores de tumores presentan hipermetilación en las áreas promotoras en la LMA, por ejemplo, la metilación del gen p15 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*) y p16 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), constituyen datos de mal pronóstico en LMA (Ross *et al.* 2005). Esto es especialmente importante debido al creciente interés en el uso de los tratamientos con drogas demetiladoras. Aunque en sus inicios no siempre tuvieron como blanco la metilación, estas estrategias han demostrado eficacia en ensayos clínicos que han incluido pacientes con síndrome mieloproliferativo y LMA (Pinto y Zagonel 1993, Chim

et al. 2001, Román-Gómez *et al.* 2005, Kantarjian *et al.* 2006, Reyes *et al.* 2011).

En las LLA, es donde mejor se encuentra caracterizada, la metilación específica de tumor. En los últimos años, se ha mostrado que la metilación de múltiples genes es un fenómeno común en las células LLA y constituye el mecanismo más importante para inactivar genes relacionados con el cáncer en esta enfermedad (Román-Gómez *et al.* 2002, 2005). Se ha sugerido cómo la hipermetilación del promotor puede participar en la patogénesis y el pronóstico de la LLA (Román-Gómez *et al.* 2003).

La identificación de zonas metiladas mediante el uso de enzimas de restricción, se inició en la década de los 90. Mediante esta técnica la combinación del tratamiento con bisulfito y amplificación con PCR, resultaba en la conversión de residuos de citosina no metilados a timina y residuos de citosina metilados a uracilo. Esta secuencia de metilación lleva a la creación de nuevos sitios de restricción enzimática; en estos casos se utilizó la enzima *Bst*UI (CGCG) (Kannan *et al.* 1999, Sakashita *et al.* 2001).

En este estudio se encontraron 25 regiones teñidas anormalmente luego de la digestión con la enzima *Alu I*; correspondiendo 15 a LMA y 10 a LLA, con excepción de cuatro y tres regiones respectivamente, posiblemente, por la variabilidad geográfica y también, a que representen nuevas regiones donde se ubiquen genes asociados con leucemias agudas, todas coincidieron con regiones donde se encuentran genes asociados a LMA y LLA. Un ejemplo de ello lo constituye las región teñida presente en el cromosoma 1(p33-p36) observada en LMA (Tabla 2), región donde se encuentra localizado el gen P73 (proteína tumoral P73), el cual ejerce la función de control de ciclo celular en G1-S, y ha sido mostrado metilado en LMA.

Otro ejemplo de ello lo constituye las regiones teñidas presentes en el cromosoma 3 (3p21-p26) y (3q13-q22) observadas en LMA (Tabla 2), en la primera región descrita se encuentra localizado el gen RARB2 (receptor de ácido retinoico beta 2) y en la segunda región descrita se encuentra localizado el gen CRBP1 (*retinol binding protein 1*, celular) (Fig. 1), según la base de datos del GenBank (GenBank 2013).

Investigaciones anteriores, han reportado hipermetilación de las islas CpG en la región promotora de los genes supresores de tumor RARB2 y CRBP1 en LMA (Román-Gómez *et al.* 2005). El estado de metilación del gen RARB2, se ha reportado en 20% y 27% por Galm

et al. (2005) y Reyes *et al.* (2011), respectivamente. Por otro lado, Rethmeier *et al.* (2006), además de encontrarlo frecuentemente hipermetilado en LMA, lo asocia a la presencia de transcripciones de fusión CBFbeta-MYH11 (*core binding factor, beta-myosin, heavy chain 11*).

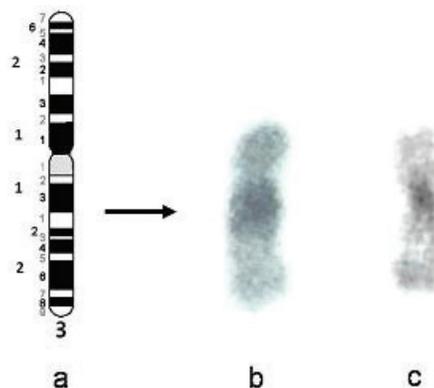


Figura 1. Cromosoma 3 (a) ideograma, (b) con región metilada a nivel de 3q13-q22 (flecha), (c) bandeo normal *Alu I*.

El gen p15 (CDKN2B), corresponde a un inhibidor de ciclina dependiente de la quinasa, conocido por controlar el ciclo celular en la fase G1 temprana. La pérdida de expresión de p15 se ha asociado con varios tipos de cáncer, pero es frecuentemente silenciado en LMA y síndrome mielodisplásico. La inactivación de p15 mediante hipermetilación ha demostrado ser uno de los mecanismos más frecuentes en LMA y se asocia a mal pronóstico de la enfermedad, sin embargo, hay grandes discrepancias en los valores de metilación reportados en la literatura que varían desde 31 a 93% (Toyota *et al.* 2001). Shimamoto *et al.* (2005), estudiaron un grupo de 61 pacientes japoneses con LMA, la metilación de esta región promotora fue detectada en el 51% de ellos, siendo considerada como de pronóstico desfavorable, demostrando según los autores la participación de este gen en una disfunción del ciclo celular que tiene un rol en la patogénesis de la LMA. Galm *et al.* (2005), consideraron el gen p15 como uno de los más frecuentemente metilados encontrándose en el 31% de los pacientes estudiados. Las islas CpG existentes dentro del promotor de p15, están hipermetiladas en aproximadamente 50-60% de los pacientes con leucemia promielocítica y se correlaciona negativamente con la supervivencia libre de enfermedad (Paul *et al.* 2010).

De igual forma, la hipermetilación de los islotes de CpG del gen p16 inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina A (CDKN2A), en su área promotora, ha sido demostrada como un mecanismo alternativo para la pérdida de expresión de p16. En LMA se han reportado valores discretos de metilación de p16, alrededor de un 10%, sin embargo, estudios en poblaciones asiáticas

destacan con 50-80% de hipermetilación de p16 (Guo *et al.* 2000, Fan *et al.* 2007). A diferencia de Reyes *et al.* (2011), en Chile, donde no encontraron metilación de p16, apoyando la teoría que el rol en LMA no sería de mayor preponderancia dependiendo del tipo de población estudiada y su área geográfica.

Es importante resaltar, que tanto el gen p15 (CDKN2B) y p16 (CDKN2A), se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 9, específicamente en la región 9p21, la cual coincide con la región anormalmente teñida (9p21-p24) encontrada en cinco casos de la presente investigación, lo que pudiera sugerir una estrecha relación entre la metilación de este gen, la zona anormalmente teñida en el cromosoma 9 y la presencia de LMA en estos casos.

La hipermetilación concurrente de múltiples genes en la LMA ha sido demostrada por varios grupos (Melki *et al.* 1999, Toyota *et al.* 2001, Galm *et al.* 2005, Reyes *et al.* 2011), ellos mostraron la inactivación por metilación de DAPK (*death-associated protein kinase 1*), MGMT (*methylguanina-DNA methyltransferase*), E-Cadherin (*Cadherin 1, type 1*), HIC-1 (*hypermethylated in cancer 1*), P53 (*tumor protein 53*), CEBPA (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*).

En la actual investigación, se hallaron zonas marcadas o anormalmente teñidas en cromosomas (Fig. 2), que coinciden con las regiones donde se encuentran localizados dichos genes (Tabla 2), lo que podría indicar también, una relación estrecha entre las zonas teñidas, los genes afectados por la metilación y la presencia de LMA.

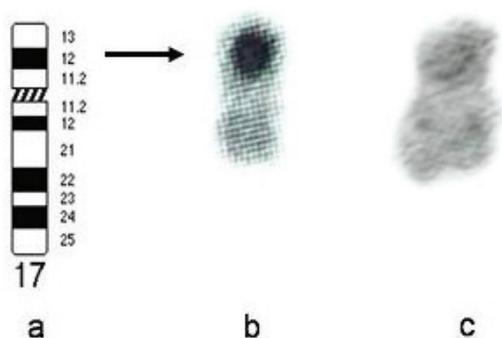


Figura 2. Cromosoma 17 (a) ideograma, (b) con región metilada a nivel de 17p12-p13 (flecha), (c) bandeado normal *A lu I*.

Por otro lado, en LLA, se ha reportado la hipermetilación del gen ASSP1 (*argininosuccinate synthetase pseudogene 1*) perteneciente a la familia de proteínas ASSP (ASPP1, ASPP2, IASPP) implicadas en las funciones apoptótica de p53 y de la familia del p53 (p63 y p73) (Bergamaschi *et al.*

2004). La expresión proteica de ASSP1 se ha observado que se encuentra reducida en LLA, atribuyendo esto a la hipermetilación del promotor de este gen. Además, la expresión anormal de ASSP1 se ha asociado con un pobre pronóstico en LLA (Agirre *et al.* 2004). El gen p73 está involucrado en la regulación del ciclo, apoptosis y progresión celular. La hipermetilación y subsecuente inactivación del gen ha sido descrita como un hallazgo común en desordenes linfoproliferativos malignos, LLA y linfoma no Hodgkin (Corn *et al.* 1999, Pluta *et al.* 2006, Melo *et al.* 2013). Así mismo, la hipermetilación del gen FHIT (*fragile histidine triad*) en LLA infantil y del adulto, éste participa en la regulación de la apoptosis y en el ciclo celular. Una frecuente pérdida de su expresión en las LLA, sugiere que los eventos que lo inactivan contribuyen al desarrollo de la leucemia (Zheng *et al.* 2004, Román-Gómez *et al.* 2005).

García-Manero *et al.* (2002), en 80 pacientes estudiados, reportaron en LLA del adulto la metilación de los genes, MDR1 (*binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*), THBS2 (*thrombospondin 2*), MYF3 (*myogenic differentiation 1*), ER (*estrogen receptor 1*), p15, THBS1 (*thrombospondin 1*), CD10 (*membrane metallo-endopeptidase*), C-ABL (*C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*), p16 y P73 fue metilado en 17 de los 80 casos (21,2%). Un total de 86,2% de los casos tenía metilación de al menos un gen, y 42,5% tenían metilación de tres o más genes. Otros estudios, han reportado en LLA metilación en los genes RSPO1 (*R-spondin 1*), P21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)*), MGMT (*methylguanina-DNA methyltransferase*), CALCA (*calcitonin-related polypeptide alpha*), P57 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) (Barrios García *et al.* 2005, Boulwood y Wainscoat 2007, Kuang *et al.* 2008).

Grupos de investigadores, ha analizado el estado de metilación de 15 genes en 251 pacientes afectados de LLA, ellos observaron, que la metilación simultánea de un elevado número de genes se asoció a una significativa reducción de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general, tanto en niños como en adultos. Esto sugiere que el patrón de metilación es un nuevo marcador de riesgo en la LLA y que puede complementar los análisis inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares habituales (Román-Gómez *et al.* 2001, Román-Gómez *et al.* 2002, 2003, 2005).

En la actual exploración, se detectaron zonas anormalmente teñidas, en cromosomas de pacientes con LLA (Tabla 4), las cuales coinciden con regiones donde se encuentran localizados genes que han sido descritos

como genes metilados en LLA, así tenemos, P73(1p36.3), RSPO1(1p34.3), FHIT(3p14.2), p21(6p21.2), ASSP1, ER(6p25), MDR1(7q21.12), p15(9p21), p16(9p21), MGMT(10q26), CALCA(11p15.4), MYF3(11p15.4), p57(11p15.5) (GenBank 2013), lo que pudiera indicar una precisa relación entre las zonas anormalmente teñidas, la metilación de estos genes y la presencia de LLA en estos casos.

Las zonas anormalmente teñidas e identificadas en este estudio no se observaron en los pacientes con enfermedades hematológicas no malignas (controles), aumentando la posibilidad que las zonas teñidas estén muy relacionadas con la presencia de genes metilados reportados en leucemias agudas.

CONCLUSIONES

Por los anteriores hallazgos, se asume que el bandeo cromosómico con la enzima *Alu I* podría resultar una excelente herramienta para la valoración inicial de los pacientes con LMA Y LLA, lo que permite visualizar en forma general el genoma total del individuo, observar las áreas metiladas que se presenten y dirigir la confirmación molecular de forma más concreta. El bandeo cromosómico con la enzima *Alu I*, representa una técnica de diagnóstico económica, comparada, con técnicas de diagnóstico de biología molecular, como, la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (combinación del tratamiento con bisulfito), y la metilación específica de genes, que por su alto costo no forman parte de los estudios de rutina en pacientes con LMA y LLA en Venezuela. En un futuro esta identificación permitiría dirigir terapias específicas a cada uno de los pacientes. Se sugiere la confirmación molecular de estas áreas metiladas que permitan corroborar estos hallazgos y, de esta manera, pueda ser utilizada como una técnica rutinaria en estos pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), a través del proyecto de investigación VAC-CONDES-CC-0570-11. Los autores agradecen la dotación de materiales reactivos y equipo necesario para la ejecución de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIRRE X, ROMÁN-GÓMEZ J, JIMÉNEZ-VELASCO A, GARATE L, MONTIEL-DUARTE C, NAVARRO G, VÁZQUEZ I,

ZALACAÍN M, CALASANZ M, HEINIGER A, TORRES A, MINNA J, PROSPER F. 2006. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 25(13):1862-1870.

BARRIOS GARCÍA M, ROMÁN GÓMEZ J, JIMÉNEZ VELAZCO A, TORRES A, HEINIGER AI. 2005. Metilación del ADN como factor pronóstico en pacientes con leucemia aguda Linfoblástica. *En: VIDELA S, BOSCH F. (Eds). La investigación en un entorno asistencial. Algunas reflexiones y ejemplos. Monografías Dr. Antonio Esteve*. 32:65-71.

BAYLIN SB, HERMAN JG. 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 16(4):168-174.

BÉGUELIN KP, FREITAS J, OLIVEIRA N. 2012. Epigenética en Leucemia Mieloide Aguda. *Hematología*. 16(3):176-184.

BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, JIN B, DURAISINGHAM S, CROOK T, LU X. 2004. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol. Cell Biol*. 24(3):1341-1350.

BESTOR TH. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet*. 9(16):2395-2402.

BIANCHI M, BIANCHI NO, PANTELAS GE, WOLF Y. 1985. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma*. 91(2):131-136.

BICKLE TA, KRÜGER DH. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev*. 57(2):434-450.

BLUM W, MARCUCCI G. 2005. Targeting epigenetic changes in acute myeloid leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol*. 3(11):855-865.

BOULTWOOD J, WAINSCOAUT JS. 2007. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br. J. Haematol*. 138(1):3-11.

CHIM CS, LIANG R, TAM CY. 2001. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J. Clin. Oncol*. 16(7):1844-1851.

CORN PG, KUERBITZ SJ, NOESEL MM, ESTELLER M,

- COMPITELLO N, BAYLIN SB, HERMAN JG. 1999. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.* 59(14):3352-3356.
- FAN L, SHEN J, YE B. 2007. Detection of p16 gene methylation status in adult patients with acute leukemia by using n-MSP. *J. Exp. Hematol.* 15(2):258-61.
- GALM O, WILOP S, LUDERS C, JOST E, GEHBAUER G, HERMAN J, OSIEKA R. 2005. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Ann. Hematol.* 84(13):39-46.
- GARCÍA-MANERO G, JERRY D, SMITH T, KORNBLAU S, LEE M, KANTARJIAN H, JEAN-PIERRE J. 2002. DNA Methylation of Multiple Promoter-associated CpG Islands in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* (8):2217-2224.
- GENBANK. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.
- GUO S, TAKI X, OHNISHI T, H. 2000. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk. Res.* 24(1):39-46.
- HAAF T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 310:13-22.
- HERMAN JG, BAYLIN SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349(21):2042-2054.
- HERMAN JG, CIVIN CI, ISSA JP, COLLECTOR MI, SHARKIS SJ, BAYLIN SB. 1997. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res.* 57(5):837-841.
- HERNÁNDEZ SAMPIERI R, FERNÁNDEZ COLLADO C, BAPTISTA LUCIO P. 2006. Metodología de la Investigación. Cuarta Edición. Editorial Mc. Graw Hill, Iztapalapa, México DF, México, pp. 705.
- HOLLINK IH, VAN DEN HEUVEL-EIBRINK MM, ARENTSEN-PETERS ST, ZIMMERMANN M, PEETERS JK, VALK PJ, BALGOBIND BV, SONNEVELD E, KASPERS GJ, DE BONT ES, TRKA J, BARUCHEL A, CREUTZIG U, PIETERS R, REINHARDT D, ZWAAN CM. 2011. Characterization of CEBPA mutations and promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 96(3):384-392.
- KAEHLING M, MILLER DA, MILLER OJ. 1984. Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. *Chromosoma.* 90(2):128-132.
- KANNAN K, THARU R, GOPINATH PM, BHARADWAJ TP, MUNIRAJAN AK, TSUCHIDA N, SHANMUGAM G. 1999. Infrequent genetic alterations of p53, p16 genes and polymorphism in fhit gene in Indian myelodysplastic syndrome. *Oncol. Res.* 11(2):101-104.
- KANTARJIAN H, ISSA JP, ROSENFELD CS, BENNETT JM, ALBITAR M, DiPERSIO J, KLIMEK V, SLACK J, DE CASTRO C, RAVANDI F, HELMER R, SHEN L, NIMER SD, LEAVITT R, RAZA A, SABA H. 2006. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 106(8):1794-1803.
- KNUDSON AG. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 1(2):157-162.
- KUANG S-Q, TONG W-G, YANG H, LIN W, LEE MK, FANG ZH, WEI Y, JELINEK J, ISSA J-P, GARCÍA MANERO G. 2008. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia.* (22):1529-1538.
- MANIOTIS AJ, VALYI-NAGY K, KARAVITIS J, MOSES J, BODDIPALI V, WANG Y. 2005. Chromatin organization measured by Alu I restriction enzyme changes with malignancy and is regulated by the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Am. J. Pathol.* 166(4):1187-1203.
- MELKI JR, VINCENT PC, CLARK SJ. 1999. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 59(15):3730-3740.
- MELO A, ARTIGAS C, MUÑOZ S, BREBI P, HOFFSTETTER R, ROA A. 2013. Perfil de metilación de genes supresores de tumores APOB1, ASSP1, p73 y FHIT en pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil. *Int. J. Morphol.* 31(3):973-979.
- MESA-CORNEJO V, BARROS-NÚÑEZ P, MEDINA-LOZANO C.

2006. Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gac. Med. Mex.* 142(1):81-82.
- MEZZANOTTE R, FERRUCCI L, VANNI R, BIANCHI U. 1983. Selective digestion of human metaphase chromosome by *Alu I* restriction endonuclease. *J Histochem Cytochem.* 31(4): 553-556.
- OKANO M, BELL DW, HABER DA, LI E. 1999. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(4):247-257.
- PAUL TA, BIES J, SMALL D, WOLFF L. 2010. Signatures of polycomb repression and reduced H3K4 trimethylation are associated with p15INK4b DNA methylation in AML. *Blood.* 115(15):3098-3108.
- PINTO A, ZAGONEL V. 1993. 5-Aza-2(-deoxycytidine (Decitabine) and 5-azacytidine in the treatment of acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes: past, present and future trends. *Leukemia.* 7(1):51-60.
- PLUTA A, NYMAN U, JOSEPH B, ROBAK T, ZHIVOTOVSKY B, SMOLEWSKI P. 2006 The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia.* 20(5):757- 766.
- RETHMEIER A, AGGERHOLM A, OLESEN L, JUHL-CHRISTENSEN C, NYVOLD C.G, GULDBERG P, HOKLAND P. 2006. Promoter hypermethylation of the retinoic acid receptor beta2 gene is frequent in acute myeloid leukaemia and associated with the presence of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts. *Br. J. Haematol.* 133(3):276-283.
- REYES SJ, BREBI PM, ILI CG, MUÑOZ S, MELO A, GUERRERO R. 2011. Perfil de metilación de genes supresores de tumores como factor pronóstico en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. *Int. J. Morphol.* 31(3): 973-79.
- RODAK B. 2004. *Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas.* 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 515-528.
- ROJAS-ATENCIO A, YAMARTE L, URDANETA K, SOTO-ÁLVAREZ M, ÁLVAREZ NAVA F, CAÑIZALEZ J, QUINTERO M, ATENCIO R, GONZÁLEZ R. 2012. Utilidad del bandeo cromosómico con la enzima *ALU I* para la identificación de zonas metiladas en cáncer de mama. *Invest. Clín.* 53(4):331-341.
- ROMÁN-GÓMEZ J, CASTILLEJO JA, JIMÉNEZ A. 2001. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br. J. Haematol.* 113(2):329-338.
- ROMÁN-GÓMEZ J, CASTILLEJO JA, JIMÉNEZ A. 2002. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21 (*CIP1/WAF1/SDI1*) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 99(7):2291-2296.
- ROMÁN-GÓMEZ J, CASTILLEJO JA, JIMENEZ A, BARRIOS M, HEINIGER A, TORRES A. 2003. The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 44(11):1855-1864.
- ROMÁN-GÓMEZ J, JIMÉNEZ-VELASCO A, AGIRRE X, BARRIOS M, CASTILLEJO JA, PROSPER F, HEINIGER A, TORRES A. 2005a. Metilación del ADN en oncohematología. *Haematologica.* 90(1):27-36.
- ROMÁN-GÓMEZ J, JIMÉNEZ-VELASCO A, AGIRRE X, PROSPER F, HEINIGER A, TORRES A. 2005b. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J. Clin. Oncol.* 23(28):7043-7049.
- ROSS JS, SYMMANS WF, PUSZTAI L, HORTOBAGYI GN. 2005. Pharmacogenomics and clinical biomarkers in drug discovery and development. *Am. J. Clin. Pathol.* 124(S):29-41.
- SAKASHITA K, KOIKE K, KINOSHITA T, SHIOHARA M, KAMIJO T, TANIGUCHI S, KUBOTA T. 2001. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *J. Clin. Invest.* 108(8):1195-1204.
- SANS J, BESSES C Y VIVES, JL. 2001. *Hematología Clínica.* Cuarta Edición. Ediciones Harcourt, S.A. Madrid, España, pp. 345-474.
- SHIMAMOTO T, OHYASHIKI JH, OHYASHIKI K. 2005. Methylation of p15 (*INK4b*) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 18(4):3680-

3689.

- STROOPINSKY D, ROSENBLATT J, ITO K, MILLS H, YIN L, RAJABI H, VASIR B, KUFE T, LUPTAKOVA K, ARNASON J, NARDELLA C, LEVINE JD, JOYCE RM, GALINSKY I, REITER Y, STONE RM, PANDOLFI PP, KUFE D, AVIGAN D. 2013. MUC1 is a potential target for the treatment of acute myeloid leukemia stem cells. *Cancer Res.* 73(17):5569-5579.
- TOYOTA M, KOPECKY KJ, TOYOTA MO. 2001. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood.* 97(9):2823-2829.
- UEHARA E, TAKEUCHI S, TASAKA T, MATSUHASHI Y, YANG Y, FUJITA M. 2003. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia. *Int. J. Oncol.* 23(3):693-696.
- VERMA RS, BABU A. 1995. *Human Chromosomes Principles and Techniques*. 2da edición. MC Graw-Hill Inc. England, pp. 235-240.
- VOGELSTEIN B, KINZLER KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10:789-799.
- WHITMAN SP, HACKANSON B, LIYANARACHCHI S, LIU S, RUSH LJ, MAHARRYK, MARGESON D, DAVULURI R, WEN J, WITTE T, YU L, LIU C, BLOOMFIELD CD, MARCUCCI G, PLASS C, CALIGIURI MA. 2008. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood.* 112(5):2013-2016.
- XIANG S, LIU Z, ZHANG B, ZHOU J, ZHU BD, J JD. 2010. Methylation status of individual CpG sites within Alu elements in the human genome and Alu hypomethylation in gastric carcinomas. *BMC Cancer.* 10(44):1-1.
- YUNIS J. 1981. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Human Pathol.* 12(6):540-549.
- ZHENG S, MA X, ZHANG L, GUNN L, SMITH MT, WIEMELS JL, LEUNG K, BUFFLER PA, WIENCKE JK. 2004. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is associated with hyperdiploid and translocation-negative subtypes of pediatric leukemia. *Cancer Res.* 64(6):2000-2006.