

Perfil de metilación en pacientes con leucemia mieloide crónica: Revisión sistemática.

Juliana Pérez Mejía¹, Paola Andrea Acevedo Toro²

¹Bacterióloga y laboratorista clínica. Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, énfasis en Hematología. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

²Microbióloga y Bioanalista. MSc en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente Escuela de Microbiología. Grupo de investigación Hematopatología Molecular (HEMO). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Resumen

La epigenética se refiere a la aparición de cambios heredables en la expresión de genes sin alteración en la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico). (1) Mecanismos como la hipermetilación del ADN están implicados en la regulación transcripcional de genes supresores de tumores en diferentes tipos de neoplasias hematológicas incluyendo la leucemia mieloide crónica. (LMC) (2, 3) Se realizó una revisión sistemática siguiendo las indicaciones propuestas en la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) con el objetivo de identificar los principales genes hipermetilados en pacientes con diagnóstico de LMC en las tres fases clínicas de la enfermedad de acuerdo con lo publicado en la literatura científica en los últimos 10 años (2003-2013).

Entre los criterios de elegibilidad de los estudios se tuvo en cuenta la fecha de publicación (entre 2003 y 2013), el tipo de publicación, solo se incluyeron artículos originales, presencia de los términos de búsqueda en título, resumen y palabras clave y finalmente

los estudios debían mencionar en qué fase clínica de la enfermedad se encontraban los pacientes evaluados. No se aplicó filtro por idioma de publicación. Finalmente, se obtuvieron 15 artículos a los cuales se les realizó un análisis descriptivo en el cual se calcularon frecuencias absolutas y relativas con base en las variables de lugar, persona y tiempo, con énfasis en el país, la fase clínica reportada para cada grupo evaluado y el año de publicación de cada artículo.

Se obtuvo un total de 39 genes estudiados en los análisis de hipermetilación en pacientes con LMC los cuales se clasificaron como genes supresores de tumores, reguladores de ciclo circadiano, genes codificantes para factores de transcripción o receptores y genes involucrados en reparación del ADN, vías de señalización y metabolismo de nucleótidos entre otros. Además, se obtuvo un valor estadísticamente significativo ($p=0,000$) en las comparaciones múltiples de la proporción de hipermetilación según la fase clínica de la enfermedad, estableciendo una posible relación entre la progresión de la enfermedad y el porcentaje de metilación de genes en pacientes con LMC. Nuestros resultados corroboran la ausencia de genes marcadores para progresión por hipermetilación en la LMC y sugieren la ejecución de estudios individuales de genes para establecer una relación causal entre la proporción de metilación y la progresión de la enfermedad.

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia hematológica clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro del grupo de neoplasias mieloproliferativas (1,2); Una de sus principales características es la proliferación del linaje granulocítico con predominio de formas maduras e intermedias, con poca cantidad de blastos en circulación (generalmente menos de 2% en fase crónica); además, usualmente cursa con leucocitosis, trombocitosis, anemia y basofilia. No obstante, los

hallazgos hematológicos dependerán de la fase de la enfermedad (3). La expansión clonal en esta neoplasia se debe a la presencia de la anomalía citogenética conocida como cromosoma Philadelphia (Ph), el cual es resultado de una translocación recíproca, t(9;22)(q34;q11.2), entre el oncogen ABL1, del inglés (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) ubicado en el brazo largo del cromosoma 9 y codificante para una proteína tirosina cinasa involucrada en procesos celulares como división, adhesión y diferenciación y el gen BCR (Breakpoint Cluster Region) ubicado en el brazo largo del cromosoma 22, el cual codifica para una proteína con actividad serina/ treonina cinasa sin función esclarecida (4). La consecuencia molecular de este evento es la presencia del gen de fusión que codifica para la proteína quimérica de 210 Kd BCR- ABL1 (5), esta posee una actividad tirosina quinasa constitutivamente activada, con capacidad de inhibir apoptosis y favorecer la proliferación de las células neoplásicas (6,7).

La LMC tiene una progresión típica de tres fases o estadios clínicos, fase crónica (FC), fase acelerada (FA) y crisis blástica (CB). Durante la progresión entre fases en la enfermedad, las células neoplásicas pierden progresivamente su capacidad de diferenciarse (8), dando paso a una serie de manifestaciones clínicas sistémicas, las cuales implican, generalmente, fiebre inexplicable, esplenomegalia, pérdida de peso, dolores en huesos y articulaciones entre otros signos y síntomas inespecíficos. En pruebas de laboratorio, la fase crónica se caracteriza por presentar resultados ligeramente alterados en valores de hemoglobina, hematocrito y recuento de plaquetas, al mismo tiempo los recuentos de blastos son inferiores al 2%. El inicio de la fase acelerada se manifiesta por leucocitosis, basofilia, trombocitopenia, anemia y aumento de blastos en sangre periférica y medula ósea y finalmente en la crisis blástica se observa mayor alteración en los parámetros anteriormente mencionados, hallazgos compatibles con una

leucemia aguda (1,9). En el desarrollo de cualquiera de las tres fases clínicas anteriormente mencionadas se realiza la detección del cromosoma Philadelphia, siendo este, el criterio más importante para el diagnóstico de la LMC, ya que esta alteración citogenética, se encuentra en más del 95% de los pacientes con dicha enfermedad (2). La OMS contempla diferentes metodologías para la detección de cromosoma Philadelphia, cariotipo convencional, FISH y PCR en tiempo real para la detección de cualquiera de los tres transcritos de BCR-ABL, siendo P210 el más frecuente en pacientes con LMC (1, 2,10). Además de la detección del cromosoma Ph o del transcrito BCR-ABL1 el hallazgo de otras alteraciones citogenéticas y genéticas es un evento común en la progresión de la LMC (1, 2, 9, 11). La incidencia mundial de la LMC es de 1 a 5 casos por cada 100.000 habitantes. Esta neoplasia puede presentarse a cualquier edad, sin embargo, es más común entre los 50 y 60 años de edad (1). Se ha observado una incidencia más alta entre personas expuestas a radiación y en individuos bajo constante exposición a químicos industriales. No se ha demostrado influencia familiar en el desarrollo de la enfermedad (4).

Los eventos biológicos que lideran el comienzo y la progresión de la LMC no solo son causados por la translocación t(9;22) y las alteraciones genéticas y/o citogenéticas acompañantes, estos también pueden ser originados por mecanismos epigenéticos que no modifican la secuencia de ADN pero alteran la expresión génica (11). El concepto de epigenética se introdujo en 1939 por *Waddington* brindando explicaciones alternas para la aparición de diferentes enfermedades entre ellas el cáncer (12). Entre los mecanismos epigenéticos más comunes, se encuentran la acetilación de histonas y la metilación del ADN. La regulación en la expresión de los genes mediante diferentes interacciones con los componentes de la cromatina es llevada a cabo por enzimas como las deacetilasas de

histonas (HDAC) las cuales interactúan con los residuos de lisina de las histonas y generan una carga positiva en los residuos de este aminoácido dando como resultado la condensación de la cromatina impidiendo la entrada de la maquinaria de transcripción. Por otro lado las acetilasas de histonas (HAT) producen una estructura más dispersa de la cromatina permitiendo el inicio de la transcripción génica (13). Se ha descrito la hipermetilación del ADN como el primer mecanismo epigenético en ser asociado con el cáncer. Este tipo de alteraciones puede ser de dos tipos: hipometilación e hipermetilación. La hipometilación global del genoma se presenta en elementos repetitivos como transposones e intrones y conlleva a inestabilidad genómica (12). La hipermetilación es el mecanismo epigenético más frecuentemente asociado a cáncer y se refiere al aumento en la metilación de secuencias específicas. Esta adición de grupos metilo es llevada a cabo por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) y ocurre en el carbono 5' de las citosinas ubicadas en regiones ricas en dinucleótidos CpG (citosina fosfato guanina), llamadas islas CpG. Cuando hay hipermetilación en estas regiones, el gen correspondiente se silencia y no se transcribe, debido al bloqueo en el reconocimiento de la secuencia promotora por parte del factor de transcripción (14, 3). (Figura 1)

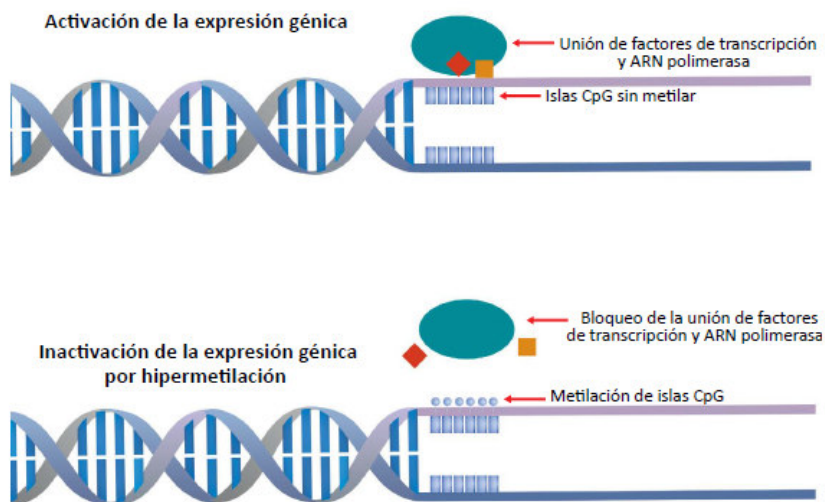


Figura 1: Silenciamiento de genes específicos por hipermetilación de sus secuencias promotoras. Cuando hay metilación las islas CpG, el gen correspondiente se silencia y no se transcribe, debido a la falta de reconocimiento de la secuencia promotora por parte del factor de transcripción. Tomado de: Epigenética: una nueva herramienta para el estudio de la leucemia mieloide crónica. Medicina & Laboratorio 2013; 19: 243-255.

Existe evidencia de que los fenómenos epigenéticos juegan un papel crítico en la patogénesis del cáncer (15). En las neoplasias hematológicas se ha descrito con frecuencia la hipermetilación de genes específicos, este evento ha sido asociado con la progresión y el pronóstico de la enfermedad (14). Los cambios epigenéticos asociados al desarrollo de este tipo de neoplasias incluyen principalmente hipermetilación de genes supresores de tumores. Es así como la aparición recurrente de varios tipos de alteraciones epigenéticas en numerosos tipos de cáncer, incluidas las neoplasias hematológicas, ha traído consigo el desarrollo de posibles aplicaciones clínicas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (16). En enfermedades como la LMC el silenciamiento anormal de genes debido a hipermetilación, ocurre con una frecuencia similar a las mutaciones durante el desarrollo y la progresión de la enfermedad (11). El incremento en la metilación de genes ha sido objeto de diferentes estudios obteniendo

resultados que proponen la asociación entre aumento de hipermetilación de genes y evolución de la enfermedad y la resistencia al tratamiento (3, 15, 17).

El análisis de genes hipermetilados en pacientes con LMC, se postula como una herramienta útil para el seguimiento y pronóstico de pacientes con LMC y para la correcta elección de una línea terapéutica. Sin embargo, y de acuerdo con los criterios de la OMS (1) el análisis de metilación no hace parte de las pruebas implementadas para el seguimiento de esta neoplasia, por lo cual este tipo de análisis se presenta como una herramienta de apoyo novedosa a la hora de profundizar en la comprensión del comportamiento de la enfermedad, la evolución de sus fases y en el momento de mejorar el enfoque terapéutico de los pacientes que desarrollan resistencia al tratamiento de primera línea. Por lo anterior se han desarrollado estudios individuales con el fin de determinar la asociación de LMC; sin embargo, estos no han sido concluyentes debido a los escasos estudios publicados, al bajo número de pacientes analizados, debido a la prevalencia de la enfermedad y a que los resultados arrojados no consolidan una asociación entre hipermetilación de genes y progresión entre fases en la LMC. Debido a esto, esta revisión permitirá conocer cuáles son los genes hipermetilados que contribuyen al paso de fases clínicas, a la resistencia y por ende a la progresión de la enfermedad, dando paso a la implementación de pruebas que puedan aportar al pronóstico de pacientes con la enfermedad. De esta forma, y teniendo en cuenta la persistencia de vacíos en el tema, la presente revisión sistemática pretende identificar los principales genes hipermetilados en la LMC de acuerdo con lo publicado en la literatura científica de los últimos 10 años.

Objetivo general

- Identificar los principales genes hipermetilados en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC) en las tres fases clínicas de la enfermedad de acuerdo a lo publicado en la literatura científica en los últimos 10 años (2003-2013).

Objetivos específicos

- Establecer los principales genes hipermetilados en pacientes con LMC de acuerdo a su frecuencia en cada fase clínica de la enfermedad.
- Clasificar los genes hipermetilados de acuerdo a los mecanismos celulares que regulan.
- Proponer la asociación entre la hipermetilación de genes específicos y la progresión de la enfermedad.

Metodología

La presente revisión sistemática se desarrolló con base en la literatura científica disponible sobre LMC e hipermetilación del ADN. Dicha revisión se elaboró siguiendo las indicaciones propuestas en la guía PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) (18).

- **Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron estudios observacionales, transversales y longitudinales en los cuales se reportó el análisis de hipermetilación de uno o más genes en grupos de pacientes con

diagnóstico de LMC. La fecha de publicación de los artículos a incluir abarcó el periodo entre junio de 2003 hasta junio de 2013. Los artículos incluidos en esta revisión debían reportar la fase clínica de la enfermedad en la cual se encontraban los pacientes de los grupos evaluados. Se excluyeron revisiones de tema, memorias de eventos, capítulos de libros, cartas al editor y tesis de grado sin publicar.

Las investigaciones seleccionadas se valoraron según las recomendaciones de la guía para el reporte de estudios observacionales STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (19). La calidad de los estudios seleccionados se definió por criterio de los revisores (J.P.M, P.A.A.T).

- **Estrategia de búsqueda**

Se realizó una búsqueda sistemática de artículos de investigación originales publicados en bases de datos multidisciplinarias y específicas de las áreas de la salud, como Pubmed, The Cochrane Library, Scielo, Wiley , Embase y Science Direct. Para realizar la búsqueda, y con el fin de lograr maximizar la especificidad de ésta, se emplearon los términos MeSH (Medical Subject Heading) “*Chronic myeloid leukemia*”, “*Chronic myelogenous leukemia*” y “*Methylation*” combinándolos con el operador *booleano AND*. Lo cual permitió la obtención de un mayor número de estudios específicos de la neoplasia hematológica de interés frente a la búsqueda por sensibilidad.

Ambos revisores (J.P.M, P.A.A.T.) llevaron a cabo la búsqueda de publicaciones, revisaron y evaluaron la calidad de los artículos seleccionados en procesos separados y finalmente se calculó el coeficiente Kappa con el fin de evaluar la reproducibilidad en la selección de publicaciones por parte de los dos revisores.

La revisión sistemática se llevó a cabo mediante una secuencia de pasos a seguir, detallados a continuación:

- Búsqueda de información inicial utilizando las combinaciones “*Chronic myeloid leukemia*” AND “*Methylation*” y “*Chronic myelogenous leukemia*” AND “*Methylation*”, sin aplicar ningún límite y sin aplicar criterio de restricción por idioma de publicación.
- A las publicaciones obtenidas, se les aplicaron filtros de fecha de publicación, tipo de publicación y una restricción según título, resumen y palabras clave.
- Las publicaciones obtenidas en el paso anterior fueron exportadas al software EndNote Web® para realizar la eliminación de duplicados.
- Finalmente para la selección definitiva de las publicaciones, se realizó una revisión profunda y exhaustiva del texto completo, se eligieron aquellos artículos que cumplieran con los criterios de selección y las características previamente establecidas por ambos revisores.

- **Extracción de datos**

Las referencias de las publicaciones seleccionadas fueron almacenadas en carpetas en el software EndNote Web® con el fin de organizar la información seleccionada según las combinaciones utilizadas, facilitar la elaboración de las referencias bibliográficas y permitir la eliminación de duplicados. Del mismo modo se utilizó el software Microsoft Excel® para el análisis descriptivo de los datos obtenidos a partir de los estudios seleccionados.

- **Análisis estadístico**

Al evaluar la reproducibilidad en la etapa inicial y final de selección de las publicaciones a ser incluidas en la revisión sistemática, con el fin de determinar la concordancia inter observador se obtuvo un índice kappa de 1,0.

Para describir los artículos se calcularon frecuencias absolutas y relativas. La caracterización de los estudios se realizó con base en las variables de lugar, persona y tiempo, con énfasis en el país, la fase clínica reportada para cada grupo evaluado y el año de publicación de cada artículo. Se calculó el porcentaje global de metilación y el específico según fase clínica de la enfermedad, con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Se calcularon intervalos para la diferencia de proporciones entre las proporciones halladas en FC, FA y CB y el número de muestras analizadas en cada fase. Se realizaron comparaciones múltiples de la proporción de metilación por fase clínica de la enfermedad. Para los análisis se emplearon Microsoft *Excel 2010* y el *Programa para análisis Epidemiológico de Datos Tabulados de la Organización Panamericana de la Salud (EPIDAT)* versión 3.1

Resultados

- **Descripción de los artículos**

En la búsqueda inicial se identificaron 6.459 artículos con la combinación entre las palabras clave establecidas, estos artículos se sometieron a los filtros planteados en la estrategia de búsqueda. Inicialmente se eliminaron 1.674 por aplicación de criterio de temporalidad. Posteriormente se eliminaron 1.172 por filtro por tipo de publicación así: 1.055 revisiones de tema, 19 capítulos de libro, 98 memorias de congresos o eventos académicos, después se eliminaron 3492 publicaciones por no cumplir con el criterio de

presencia a de los términos de búsqueda en el título, resumen y palabras clave, obteniendo 121 artículos, los cuales se sometieron a eliminación de duplicados en el programa MyEndnoteWeb® . Posteriormente, se realizó la lectura de 90 artículos obtenidos después de la eliminación de duplicados (Anexo 1), de los cuales se eliminaron 75 porque no reportaban la fase clínica de la enfermedad en los grupos evaluados, no realizaban análisis epigenético o analizaban hipometilación en pacientes con LMC. En total se eligieron 15 artículos(20, 21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34) cuyas poblaciones de estudio incluían grupos de pacientes sin límite de edad, género, condiciones demográficas, con diagnóstico confirmado de LMC, sometidos a análisis de metilación de uno o varios genes. (Figura 2) Para evaluar la reproducibilidad de la selección se calculó un índice Kappa con base en el número de artículos identificados en la fase inicial y el número de artículos que finalmente se incluyó. En el programa estadístico *EPIDAT* versión 3.1 se realizaron tablas de 2x2 ubicando en las columnas el número inicial y el número final de publicaciones del observador 1 y en las filas el número de artículos iniciales y finales identificados por el observador 2. Obteniendo, de esta forma un resultado de 1,0

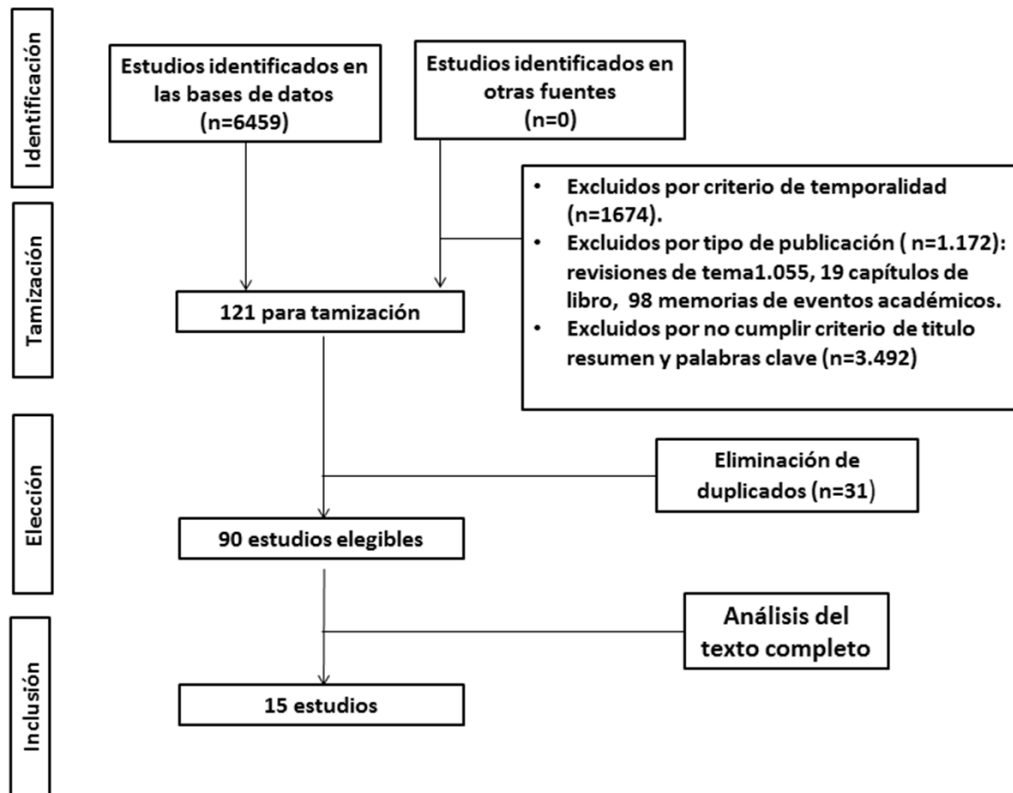


Figura 2. Flujograma de búsqueda y selección de artículos, por aplicación de criterios de selección.

De los 15 artículos incluidos 6 (40%) fueron realizados en China, 2 (13%) en España, 1(6.7%) en Estados Unidos, 1(6.7%) en Japón, 1(6.7%) en Taiwan, 1(6.7%) en Hungría, 1(6.7%) en Reino Unido, 1(6.7%) en Turquía y 1(6.7%) en Brasil. Según el análisis por fecha de publicación 4 (26.7%) de los artículos fueron publicados en el año 2003, 1(6,7%) en 2006, 1(6.7) en 2007, 2 (13%) en 2008, 2 (13%) en 2009, 1 (6.7%) en 2010, 2 (13%) en 2001 y 2(13%) en 2012. La técnica más utilizada para el análisis de hipermetilación es la reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), 13 (87%) artículos reportan su uso, mientras que la pirosecuenciación (PSC) se utilizó en tan solo dos (13%) estudios. Por otro lado, se encontraron artículos que además de realizar análisis de metilación realizaban otros tipos de pruebas entre estos 11 llevaron a cabo análisis de

expresión del gen o de los genes evaluados (11 artículos) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RQ-PCR), análisis mutacional del gen analizado (4 artículos), ensayos de hipometilación *in vitro* (2 artículos) y ensayos de metilación en líneas celulares (13 artículos), siendo

K562 la línea celular más frecuentemente estudiada (10 artículos). La asociación entre estado de metilación del gen y parámetros del hemograma como el recuento de leucocitos (WBC), recuento de plaquetas (PLT), recuento de blastos, valores de hemoglobina (Hb) y hematocrito (HTO), fue evaluada en 4 artículos. Todos los artículos reportaban la fase clínica de la enfermedad en la que se encontraban los grupos de pacientes evaluados, 6 (40%) artículos evaluaban pacientes en las tres fases clínicas (FC, FA y CB), mientras que 4(27%) evaluaban pacientes en FC y CB, 1 en FC y FA, 3(20%) únicamente evaluaban FC y 1(7%) evaluaba únicamente CB. (Tabla1)

TABLA 1: Descripción de artículos seleccionados

Estudio	Fases evaluadas			Controles	Genes	Técnica	País	Año	Muestra	Otros análisis
	FC	FA	CB							
Jelinek <i>et al</i>	65	40	15	SP 22 individuos sanos	DPYS,CDH13, PGRA, PGRB, NPM2, OSCP1, PDLIM4,TFA P2E CDKN2B y ABL1	PSC	Estados Unidos	2011	SP	
Uehara <i>et al</i>	0	0	16	SP 10 individuos sanos	MGMT,RAR β, p16,p14, p15, SOCS1, RIZ, APC, RB, DAPK, FHIT, hMLH1 y hMSH2	MSP	Japón	2011	MO	

Qian <i>et al</i>	29	3	17	<ul style="list-style-type: none"> •MO de 5 individuos con recuentos de WBC normales •MO de 3 donantes •MO 5 pacientes PTI •20 MO y 35 SP de individuos sanos •DNA universal metilado 	DAPK1	MSP	China	2008	MO	Expresión Asociación con PLT, Hb y WBC
Gomez <i>et al</i>	179	21	31	20 MO y 35 SP de individuos sanos, DNA I metilado	CDH13	MSP	España	2003	MO	Expresión Asociación con PLT, Hb, WBC, blastos, sexo y edad
Yang <i>et al</i>	16	0	19	SP de 53 individuos sanos	hPER1, hPER2, hPER3, hCRY1, hCRY2 y hBMAL1	MSP	China	2006	MO	Expresión, mutación y ensayos de hipometilación
Yang <i>et al</i>	25	0	10	SP y MO de 10 individuos sanos	PU.1	MSP BGS	China	2012	SP y MO	Expresión
Liu <i>et al</i>	70	0	30	SP de 30 individuos sanos	SOCS1	MSP BGS	Taiwan	2003	MO y/o SP	Expresión y mutación
Eneriz <i>et al</i>	100	0	0	MO de individuos sanos	BIM	MSP	España	2009	MO	Expresión
Song <i>et al</i>	31	3	7	MO de individuos sanos	PLCD1	MSP	China	2012	MO	Expresión e hipometilación Asociación con Sexo, edad, PLT, Hb y WBC
Nagy <i>et al</i>	30	0	30	SP individuos sanos	p16INK4A y p14ARF	MSP	Hungría	2003	SP	Expresión Y mutación

Strathdee <i>et al</i>	45	0	23	SP de individuos sanos	HOXA4, HOXA5	PSC	Reino Unido	2007	SP	
Yang <i>et al</i>	21	0	11	SP 17 individuos sanos	JUNB	MSP	China	2003	SP	Expresión y mutación
Wang <i>et al</i>	35	3	15	MO de 30 individuos sanos	DDIT3	MSP	China	2010	MO	Expresión, asociación con edad, sexo, PLT, Hb y WBC
Pena <i>et al</i>	27	1	2	SP de 30 individuos sanos, metiltransferasas para C+	SOCS1 y JUNB	MSP BGS	Brasil	2009	SP y MO	
Pehlivan <i>et al</i>	48	0	0	MO de 10 individuos sanos	sFRP1	MSP	Turquía	2008	MO	Expresión

Características generales de los 15 estudios seleccionados, se muestran las fases clínicas y los genes evaluados, tipo de muestra en pacientes y controles, lugar, año de publicación y análisis adicionales al estudio de metilación.

FC: fase crónica, **FA:** fase acelerada, **CB:** crisis blástica, **MO:** medula ósea, **SP:** sangre periférica, **PSC:** pirosecuenciación, **MSP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Especifica de Metilación, **BSG:** secuenciamiento con bisulfito, **WBC:** leucocitos, **PLT:** plaquetas, **Hb:** hemoglobina, **HTO:** hematocrito

- **Principales genes hipermetilados en LMC**

Los artículos finalmente obtenidos en la revisión sistemática no permiten identificar genes específicos que puedan ser propuestos como marcadores para la evaluación de hipermetilación asociada a progresión en las fases de la LMC, esto debido a que solo 6 (15%) de los 39 genes evaluados en la revisión, fueron analizados en más de un artículo, siendo estos: P14 (21, 29), p15 (20, 21), p16 (21, 29), SOCS1 (21, 26), JUNB (33, 31) y

CDH13 (20.21) . De este modo se evidencia una amplia heterogeneidad en la selección de los genes propuestos por los investigadores como posibles marcadores de progresión en la LMC.

- **Clasificación de genes por función biológica**

El grupo de genes evaluados en esta revisión sistemática incluía genes supresores de tumores (reguladores de ciclo y apoptosis), genes codificantes para factores de transcripción, proteínas reguladoras de ciclo circadiano, receptores hormonales, proteínas involucradas en la reparación del ADN, síntesis de nucleótidos, diferenciación, migración, adhesión, proliferación, transducción, transporte de solutos orgánicos y modulación de citoquinas. A pesar de las funciones anteriormente mencionadas, los autores de los estudios proponían funciones alternas de estos genes, la mayoría conferirían un carácter de posibles genes supresores de tumores, basados en resultados de otros autores. (Tabla 2)

TABLA 2: Descripción de los genes analizados

Gen	Ubicación	Función	Función propuesta
Ciclo celular			
NPM2 (nucleophosmin/nucleoplasmin 2)	8p21.3	Regulación de la vía ARF/P53	GST
CDKN2B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)	9p21	Control la progresión de ciclo a fase G1	GST
P16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9p21	Regula el papel de CDK4 y P53 en la progresión a G1	GST
P14 (cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2)	11q13	Control de proteínas en paso de fase G1 - S	GST
RB1 (retinoblastom 1)	13q14.2	Regulador negativo de ciclo celular	GST
Apoptosis			
DAPK (death-associated protein kinase 1)	9q21.33	Inducción de apoptosis	GST
BIM (BCL2 like L11 apoptosis facilitator)	2q13	Inducción de apoptosis	GST

Factores de transcripción			
TFAP2E (transcription factor AP-2 epsilon)	1p34.3	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo de varios tejidos	GST
PU.1 (SPI1 ,SFFV proviral integration oncogene)	11p11.2	Factor de transcripción involucrado en hematopoyesis	GST
HOXA4 (homeobox A4)	7p15.2	Factor de transcripción involucrado en diferenciación y morfogénesis	GST
HOXA5 (homeobox A5)	7p15.2	Factor de transcripción involucrado en diferenciación y morfogénesis	GST
JUNB (jun B proto-oncogene)	19p13.2	Factor de transcripción involucrado en diferenciación de granulocitos	GST
DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3)	12q13.1-q13.2	Factor de transcripción involucrado en apoptosis	GST
Ciclo circadiano			
hPER2 (period circadian clock 2)	2q37.3	Regulación de ciclo circadiano	GST
hPER3 (period circadian clock 3)	1p36.23	Regulación de ciclo circadiano	GST
hPER1 (period circadian clock 1)	17p13.1	Regulación de ciclo circadiano	GST
hCRY1 (cryptochrome circadian clock 1)	12q23-q24.1	Regulación de ciclo circadiano	GST
hCRY2 (cryptochrome circadian clock 2)	11p11.2	Regulación de ciclo circadiano	GST
hBMAL1 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like)	11p15	Regulación de ciclo circadiano	GST
CLOCK (clock circadian regulator)	4q12	Regulación de ciclo circadiano	GST
CKIE (Human Casein kinase Ie)	22q13.1	Regulación de ciclo circadiano	GST
TIM (Timeless)	12q13.3	Regulación de ciclo circadiano	GST
Receptores			
PGRA (progesterone receptor)	11q22-q23	Regulación de los efectos fisiológicos de la progesterona	GST
PGRB (progesterone receptor)	11q22-q23	Regulación de los efectos fisiológicos de la progesterona	GST
RARB (retinoic acid receptor, beta)	3p24.2	Unión al ácido retinoico para diferenciación y crecimiento celular	GST
Reparación del DNA			
hMLH1 (mutL homolog 1)	3p21.3	Reclutamiento de proteínas para reparación del ADN	Reparador de ADN
hMSH2 (mutS homolog 2)	2p21	Reclutamiento de proteínas para reparación del ADN	Reparador de ADN
MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase)	10q26	Remoción de lesiones por agentes alquilantes	Reparador de ADN
Metabolismo de nucleótidos			
DPYS (dihydropyrimidinase)	8q22	Cataliza la conversión de 5,6-dihidouracil a 3-ureidopropionato	GST
FHIT (fragile histidine triad)	3p14.2	Involucrado en el metabolismo de purinas	GST
Vías de señalización			
SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1)	16p13.13	Regulación negativa de vías de señalización de varias citoquinas	GST
PLCD1 (phospholipase C, delta 1)	3p22-p21.3	Transducción- Gen supresor de tumores	GST
sFRP1 (secreted frizzled-related protein 1)	8p11.21	Diferenciación y proliferación por modulación de la vía de señalización Wnt	GST

Otros			
CDH13 (Cadherin 13)	16q23.3	Molécula de adhesión	GST
OSCP1 (organic solute carrier partner 1)	1p34.3	Transporte de sustancias	Resistencia a ITKs
PDLIM4 (PDZ and LIM domain 4)	5q31.1	Desarrollo óseo	GST
RIZ (PR domain containing 2, with ZNF domain)	1p36.21	Diferenciación y división celular	GST
ABL (c-abl oncogen 1)	9q34.1	Diferenciación celular, división celular y adhesión	GST
APC (adenomatous polyposis coli)	5q21-q22	Migración, adhesión y apoptosis	GST
Descripción de los genes analizados por nombre, localización, función biológica que controlan y función propuesta por cada autor con relación a la progresión de la LMC. GST: gen supresor de tumores, ITK: Inhibidor de Tirosina Cinasa			

- **Hipermetilación y progresión en la LMC**

En los estudios agrupados en la revisión sistemática, se evaluaron 950 muestras de 868 pacientes con LMC en diferentes fases clínicas de la enfermedad, de las cuales la mayor proporción (71,2%) pertenecían a la FC, seguida por el grupo de pacientes en CB (21.4%) y finalmente los pacientes en FA (7.5%). El 78% de las muestras analizadas en la revisión correspondían a medula ósea (MO) de los pacientes incluidos en los estudios, mientras que el 38% correspondió a sangre periférica (SP). El 17% restante corresponde a pacientes en los que se analizaron ambos tipos de muestra. Un total de 340 muestras fueron empleadas como control, de estas el 71% correspondió a SP mientras que el 29% eran MO. En cuanto a la técnica empleada para evaluar el estado de metilación de las 950 muestras, la más frecuente fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa Específica de metilación (MSP), utilizada en el análisis del 88% de las muestras seguida del Secuenciamiento con bisulfito (BSG) utilizado en 17% de las muestras y finalmente la Pirosecuenciación aplicada en el 13% restante. (Tabla 3)

TABLA 3: Distribución porcentual por fase clínica, tipo de muestra y técnica.

Fase clínica N= 950 muestras	#	%	IC 95%
Fase crónica	676	71,2	68,2 – 74,1
Fase acelerada	71	7,5	5,7 – 9,2
Crisis blástica	203	21,4	18,7 – 24,0
Tipo de muestra en los Pacientes N= 950			
Sangre periférica	377	39,7	36,5 – 42,8
Medula ósea	738	77,7	75,0 – 80,4
Ambas	165	17,4	14,9 – 19,8
Tipo de muestra en los Controles N= 340			
Sangre periférica	242	71,2	66,2 – 76,1
Medula ósea	98	28,8	23,9 – 33,8
Técnica N= 950			
Pirosecuenciación	120	12,6	10,5 – 14,8
MSP	830	87,4	85,2 – 89,5
BGS	165	17,4	14,9 – 19,8
Distribución porcentual de las muestras analizadas según fase de la enfermedad, tipo de muestra y técnica de detección empleada en el análisis de metilación con sus respectivos intervalos de confianza del 95%.			

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de muestras incluidas en cada fase clínica de la enfermedad, siendo mayor la inclusión de pacientes en la FC (71%), seguida de la CB (21%) y en último lugar la FA (8%). Sin embargo se observó un porcentaje de metilación mayor, con un valor estadísticamente significativo, en la CB (64%) seguido de la FA (41%) y en último lugar la FC (51%). (Figura 3)

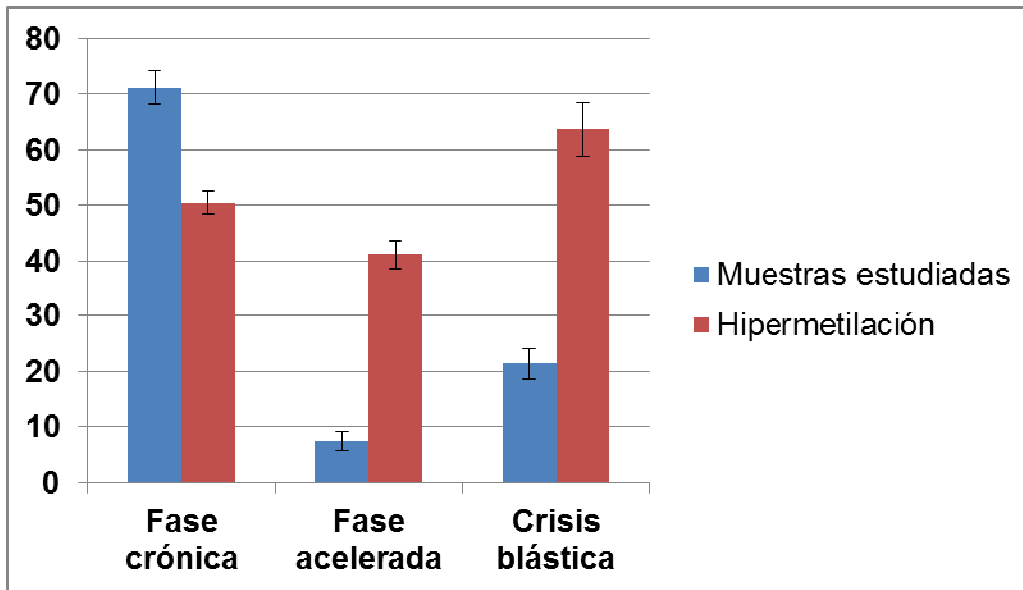


Figura 3. Distribución porcentual de las muestras estudiadas y de la proporción de Hipermetilación, según fase clínica de la enfermedad.

La proporción de hipermetilación fue estadísticamente diferente en las tres fases clínicas estudiadas, en las comparaciones múltiples se observó que en la crisis blástica fue mayor entre un 17,1% y 28,0% frente a la fase acelerada, y mayor en un 8,0%-18,5% en comparación con la fase crónica; mientras que en la fase crónica se halló una hipermetilación mayor entre un 6,0% y 12,6% frente a las fase acelerada. (Tabla 4)

TABLA 4: Proporción de hipermetilación y fase clínica

Proporción de hipermetilación				
Fase clínica	N	#	%	IC 95%
Fase crónica	2268	1145	50,5	48,4 – 52,6
Fase acelerada	1495	616	41,2	38,7 – 43,7
Crisis blástica	411	262	63,7	59,0 – 68,5
Comparaciones múltiples de la Proporción de hipermetilación según las fases clínicas de la enfermedad				
Fase 1 (P₁)	Fase 2 (P₂)	IC P1-P2	Estadístico Z ajuste por bonferroni	Valor p
Crisis blástica	Fase acelerada	17,1;28,0	8,064	0,000
Crisis blástica	Fase crónica	8,0;18,5	4,900	0,000
Fase crónica	Fase acelerada	6,0;12,6	5,549	0,000
<p>Comparación de la proporción de hipermetilación según la fase clínica de la enfermedad. Para el cálculo de la proporción de hipermetilación se tomó como denominador el total de muestras procesadas para cada gen estudiado y como numerador la frecuencia absoluta de genes hipermetilados.</p>				

Discusión

En la presente revisión sistemática, la diferencia en la proporción de metilación en las tres fases clínicas de la LMC arrojó un valor estadísticamente significativo ($p= 0,000$), siendo menor en la FC y aumentando en la FA y CB. Este hallazgo, puede deberse a mecanismos epigenéticos, que acompañan a la traslocación t(9;22) y que causan silenciamiento de genes involucrados en la regulación de diversos mecanismos celulares

que conllevan al aumento en las tasas de proliferación y/o disminución en las tasas de apoptosis. La progresión de fase es quizás el evento clínico más estudiado en la LMC, debido a las complicaciones clínicas y deterioro del paciente que trae consigo. Se encuentran diferentes estudios que analizan desde el punto de vista genético y citogenético los eventos acompañantes a la translocación t(9;22) (35,36,37), los cuales se hacen más evidentes con la progresión de la enfermedad, este fenómeno conocido como evolución clonal, se encuentra asociado a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte del gen de fusión BCR- ABL1, contribuyendo a la inestabilidad genómica y propiciando la progresión de la enfermedad (38,39). Sin embargo, la progresión entre fases también puede atribuirse a fenómenos epigenéticos, siendo la hipermetilación, el más común de estos. Es así como se encuentran diferentes estudios que concluyen que las alteraciones epigenéticas pueden mediar la progresión entre fases de la LMC de forma independiente a los eventos citogenéticos y a las mutaciones que acompañan a la translocación t(9;22). Esto se refleja en el aumento del porcentaje de metilación de diferentes genes a medida que avanza la neoplasia (3) siendo esto un evento concordante con los resultados del análisis de la presente revisión sistemática.

En este trabajo se observó que la mayor parte de los artículos provienen de China, este país cuenta con instituciones hospitalarias que aportan gran número de publicaciones en el área de neoplasias hematológicas. Cabe anotar que solo un artículo del total de los seleccionados proviene de un país de América Latina, Brasil, lo cual evidencia que el análisis de metilación de genes en LMC es un tema poco estudiado por lo tanto no se tienen resultados concluyentes acerca de este mecanismo epigenético en nuestro medio. Además, la búsqueda en la base de datos *Scielo* corrobora la poca cantidad de estudios realizados en América Latina.

En cuanto a la técnica utilizada en los artículos seleccionados para realizar en análisis de metilación, se observó que la gran mayoría de los estudios utilizaban MSP. La MSP es una técnica para análisis de metilación basada en un tratamiento previo del ADN extraído con bisulfito de Sodio con el fin de convertir las Citosinas no metiladas en Uracilos y llevar a cabo una amplificación con primers específicos para la secuencia metilada y para la secuencia no metilada, revelando mediante geles de agarosa las bandas correspondientes a alguna de las secuencias analizadas (40). A pesar de la buena sensibilidad y especificidad de la técnica, actualmente se usan otro tipo de metodologías para evaluar el porcentaje de metilación de genes en neoplasias hematológicas, siendo estas más sensibles y específicas, pero a su vez más costosas. Entre las técnicas utilizadas en la actualidad se encuentran los microarreglos, que permiten evaluar gran cantidad de genes en un solo ensayo, técnicas de secuenciamiento de segunda generación, variaciones de MSP entre otras, que permiten la obtención de resultados cada vez más precisos (41). Sin embargo y a pesar de todas las ventajas que trae la implementación de estas nuevas tecnologías, la MSP continúa siendo la técnica más utilizada por disponibilidad de equipos, reactivos y por su bajo costo frente a otras técnicas.

Entre los 15 artículos seleccionados, 11 (22, 23,24,25,26,27,28, 29, 31,32,34) realizaron análisis de expresión del gen o genes estudiados. Este tipo de análisis fue realizado con el fin de asociar la disminución o a ausencia de expresión génica con el estado de metilación. En la mayoría de los estudios que realizaron este tipo de análisis se encontró una concordancia entre la hipermetilación del gen y la disminución de su expresión. Esta relación se validó por pruebas estadísticas en 10 artículos, solo el estudio de *Gomez et al.2003*, analizó el gen CDH13 y no encontró concordancia entre las dos variables, proponiendo otros mecanismos como posible origen del silenciamiento génico en estos

pacientes. Igualmente se llevó a cabo el análisis mutacional de los genes estudiados en 4 artículos con el fin de detectar mutaciones frecuentes de los genes estudiados (24, 26, 29, 31) que pudieran estar asociados a la presencia o progresión de la LMC, sin embargo no se encontraron mutaciones en estos análisis. Por otro lado, 2 de los artículos (24, 28) llevaron a cabo ensayos de hipometilación *in vitro* con líneas celulares y muestras de pacientes con el fin de verificar la acción demetilante del medicamento 5- Azacitadina, el cual es utilizado de forma exitosa en pacientes con LMC para disminuir el porcentaje de metilación y hacer la terapia con ITKs (Inhibidores de Tirosina cinasa) más efectiva, obteniendo resultados que demuestran la acción del medicamento en la disminución del porcentaje de metilación de en células neoplásicas (3).

Entre los análisis de metilación, 8 artículos (22,24, 25, 26, 27, 28, 31, 34), incluyeron líneas celulares para evaluar la metilación de sus genes de interés, los resultados en todos los estudios fueron concordantes. La hipermetilación de los genes blanco se presentó tanto en los pacientes como en las líneas celulares. La línea celular K562 fue la más frecuentemente estudiada, 10 artículos reportaron su uso. K562 es una línea celular correspondiente a una CB de una LMC (42). En la presente revisión sistemática excluimos los artículos que reportaron análisis en líneas celulares por posibles sesgos en los resultados debido al alto porcentaje de metilación que pueden presentar las líneas celulares correspondientes a estadios tan avanzados de la enfermedad. Sin embargo consideramos valioso mencionar este tipo de análisis complementarios que ayudan a afianzar la posible relación entre hipermetilación y progresión de la LMC.

El análisis de metilación en la LMC se puede llevar a cabo en muestras de medula ósea. La LMC presenta una ventaja sobre otro tipo de neoplasia, en pacientes con LMC se puede encontrar una población celular muy similar en medula ósea (MO) y en sangre

periférica (SP). Es así como en nuestra revisión sistemática el 78% de las muestras correspondía a MO, mientras que el 71% de los controles fueron SP. Cabe anotar que tres estudios utilizaron como control DNA universal metilado (22, 23 y 33), disponible en kits comerciales, siendo este el control ideal a la hora de realizar análisis de metilación ya que se debe tener en cuenta que la metilación es un mecanismo normal en las células eucariotas cuya finalidad es silenciar genes que no se expresan constitutivamente y que este porcentaje normal de metilación varía entre tejidos (3).

El porcentaje global de metilación en esta revisión sistemática fue estadísticamente mayor en la fase de crisis blástica lo cual concuerda con reportes de estudios individuales (3, 43,44). La hipermetilación es un mecanismo epigenético que se ve influenciado por diferentes factores inherentes a la LMC, como la producción de ROS que fomenta mecanismos que finalizan con la desregulación de la función de las DNMTs (38). El silenciamiento de genes supresores de tumores es la vía de inicio de múltiples neoplasias hematológicas. En la LMC este silenciamiento se refleja en la progresión entre fases lo cual se hace evidente en nuestra revisión sistemática, ya que, fuera de ser mayor la proporción de metilación entre fases, esta tiene un valor estadísticamente significativo ($p=0,000$) para cada fase en la comparación múltiple de proporción de metilación. Además el n muestral para la revisión sistemática aumentó de forma significativa con respecto a los estudios individuales incluidos en esta, lo cual valida los resultados obtenidos, mejorando una de las principales limitaciones en los estudios en LMC, el bajo tamaño de la muestra debido a la baja prevalencia de la enfermedad.

Un total de 39 genes fueron analizados en el presente trabajo, aumentando de forma significativa, el número de genes analizados en estudios individuales, siendo 13 el más alto (21) y uno en la mayoría de estudios. Los genes estudiados fueron clasificados según

el mecanismo celular que estos regulan (tabla 3), encontrando una gran diversidad en el tipo de genes seleccionados por los diferentes autores para realizar el análisis.

- **Hipermetilación de genes y progresión en LMC**

Como se mencionó en los resultados, la amplia diversidad de genes encontrados en la revisión no permitió identificar genes que puedan ser propuestos como marcadores de progresión de fase en estudios de hipermetilación en pacientes con LMC. Sin embargo, es importante resaltar los resultados arrojados por cada estudio y correlacionar el análisis de los genes evaluados en más de un estudio con el fin de enfatizar en la importancia de la selección de genes para este tipo de estudios.

SOCS1

Es un gen involucrado en la regulación de diversas citoquinas que actúan en vías de señalización. El estudio realizado por *Uheara et al, 2011* evaluó el estado de metilación de este gen en 16 pacientes con LMC en CB sin encontrar hipermetilación. Por otro lado en el estudio realizado por *Pena et al, 2009* se realizó el análisis del gen diferenciando el sitio de hipermetilación de este entre región promotora y exón 2, reportando mayor número de muestras hipermetiladas en FC cuando se analizó el exón 2 (14/27) frente a la región promotora (2/25), mientras que en CB ninguna muestra reportó hipermetilación concordando con los resultados de *Uheara et al, 2011* y a su vez discrepando con el análisis realizado por *Yiu et al, 2003*, quienes proponen a SOCS1 como gen marcador para progresión de fases por hipermetilación en LMC. Este estudio analizó 112 muestras y encontró un porcentaje de metilación de 46% en FC y del 67% en CB esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0001$). La discrepancia en los resultados entre estudios debe ser analizada de manera crítica ya que los estudios de *Uheara et al, 2011*

y *Pena et al, 2009* tienen menor número de muestras analizadas (n=16 y n= 30, respectivamente) por lo tanto el poder estadístico de los resultados disminuye en comparación con el n poblacional del estudio de *Yiu et al, 2003*. Estos resultados no son concluyentes en cuanto a la variación en el perfil de metilación de este gen, debido a las limitantes anteriormente mencionadas.

DAPK1

Qian et al, 2008 evaluaron el estado de metilación del gen DAPK1 en 49 pacientes con LMC, hallando un porcentaje de metilación significativo en 25 pacientes (10 en FC, 3 en FA y 12 en CB), sugiriendo una relación entre la hipermetilación de este gen y la progresión de fases ($p = 0.013$ en FC, $p = 0,05$ en FA y $p = 0,031$ en CB). Este estudio no encontró relación entre parámetros del hemograma (recuento de leucocitos, valores de hemoglobina y hematocrito, recuento de blastos) edad y sexo con estado de hipermetilación del gen. Los resultados del análisis de este estudio concuerdan con el reporte realizado por *Uehara et al, 2011*, quienes evaluaron el estado de metilación del gen en 16 pacientes, hallando hipermetilación de este en 1 de 16 evaluados. Sin embargo, este único individuo presentó hipermetilación de 5 genes (MGMT, RARB, P16, DAPK y FHIT) siendo un hallazgo poco frecuente en la población estudiada, sugiriendo un papel importante de este grupo de genes en la progresión de la enfermedad concordante con otros reportes de aumento de hipermetilación de genes en CB (3).

JUNB

JUNB representa el único gen incluido en nuestra revisión que reporta 100% de metilación en FC y CB. Este gen, analizado por *Yang et al 2003*, se encontró metilado en 31 pacientes incluidos en el estudio y se propone como un gen asociado al desarrollo de la LMC por contribuir al mantenimiento de la ventaja proliferativa en las células neoplásicas.

En contraste con este estudio, *Pena et al, 2009*, reportan hipermetilación del gen en solo un paciente de 26 evaluados en FC y en ningún paciente de 3 en CB. Sin embargo se debe tener en cuenta el número de pacientes analizados en el segundo estudio como la principal limitación de este a la hora de interpretar las diferencias y su significado entre ambos estudios. Cabe anotar que el estudio de *Pena et al, 2009* es el único realizado en América Latina que cumplió con los criterios de selección de nuestra revisión, poniendo en evidencia la falta de estudios de este tipo en nuestro medio.

CDKN2A (P16)

Nagy et al, 2003 evaluaron el impacto de la hipermetilación de los genes P16 y P14 en la progresión de la FC a la FA en LMC obteniendo como hallazgo relevante la ausencia de hipermetilación de ambos genes en FC, mientras que en la FA se observó un aumento significativo en la hipermetilación de ambos genes en un número similar de muestras hipermetiladas (12 para cada gen), proponiendo, de esta forma, a ambos genes como marcadores de paso de FC a FA. Los resultados de *Uheara et al, 2011*, no reportan hipermetilación de P16 en CB, por lo tanto, al contrastar estos resultados, se puede sugerir un papel importante de la hipermetilación de este gen en las fases iniciales de la enfermedad pero pierde valor pronóstico en el paso a CB. Sin embargo se hace énfasis en el bajo tamaño de la población analizada en el estudio de *Uheara et al, 2011* y su posible influencia sobre los resultados.

CDKN2B (p15)

Este gen supresor de tumores, es frecuentemente estudiado en diferentes tipos de neoplasias incluyendo las hematológicas, debido a su papel relevante en control de ciclo celular. (3) Sin embargo, en nuestra revisión 3 de 16 pacientes en el estudio realizado por *Uheara et al, 2011* y en 11 pacientes en la investigación llevada a cabo por *Jelinek et al,*

2011, presentaron hipermetilación de este gen. Debido a esto no es posible proponer un papel determinante sobre la hipermetilación del gen y la progresión de la LMC.

Factores de transcripción

Entre los tipos de genes más evaluados en esta revisión se encuentran los factores de transcripción, entre ellos se encuentra PU.1, el cual está estrechamente ligado al proceso de hematopoyesis. *Yang et al, 2012*, proponen una relación entre su hipermetilación y el avance en fases clínicas en la LMC. Sin embargo, en nuestra revisión sistemática este estudio presentó dificultad a la hora de ser incorporado al análisis de metilación total debido a que no desagrega los resultados del análisis de metilación por fase clínica dificultando la extracción de datos por cada fase. Otros factores de transcripción evaluados son los genes de la familia HOX (homeobox genes), los cuales codifican para factores de transcripción vitales para procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia y su hipermetilación ha sido reportada en varios tipos de cáncer. *Strathdee et al, 2007* reportan, hipermetilación de ambos genes asociada a paso a crisis blástica, HOXA5 ($p = 0.00002$) y HOXA4 ($p = 0.006$), relacionando su hipermetilación con el aumento de granulocitos típico de la enfermedad. El estado de metilación del gen DDIT3, otro factor de transcripción evaluado, fue analizado por *Wang et al, 2010* en 53 pacientes con LMC. En este trabajo no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la proporción de metilación entre fases de la enfermedad y se recomienda verificar una posible asociación de este gen con progresión de la enfermedad. Sin embargo se encontró una asociación entre el recuento de leucocitos y la hipermetilación del gen, no se encontró asociación con otros parámetros del hemograma ni con la edad y el género. Por último, encontramos en gen TFAP2E, este es un factor de transcripción que cumple

funciones de gen supresor de tumores, este tipo de genes se encuentran frecuentemente hipermetilados en neoplasias hematológicas incluyendo la LMC y se encontró Hipermetilado en 75 de 120 pacientes en el estudio realizado por *Jelinek et al,2011*.

Control de apoptosis

Como miembro de la familia BCL, el gen BIM se encuentra relacionado con control de apoptosis, Su silenciamiento por hipermetilación ha sido asociado a disminución en las tasas de apoptosis de células neoplásicas en LMC y a disminución en las tasas de remisión molecular de pacientes con la neoplasia *Eneriz et al, 2009*. Entre otros genes reguladores de apoptosis evaluados en nuestra revisión se encuentre DAPK1, los resultados en su análisis fueron discutidos anteriormente y sugieren la hipermetilación de este gen como un evento frecuente en la LMC.

Control de vías de señalización

PLCD1 es postulado en el estudio de *Song et a, 2012* como un gen supresor de tumores. De 41 pacientes evaluados, 23 evidenciaban hipermetilación del gen (17, 2 y 4 en FC, FA y CB respectivamente). Se describe la aparición de la hipermetilación del gen como un evento temprano en la LMC, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la hipermetilación de este gen y la progresión en fase clínica ni con los valores de hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, recuento de leucocitos, edad y género. Por otra parte, *Pehlivan et al, 2008*, reportaron metilación del gen SFRP1 en solo 7 de 41 muestras analizadas, de esta forma no informaron asociación entre la hipermetilación de este gen y la progresión de la enfermedad, es importante resaltar la posible relación entre la hipermetilación del gen estudiado y la persistencia del cromosoma Filadelfia, disminuyendo las tasa de remisión citogenética y molecular en

pacientes con LMC, posiblemente debido a bloqueo de la interacción del gen con vías como la Wnt.

Control de proliferación

Gomez et al, 2003, proponen la hipermetilación del gen CDH13 como un mecanismo que favorece la proliferación de granulocitos en LMC, reflejando este fenómeno en las leucocitosis marcadas que presentan los pacientes con LMC. La hipermetilación de este gen se encontró en 99 de 179 muestras en FC evaluadas y en 52 muestras en FC correspondientes a los mismos pacientes indicando que la aparición de la hipermetilación del gen no está relacionada con la progresión pero si con la sobrevida libre de la enfermedad ($p= 0.03$).

Otros

El estudio realizado por *Yang et al, 2006* propone a un grupo de genes reguladores de ciclo circadiano (hPER1, hPER2, hPER3, hCRY1, hCRY2, hBMAL1, CLOCK, CKIE, TIM) como reguladores indirectos de proteínas involucradas en control de ciclo celular, basándose en reportes de relación entre la disrupción del ciclo circadiano y su asociación con la aparición de cáncer, se realizó el análisis de metilación del grupo de genes anteriormente mencionado en pacientes con LMC, obteniendo un estado de hipermetilación en los genes hPER2, hPER3 con diferencia estadísticamente significativa entre el estado de hipermetilación de hPER3 en FC y CB, siendo menor en la primera fase.

Jelinek et al, 2011 describen el análisis de 10 genes (DPYS, CDH13, PGRA, PGRB, NPM2, OSCP1, PDLIM4, TFAP2E, CDKN2B y ABL) mediante pirosecuenciación, obteniendo porcentajes de metilación con valores estadísticamente significativos en los

genes PGRA, PGRB, TFAP2E, CDKN2B y OSCP1. PGRA, PGRB, TFAP2E, dichos genes mostraron un incremento en sus porcentajes de metilación a medida que avanza la fase clínica de la enfermedad, mientras que OSCP1 muestra mayores porcentajes de hipermetilación en pacientes resistentes a la terapia con Imatinib, proponiendo los cuatro primeros genes (PGRA, PGRB, TFAP2E, CDKN2B) como parte de un fenotipo “hipermetilador” y el último (OSCP1) como un marcador para pronóstico de resistencia a la terapia de primera línea. Los genes que codifican para receptores hormonales (PGRA, PGRB) han sido asociados a desarrollo de cáncer mediado por hipermetilación. CDKN2B, también conocido como P15 es un gen supresor de tumores que regula ciclo celular. Por otro lado OSCP1 es un gen que codifica para una proteína involucrada directamente en el transporte del Imatinib hasta las células neoplásicas, su silenciamiento por hipermetilación se propone como un factor asociado a resistencia.

El análisis de los genes incluidos en esta revisión sistemática, evidencia la heterogeneidad de genes seleccionados a la hora de realizar estudios de hipermetilación en LMC, este factor dificultó la extracción de datos concluyentes en cuanto a los genes más frecuentemente hipermetilados en LMC. Este análisis pone en manifiesto la dificultad para proponer genes como marcadores de progresión asociados a hipermetilación en pacientes con LMC, sin embargo, discute los resultados encontrados en los estudios individuales con el fin de valorar la información ofrecida por cada uno de estos y teniendo en cuenta las limitaciones propias de cada estudio, como el tipo de técnica, los controles utilizados y la cantidad de muestras analizadas lo cual disminuye el poder estadístico de los resultados arrojados. Por otra parte, el reporte del estado de metilación por fases no era claro en un estudio (25) y dos (20, 24) de los estudios que analizaban más de un gen no desagregaban los resultados de hipermetilación de cada gen por paciente, sobreestimando los porcentajes de metilación.

A pesar de estas limitaciones, la presente revisión sistemática presenta ciertas ventajas sobre los estudios individuales realizados para analizar hipermetilación en LMC, siendo estas: aumento de la población estudiada, lo que implica un aumento en el poder estadístico de los desenlaces; control de sesgos de selección en las poblaciones estudiadas, ya que con los criterios de inclusión y exclusión y con los análisis del texto completo se sabía de antemano si el estudio se había realizado de forma adecuada; identificación de limitaciones que pueden ser corregidas en estudios en nuestra población o ventajas que pueden ser tomadas en cuenta para próximos estudios como implementación de técnicas más sensibles y específicas, uso de DNA universal metilado como control, concordancia entre tipo de muestra y control utilizados e implementación del análisis de la relación entre parámetros del hemograma y estado de metilación.

- **Perspectivas**

Finalmente y debido a que los mecanismos epigenéticos, principalmente la hipermetilación, pueden llegar a ser influenciados por fenómenos inherentes a la LMC, como la producción de ROS la cual va aumentando a medida que la enfermedad progresa de fase y teniendo en cuenta los datos arrojados por los estudios analizados en esta revisión sistemática, se puede sugerir una posible relación entre la metilación de genes y la progresión de la enfermedad, sin embargo, se deben realizar más estudios individuales de genes para establecer una relación causal, ya que los datos obtenidos en esta revisión sistemática no permiten determinar dicho tipo de relación. Además nuestros resultados corroboran la ausencia de genes marcadores para progresión por hipermetilación en la LMC, se sugiere realizar más estudios con el fin de explorar el comportamiento de genes específicos en nuestra población para determinar un posible perfil de metilación que sea útil a la hora de proponer análisis epigenéticos en pacientes con LMC.

Bibliografía

1. A Orazi, JM Bennett, U Germing, R.D Brunning, B.J Baing, J Thiele. Myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasms. En: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. 76-86.
2. Vardiman J. Myeloproliferative neoplasms. En: Hematopathology. First Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. 698-732.
3. Pérez-Mejía J, Acevedo-Toro PA. Epigenética: una nueva herramienta para el estudio de la leucemia mieloide crónica. *Medicina & Laboratorio* 2013; 19: 243-255.
4. Lavallade H. Chronic myeloid leukaemia. *Medicine*. 2013; 41: 275-277.
5. Morales C *et al.* Leucemia Mieloide Crónica: diagnóstico y tratamiento. *Chronic Myeloid Leukemia: diagnosis and treatment. CES Medicina*. 2010; 24: 97-108.
6. Zhang Y, Rowley JD. Chronic myeloid leukemia: current perspectives. *Clin Lab Med*. 2011; 31: 687-698.
7. Valencia J *et al.* Investigating siRNA delivery to chronic myeloid leukemia K562 cells with lipophilic polymers for therapeutic BCR-ABL down-regulation. *J Control Release* .2013; 172: 495–503.

8. Roychowdhury *et al.* Managing resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood Reviews*.2011; 25: 279–290
9. Pesach J *et al.* Molecular evolution of chronic myeloid leukaemia. *Semin cancer biol.* 2001; 11: 313–322.
10. Arpinati M. Molecular Monitoring of BCR-ABL Transcripts after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013; 19: 735-740.
11. Sastry P. Prevention of progression in chronic myeloid leukemia by altering DNA methylation with a pyridoxine analogue. *Medical Hypotheses*.1999;53: 488–489
12. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008, 358:1148-1159.
13. Wilting RH, Dannenberg JH. Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012; 2: 21-38.
14. Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 347-357.
15. Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Lett* 2002; 185: 1-12.

16. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res.* 2011;21:502-517
17. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009: 461-476.
18. Urrutia G, Bonfill X. PRISMA declaration: A proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses. *Med Clin .* 2010;135 :507–511.
19. Strobe Statement. Strobe Statement Strengthening reporting of observational studies in epidemiology. Strobe checklists (Internet). (Consultado el 4 de mayo de 2013) Disponible en: <http://www.strobe-statement.org/index.php?id=available-checklists>.
20. Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MR, Kondo K, He R, Chung W, et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS One* 2011; 6: 1-9.
21. Uehara E, Takeuchi S, Yang Y, Fukumoto T, Matsushashi Y, Tamura T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Oncol Lett* 2012; 3: 190-192.

22. Quian J *et al.* Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1 (DAPK1) CpG island in chronic myeloid leukemia. *Eur J Hematol.* 2008. 82:119–123.
23. Gomez J *et al.* Cadherin-13, a Mediator of Calcium-Dependent Cell-Cell Adhesion, Is Silenced by Methylation in Chronic Myeloid Leukemia and Correlates With Pretreatment Risk Profile and Cytogenetic Response to Interferon Alfa. *Journal of Clinical Oncology.* 21; 2003: 1472-1479.
24. Yang M. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: Alternative methylation pattern of *hPER3*. *Cancer Sci.* 2006; 97:1298–1307.
25. Yang *et al.* Down-regulation of hematopoiesis master regulator PU.1 via aberrant methylation in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2012; 96:65–73.
26. Liu T *et al.* Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2003, 123, 654–661.
27. San Jose-Eneriz E *et al.* Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1877-1889.
28. Song J. Epigenetic inactivation of PLCD1 in chronic myeloid leukemia. *Int J mol med.* 2012; 30: 179-184.

29. Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, Konya J, et al. Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2298-2305.
30. Stradee et al. Inactivation of HOXA Genes by Hypermethylation in Myeloid and Lymphoid Malignancy is Frequent and Associated with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 5048-5055.
31. Yang M *et al.* JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2003; 101:3205-3211.
32. Wang Y *et al.* Methylation status of DDIT3 gene in Chronic Myeloid Leukemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010: 29-54.
33. Pena M *et al.* Methylation status of the SOCS 1 and JUNB genes in chronic myeloid leukemia patients. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31:147-152.
34. Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009; 33: 1062-1067.
35. Pesach J et al. Molecular evolution of chronic myeloid leukaemia. *Seminars in cancer biology.* 2001;11: 313–322.

36. You R. Identification of DNA methylation biomarkers in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *GMBHS*. 2012; 4: 12-15.
37. Joha S *et al*. Genomic characterization of Imatinib resistance in CD34+ cell populations from chronic myeloid leukaemia patients. *Leuk Res*. 2011; 35: 448–458.
38. Sardina J *et al*. Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 81: 257–274.
39. Sallmyr A *et al*. Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett*. 2008; 270: 1–9.
40. Gutierrez S *et al*. Epigenetic regulation of PRAME in acute myeloid leukemia is different compared to CD34+ cells from healthy donors: Effect of 5-AZA treatment. *Leuk Res*. 2012; 36: 895–899.
41. How A *et al*. DNA methylation based biomarkers: Practical considerations and applications. *Biochimie*. 2012; 94: 2314-2337.
42. American Type Culture Collection. K562 cell line (Internet). (Consultado el 18 de mayo de 2014) Disponible en <http://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx>.

43. You RI, Ho CL, Hung HM, Hsieh YF, Ju JC and Chao TY. Identification of DNA methylation biomarkers in imatinib- resistant chronic myeloid leukemia cells. GMBHS. 2012; 4: 12-15.
44. Leone G, Voso MT, Teofili L, Lubbert M. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. Clin Immunol 2003; 109: 89-102.