

## Análisis de metilación en pacientes con leucemia mieloide crónica en diferentes instituciones médicas de Medellín

### *Methylation analysis in patients with chronic myeloid leukemia in different medical institutions in Medellín*

Lic. Claudia Yaneth Patiño Zapata <sup>I</sup>; MSc. Luz Marina Jaramillo Pérez <sup>I</sup>; MSc. Laura María Medina Gómez <sup>I</sup>; MSc. Luz Yaneth Orozco Jiménez <sup>II</sup>; Dr. Kenny Mauricio Galvéz Cardenas <sup>III</sup>; MSc. Paola Andrea Acevedo Toro <sup>I</sup>

I Escuela de Microbiología, Grupo Hematopatología Molecular, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

II Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental – GAIA, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

III Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín. Medellín, Colombia.

---

### RESUMEN

**Fundamento:** la leucemia mieloide crónica es una neoplasia mieloproliferativa crónica que se caracteriza por la presencia del cromosoma filadelfia. Para esta se ha diseñado como tratamiento los inhibidores de tirosin kinasa, que genera en los pacientes una respuesta hematológica, citogenética y molecular. Esta enfermedad se caracteriza por presentar tres fases clínicas que son producto de la acumulación de daños tanto genéticos representados por mutaciones puntuales y alteraciones en el cariotipo; y cambios epigenéticos en genes tales como *ABL-1*, *OSCP1*, *PDLIM4*, *NPM2*, *ER* y *p15*.

**Objetivo:** describir los patrones de metilación de seis genes en pacientes con leucemia mieloide crónica en distintas fases de la enfermedad tratados con algún ITK's o en su defecto con hidroxiurea en dos hospitales de Medellín.

**Métodos:** se realizó un estudio analítico transversal, en el que se recolectaron 34 muestras a conveniencia de pacientes con leucemia mieloide crónica. Para hacer el análisis de estas muestras se usó una PCR específica de metilación. Los datos analizados no se distribuyeron de forma normal, por lo que se realizaron pruebas no paramétricas como U de Man Whitney y test exacto de Fischer, con una significancia de 0,05.

**Resultados:** se encontró diferencias de estadísticas significativas en los datos del hemograma

de ambas fases de la enfermedad, también se encontró una alta frecuencia de genes metilados en fase acelerada. La metilación de *p15*, *ABL-1*, *ER* son independiente de la fase de la enfermedad. En los pacientes tratados con hidroxiaurea se observó una metilación del 100 % para los genes *NPM2*, *OSCP1* y *PDLIM4* este comportamiento no se observó en los individuos tratados con ITK'S, no obstante, para aquellos pacientes que desarrollaron resistencia a los ITK's se observó un porcentaje de metilación mayor en los genes *OSCP1*, *ABL-1* y *PDLIM4*.

**Conclusiones:** la metilación en los genes *PDLIM4* y *OSCP1*, puede asociarse con pronóstico desfavorable, ya que puede estar relacionado con la progresión de fase crónica a acelerada y el desarrollo de resistencia a los ITK's.

**DeCS:** LEUCEMIA MIELÓGENA CRÓNICA BCR-ABL POSITIVA; METILACIÓN; CROMOSOMA FILADELFIA; HIDROXIUREA/uso terapéutico; ESTUDIOS TRANSVERSALES.

---

## ABSTRACT

**Background:** chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative neoplasm characterized by the presence of the Philadelphia chromosome. A specific treatment is designed as tyrosine kinase inhibitors (ITK's), which induces patients to have a hematologic, cytogenetic and molecular response. This disease is characterized by three clinical stages that result from the accumulation of genetic damage, both represented by point mutations and alterations in the karyotype; and epigenetic changes in genes such as *ABL*, *OSCP1*, *PDLIM4*, *Npm2*, *ER* and *p15*.

**Objective:** to describe the schemes of six genes in patients with chronic myeloid leukemia in different stages of the disease and treated with some ITK in two hospitals in Medellín.

**Methods:** a descriptive transversal study was conducted, in which 34 samples were collected at the convenience of patients with chronic myeloid leukemia (CML). To make the analysis of these samples methylation specific PCR was done.

**Results:** statistical differences in blood count data from both stages of the disease were found, a high frequency of methylated genes in accelerated stage was also found. *p15* methylation, *ABL*, *ER* are independent of the stage of the disease. In patients treated with hydroxyurea, methylation of 100 % for *OSCP1* and *PDLIM4* genes was observed and this behavior was not observed in individuals treated with ITK'S. However, in patients who developed resistance a higher percentage of methylation in genes *OSCP1* and *PDLIM4* was observed.

**Conclusions:** methylation in *PDLIM4* and *OSCP1* genes could be associated with poor prognosis possibly being associated with progression of chronic to accelerated stage and the development of resistance to ITK's.

**DeCS:** LEUKEMIA, MYELOGENOUS, CHRONIC, BCR-ABL POSITIVE; METHYLATION; PHILADELPHIA CHROMOSOME; HYDROXYUREA/therapeutic use; CROSS-SECTIONAL STUDIES.

---

## INTRODUCCIÓN

Las leucemias son un tipo de neoplasias que se originan en la médula ósea por alteraciones genéticas en células hematopoyéticas, <sup>1</sup> generan manifestaciones en sangre periférica y se clasifican según el linaje afectado en mieloide o linfocítico, y de acuerdo al tiempo de evolución, en agudas y crónicas. La leucemia mieloide crónica (LMC) hace parte del grupo de las llamadas neoplasias mieloproliferativas crónicas, las cuales se caracterizan por presentar un desorden clonal que conlleva a una proliferación anormal de células maduras como eritrocitos, granulocitos, plaquetas, cuyo desenlace puede ser la evolución a una leucemia aguda. <sup>1</sup>

Las leucemias afectan a individuos en todos los rangos de edad, se estima que para 2016 serán diagnosticadas 60 140 personas que equivalen al 3,4 % de todos los cánceres. <sup>2</sup> De acuerdo a los estimativos de Globocan 2012, <sup>3</sup> la incidencia de leucemias en Colombia es de 2 628 casos por 100 000 habitantes con una mortalidad de 1 876 por 100 000 individuos.

La epidemiología de la LMC indica que en el mundo son afectados de uno a dos individuos por cada 100 000 habitantes. <sup>4</sup> Según cifras del Instituto de Cáncer de Estados Unidos, para el año 2016 serán diagnosticados 8 220 personas y 1 070 morirán por esta causa. <sup>5</sup> El ministerio de salud de Colombia indica que durante los años 2007-2013 se presentaron en promedio 148 muertes por año a causa de la LMC, en Antioquia esta cifra fue de 21 personas, cifra superada por Bogotá que registró 29 casos. <sup>6</sup> Es importante resaltar, que la consulta en Antioquia por este tipo de leucemia pasó de 193 pacientes atendidos en 2009 a 304 en 2014, un incremento del 58 %. <sup>6</sup>

El desarrollo de la LMC se atribuye a la translocación

entre el cromosoma 9 y el 22 o t(9;22)(q34;q11) en la célula pluripotencial, lo que genera la fusión de los genes, *Breakpoint cluster región (BCR)* y *Tyrosine-protein kinase ABL (ABL)* combinación que da lugar a un cromosoma anormal conocido como cromosoma filadelfia, característico en el 95 % de los pacientes con esta enfermedad. <sup>1</sup>

El gen de fusión BCR-ABL1 produce una proteína que tiene actividad kinasa activada con estímulo continuo de vías de señalización que conllevan a la proliferación celular y a la disminución de la muerte celular de las células leucémicas. Todos estos eventos ya mencionados son esenciales y suficientes para que se presente la LMC. <sup>7</sup>

En LMC, la epigenética permite comprender algunos aspectos de la enfermedad como su desarrollo y progresión, es así como algunos investigadores han relacionado la metilación de genes como *ABL*, Receptor de estrógeno (*ER*) y *CDKN2B cyclin dependent kinase inhibitor 2B (p15)*, <sup>8-10</sup> con los procesos mencionados antes y los genes *Organic Solute Carrier Partner 1 (OSCP1)*, *PDZ and LIM domain 4 (PDLIM4)*, y *Nucleophosmin/Nucleoplasmin 2 (NPM2)*, con el pronóstico desfavorable y la resistencia a los medicamentos. Aún no se conoce bien la relación de estos procesos epigenéticos en el progreso de fases en la LMC.

El tratamiento de elección para esta enfermedad son los ITK's cuyo mecanismo de acción es impedir la fosforilación de las proteínas responsables de la patogénesis y por lo tanto son capaces de detener la enfermedad. <sup>11</sup> De estos medicamentos se reconocen varias generaciones, en la primera se encuentra el imatinib cuyo mecanismo de acción es evitar la autofosforilación del BCR-ABL lo que favorece la inhibición de la

proliferación y facilita la activación de la apoptosis.<sup>12</sup> Este medicamento logró que la tasa de evolución de la fase crónica a la blástica disminuyera del 70 al 5 % en la era posimatinib por lo que contribuye a un aumento considerable en la expectativa de vida de los pacientes. Sin embargo, algunas personas no tienen la respuesta terapéutica esperada a este medicamento por lo que pasan a ser tratados con ITK's de segunda generación como dasatinib y el nilotinib, medicamentos superiores al imatinib en términos de remisión.<sup>13</sup> También se han desarrollado otros medicamentos más eficaces que estos últimos, tales como bosutinib y ponatinib.<sup>14</sup>

En Colombia no existen publicaciones sobre la influencia de genes metilados en LMC, por lo que el estudio aporta información sobre el patrón local de metilación para los genes estudiados dado que la expresión de genes y respuesta a los tratamientos pueden variar en dependencia del grupo humano que se estudie.<sup>15</sup>

El propósito del estudio es describir los patrones de metilación de seis genes en pacientes con LMC en distintas fases de la enfermedad tratados con algún ITK's o en su defecto con hidroxiurea en dos hospitales de Medellín. Los resultados del estudio darán lugar a información que direccionará estudios más específicos para entender la respuesta a medicamentos ITK's, así como la progresión de fase en pacientes con LMC y seleccionar los que permitan hacer tamizaje temprano de este evento.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico de corte transversal en pacientes de ambos sexos cuyo diagnóstico clínico y hematológico fuera LMC.<sup>1</sup> Se incluyeron pacientes que recibieron como tratamiento algún inhibidor tirosin kinasa o en su

defecto hidroxiurea y se excluyeron los que presentaron además otro tipo de cáncer. El muestreo se realizó a conveniencia en instalaciones hospitalarias de la ciudad de Medellín, Colombia, de noviembre de 2013 a septiembre 2015. A cada paciente se le extrajeron 4 mL de sangre total por venopunción mediante el sistema vacutainer, en un tubo con EDTA. Luego se realizó la extracción de ADN a partir de sangre total con EDTA se utilizó el estuche comercial *GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification* Mini kit de *Thermo Scientific®*, este procedimiento se realizó con todas las instrucciones del fabricante. Después de ser extraído, el ADN se cuantificó por espectrofotometría en un *Nanodrop* (Thermo®) y fue almacenado a 20°C hasta su posterior uso.

El ADN extraído se modificó con bisulfito de sodio, se utilizó el kit *Epimark Biolab New England®* según las instrucciones del fabricante.

Las MS-PCR se realizaron a partir del ADN convertido con bisulfito. Se usaron cuatro *primers* para cada gen, un par permitió reconocer las regiones metiladas del promotor y el otro par las regiones no metiladas, se amplificó por PCR en un termociclador Bio-Rad T100®. Para aumentar la sensibilidad de detección, los amplicones obtenidos se reamplificaron,<sup>16</sup> a partir de 1µL del producto de la primera reacción como ADN molde. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2 %, coloreado con bromuro de etidio y se visualizó fotodocumentador de geles UVP®. La especificidad de la PCR se determinó con el Kit de controles ADN metilado, no metilado y no convertido, de la marca QIAGEN®, se usó además para el control de la reacción, una mezcla de cebadores, Taq polimerasa y agua ultra pura. El volumen de reacción consistió en 1µL de ADN convertido

*primers* a una concentración final de 0,4 $\mu$ M y 12,5 $\mu$ L de *HotStart Master Mix Taq* polimerasa HS (BIOLINE®), para un volumen final 25 $\mu$ L completado por agua ultra *Milli-Q*. Como control de la calidad del ADN extraído amplificó el gen de expresión constitutiva *polA*.

Se describen las secuencias de los *primers*, el tamaño esperado del producto amplificado, la ubicación del gen y condiciones de la PCR de acuerdo a lo reportado con algunas modificaciones según las condiciones del laboratorio donde se desarrolló el trabajo (tabla 1).

Los datos de los participantes fueron colectados en una base de datos y el análisis estadístico se ejecutó con el programa SPSS versión 21.0. Las variables cualitativas como sexo, tipo de terapia, resistencia al medicamento, fases de la enfermedad, citogenética y metilación de los genes se describieron como frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas analizadas como la edad, tiempo de evolución de la enfermedad y las variables hematológicas no tuvieron distribución normal por lo que se reportaron como la Mediana con Rango Intercuartiles (RIC).

Las comparaciones de las variables continuas como recuento de leucocitos, de plaquetas y concentración de hemoglobina respecto a la fase crónica y acelerada, se hicieron con la prueba

U de Mann-Whitney. Los análisis bivariados entre variables cualitativas dicotómicas como tipo de medicamento y resistencia respecto al estado de metilación de los genes se hicieron con la prueba exacta de Fisher. Para todos los análisis se tomó un nivel de significación estadística de  $p < 0,05$ .

Los protocolos de investigación se aprobaron por el comité de bioética de la Sede de Investigaciones Universitarias (SIU) de la Universidad de Antioquia, acta 13-35-531 y fue avalado por los hospitales donde se realizó el estudio. Los pacientes participantes en este estudio lo hicieron en forma voluntaria y como constancia firmaron un consentimiento informado (se garantizó la privacidad de la identidad y para proteger la confidencialidad de sus datos, se reemplazó por un código el nombre de cada uno).

Se recolectaron los datos generales de los pacientes en un formulario, además se completó esta información con datos de la historia clínica como valores del último hemograma realizado, máximo dos días antes de la toma de la muestra, tiempo de evolución, clasificación según la fase de la enfermedad, recuentos celulares, medicamentos, resistencia y exámenes adicionales como porcentaje de BCR-ABL y cariotipo. Los datos recolectados se consignaron en una base de datos el programa Excel Microsoft®.

**Tabla 1** Secuencia de *primer*'s metilados y no metilados de los genes usados en este estudio

| Gen              | Ubicación cromosómica del gen | Secuencia de los <i>primers</i>                             | Temperaturas de alineamiento | Tamaño del amplificado | Referencia |
|------------------|-------------------------------|---|------------------------------|------------------------|------------|
| <i>OSCP1 FM</i>  | 1p34.3                        | 5' GGGGTTAGGTAGTTAGTGG 3'                                   | 46.9°C                       | 130pb                  | (15)       |
| <i>OSCP1RM</i>   |                               | 5' GGGACACCGCTGATCGTTTA 3'                                  |                              |                        |            |
| <i>OSCP1FU</i>   |                               | 5' GAGTTGGATTGGTGAAGAGTT 3'                                 |                              |                        |            |
| <i>OSCP1RU</i>   |                               | 5' CCAAACCCCTTCTAATT 3'                                     |                              |                        |            |
| <i>P15 FM</i>    | 9p21                          | 5'TTAGGAAGGAGAGAGTGCCTC 3'                                  | 50.0 °C                      | 132pb                  | (18)       |
| <i>P15 RM</i>    |                               | 5'TACCCTTATTCTCCTCGCG3'                                     |                              |                        |            |
| <i>P15 FU</i>    |                               | 5' TTAGGAGGAGAGAGTGTGT3'                                    | 47.0°C                       |                        |            |
| <i>P15 RU</i>    |                               | 5'TACCCTTATTCTCCTCAC3'                                      |                              |                        |            |
| * <i>ABL FM</i>  | 9q34.1                        | 5'CGCGTTTCGGTTAGGCGGAGACGCGG<br>TCGC 3'                     | 59.2°C                       | 238pb                  | (19)       |
| * <i>ABL FU</i>  |                               | 5'TGTGTTTTGGTTAGGTGGAGATGTGGT<br>TGT 3'                     | 58.0°C                       |                        |            |
| * <i>ALB-1 R</i> |                               | 5' AAACAACCCCTTCTAAATTTACAA 3'                              |                              |                        |            |
| <i>ER FM</i>     | 6q25.1                        | 5'GATACGGTTTCTATTTGTTGCG 3'                                 | 50.0°C                       | 123pb                  | (20)       |
| <i>ER RM</i>     |                               | 5'ACAAACAATTCAAAAATCCAAC 3'                                 |                              |                        |            |
| <i>ER FU</i>     |                               | 5'GGATATGTTTGTATTTGTTTGT 3'                                 | 53.8°C                       | 121pb                  |            |
| <i>ER RU</i>     |                               | 5'ACAAACAATTCAAAAATCCAAC 3'                                 |                              |                        |            |
| <i>NPM2 FM</i>   | 8p21.3                        | 5'AGGAGGAAAGAATGGGAGAAGGG 3'                                | 60.0° C                      | 208pb                  | (15)       |
| <i>NPM2 RM</i>   |                               | 5'CCCCCACACAACCTTACTAT 3'                                   |                              |                        |            |
| <i>NPM2 FU</i>   |                               | 5'GGGACACCGCTGATCGTTTACCCCA<br>CAACCTTACTAT3'               | 52.0°C                       |                        |            |
| <i>NPM2 RU</i>   |                               | 5'AGGTTTTTTAGTTAGGTTTGGATACT<br>3'                          |                              |                        |            |
| <i>PDLIM4 FM</i> | 5q31.1                        | 5' TTTGTGAGTTTGGATTGGT 3'                                   | 53.0°C                       | 270pb                  | (15)       |
| <i>PDLIM4 RM</i> |                               | 5' CCCCATAAACCTCCAT 3'                                      |                              |                        |            |
| <i>PDLIM4 FU</i> |                               | 5' TTTGTGAGTTTGGATTGGT 3'                                   |                              |                        |            |
| <i>PDLIM4 RU</i> |                               | 5' GGGACACCGCTGATCGTTTA 3'                                  |                              |                        |            |
| <i>PoIA</i>      | Xp22.1                        | F 5' CTGGGGAAAACGATCCAACC 3'<br>R 5' CTGAAAGCCAATCAGCGGC 3' | 57.0°C                       | 359pb                  | (21)       |

FU: forward no metilado, FM forward Metilado, RU reverse no metilado RM reverse metilado, M: Metilado U: No metilado

## RESULTADOS

### Asociación de variables hematológicas con las fases de la enfermedad.

Se ingresaron 25 pacientes en fase crónica y nueve en acelerada. En el análisis comparativo de las fases de la enfermedad y los valores del hemograma, se encontró diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de blástos ( $p=0,002$ ), basófilos ( $p=0,013$ ) y recuentos de leucocitos ( $p=0,048$ ) estos fueron más altos en fase acelerada mientras que la concentración de hemoglobina fue significativamente menor ( $p=0,018$ ).

En este estudio se encontró que, de los 34 pacientes, 10 fueron tratados con imatinib (40 %), nueve (36 %) con dasatinib y seis (24 %) con nilotinib. A los demás pacientes se les administró hidroxiurea, 6 (66 %) de ellos de re-

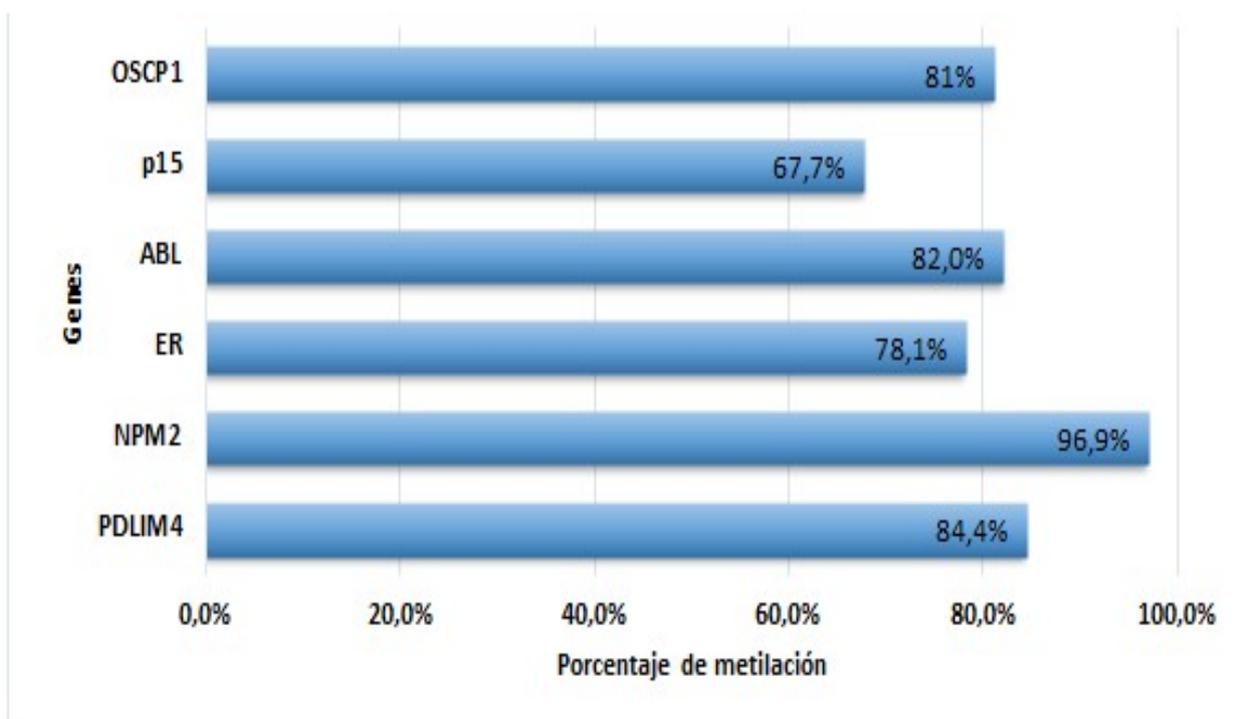
ciente diagnóstico y los otros tres (33 %) con resistencia a los ITK's.

### Descripción del patrón de metilación de los genes de interés en la población de estudio

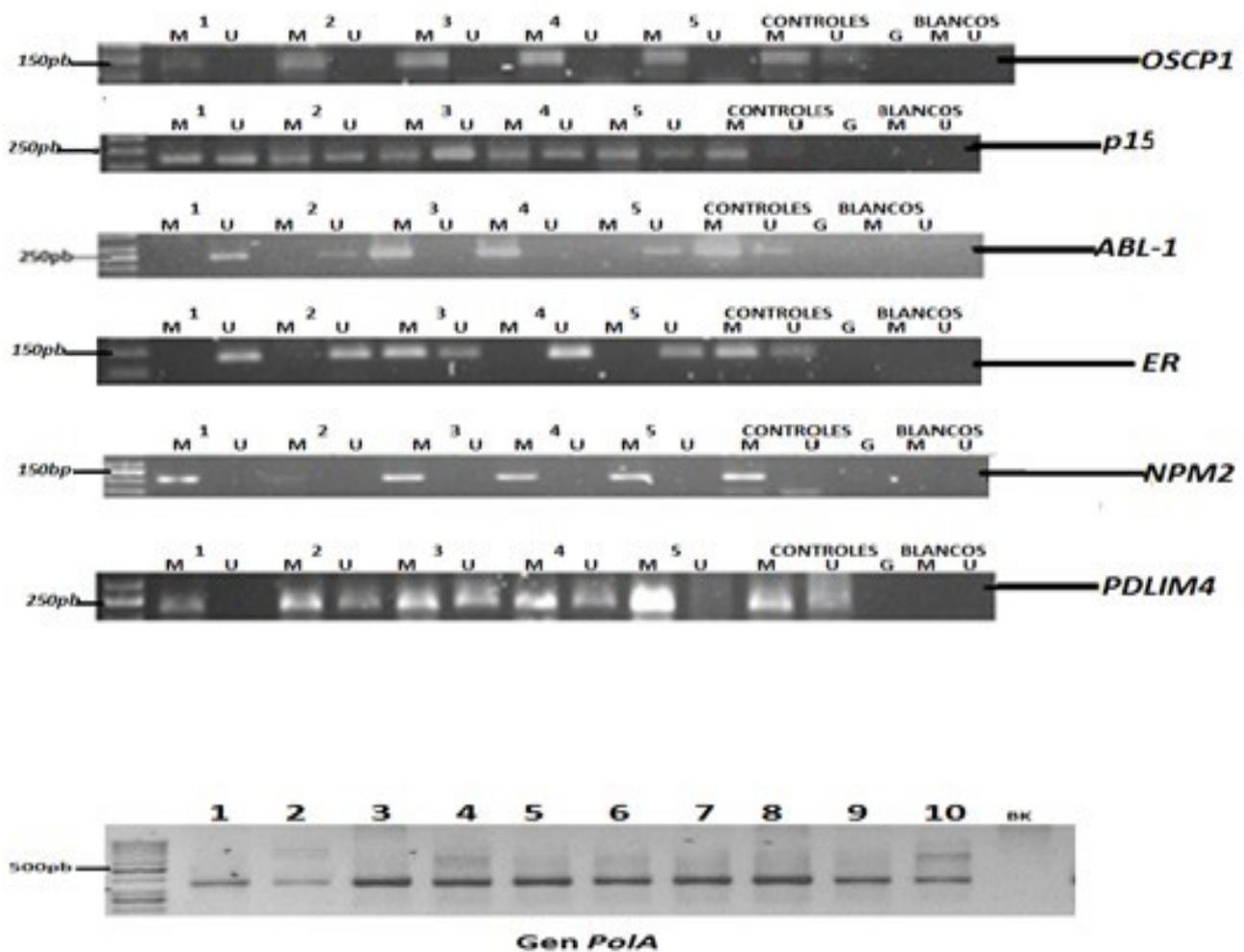
Se evaluó la metilación de los genes *ABL*, *PDLIM4*, *OSCP1*, *NPM2*, *p15* y *ER* en todos los pacientes con leucemia mieloide crónica ingresados al estudio y en cuatro individuos sanos. La frecuencia de metilación de los genes en los pacientes fue:  $NPM2 > PDLIM4 > ABL > OSCP1 > ER > p15$  (figura 1 y figura 2).

### Según las fases de la enfermedad

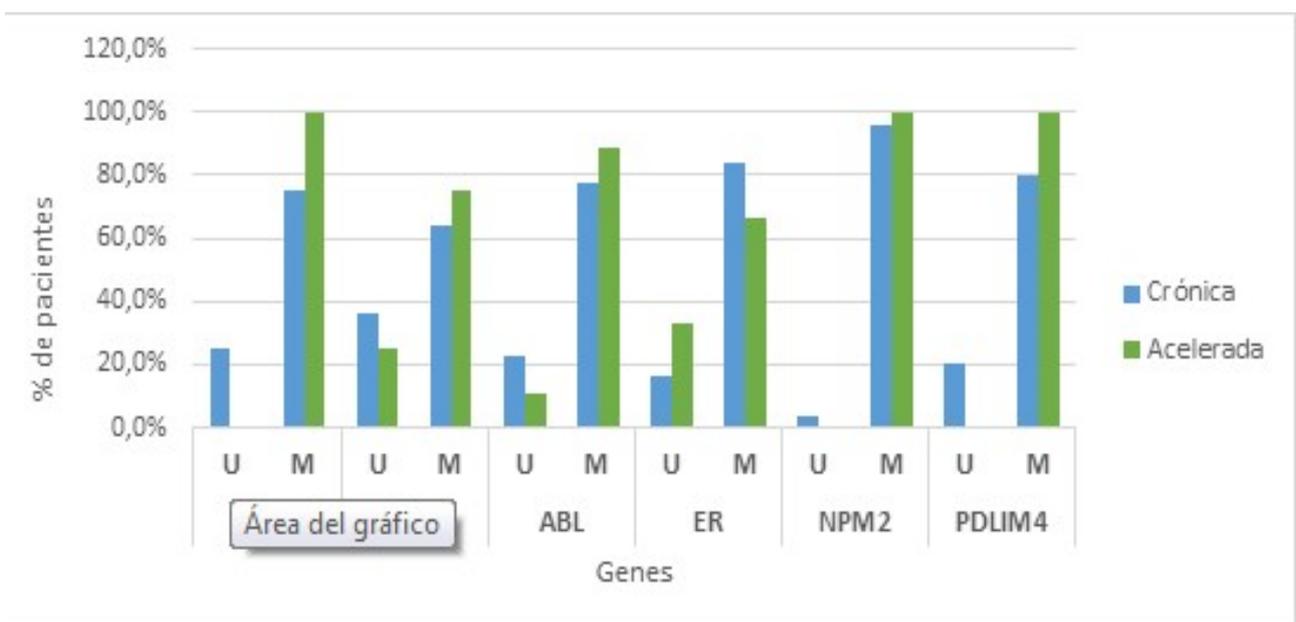
Se observó que los pacientes en fase crónica ( $n=25$ ) presentaron menor frecuencia de metilación respecto a la fase acelerada ( $n=9$ ), en esta fase se observó que todos los pacientes presentaron metilación en los genes *OSCP1*, *NPM2* y *PDLIM4* (figura 3).



**Figura 1.** Porcentaje de pacientes que presenta metilación en cada uno de los genes evaluados. En la figura se muestra los genes estudiados en el eje y, el porcentaje de metilación en una escala de 10 % en el eje x



**Figura 2.** Electroforesis representativas de los amplificadores de los genes en los pacientes y en los controles comerciales obtenidos por MS-PCR amplificadores de los pacientes



**Figura 3.** Frecuencia de pacientes con genes metilados con relación a la fase de la LMC

### Metilación según el tratamiento prescrito

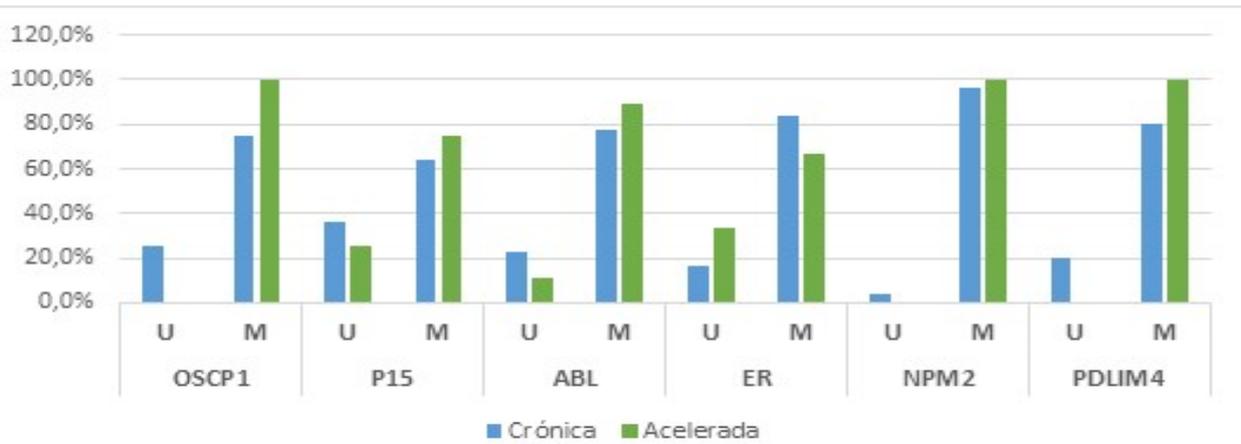
Entre los pacientes ingresados al estudio se encontró que seis eran de reciente diagnóstico y eran tratados con hidroxíurea (HU) estos se encontraron metilados en el 100 % de los pacientes (figura 4).

Mientras que 28 pacientes fueron prescritos con algún ITK's, en estos se encontró una frecuencia de metilación del 100 % en fase acelerada en los genes *OSCP1* y *PDLIM4*, para la fase crónica la frecuencia de metilación fue heterogénea para todos los genes (figura 5).

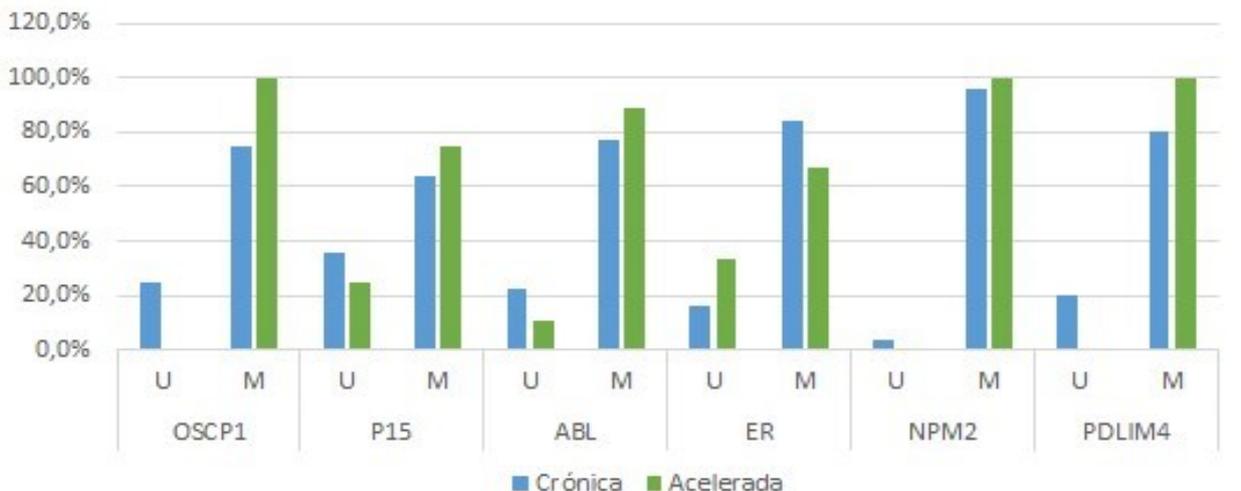
Metilación respecto a la resistencia a los ITK's  
Se encontró que ocho no desarrollaron resisten-

cia a ninguno de los medicamentos y 16 experimentaron resistencia al tratamiento de elección y requirieron cambio del mismo.

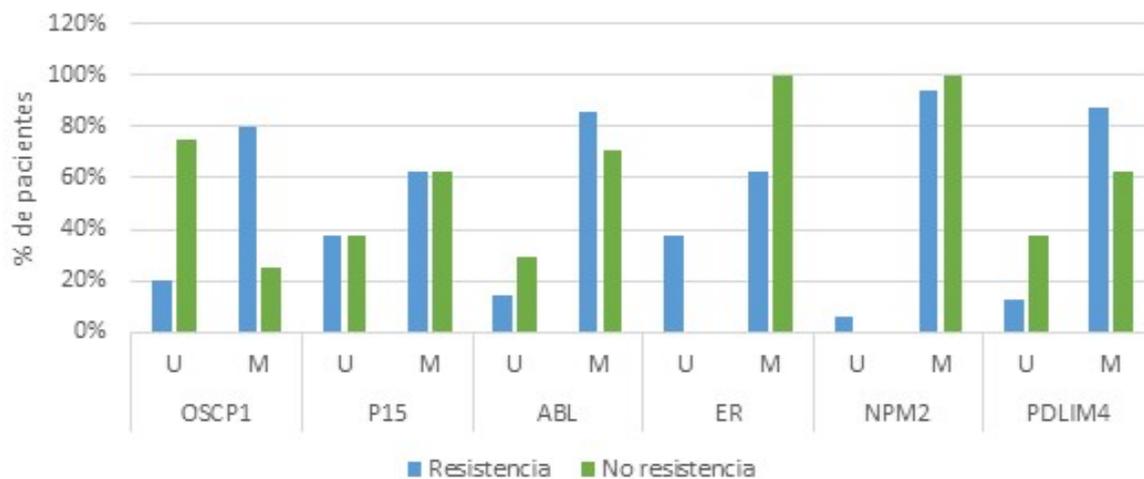
Para efectos del análisis se integraron todos los pacientes que habían presentado resistencia en un solo grupo llamado: resistencia a los ITK's, y se comparó con los que no habían presentado resistencia; en los primeros se observó una mayor frecuencia de metilación en los genes *OSCP1*, *ABL* y *PDLIM4*. De igual manera se destaca que los que no han desarrollado resistencia tienen una mayor frecuencia de metilación para gen *ER* (figura 6).



**Figura 4 .** Metilación respecto al tratamiento con Hidroxíurea y la fase de la enfermedad



**Figura 5.** Metilación respecto al tratamiento con ITK's



**Figura 6.** Metilación según la resistencia a los ITK's

## DISCUSIÓN

La leucemia mieloide crónica es una de las enfermedades más estudiadas del último siglo, ya que a partir de ella se empezó a entender el factor genético en las neoplasias, además fue la primera a la cual se le diseñó una terapia molecular efectiva.<sup>12</sup>

Según las cifras del instituto nacional de cáncer de Estados Unidos, la mayoría de las personas con esta enfermedad son diagnosticadas después de la quinta década de la vida,<sup>2</sup> además este diagnóstico ocurre por lo general en fase crónica.<sup>4</sup> En el estudio se encontró alta frecuencia de casos en personas menores de 50 años y en los recién diagnosticados se halló una mayor proporción de personas en fase acelerada que en crónica, fenómeno que es explicado por las falencias del sistema de salud lo cual ocasiona que los pacientes tengan un diagnóstico tardío, este aspecto también alienta la aversión que tienen los individuos a consultar a los servicios de salud, con el agravante que esta enfermedad tiene un inicio indolente y que pocos manifiestan síntomas en la fase crónica.

En los resultados, de manera inicial se observó que la mayoría de los valores del hemograma

no tienen valores altos como se esperaría, en especial en los valores relativos de blástos o células inmaduras y basófilos. Sin embargo, al hacer una comparación entre los pacientes en ambas fases, se encontró diferencias estadísticas significativas.

Los anteriores resultados son producto del efecto que tienen los ITK's sobre la respuesta hematológica en los pacientes con LMC la cual debe ser alcanzada en los primeros meses de diagnóstico y la reversión de esta constituye progresión de fase al igual que alteraciones clonales en el cariotipo o aumento del porcentaje de *BCR-ABL*.<sup>17</sup>

Además de los parámetros del hemograma mencionados con anterioridad se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de hemoglobina en las dos fases la enfermedad de los pacientes incluidos en este estudio, aunque esto no lo describe la OMS como un signo importante de progresión, otros autores han relacionado la disminución de la hemoglobina por debajo de 10 g/dl con un aumento del riesgo de evolución de cinco veces en pacientes tratados con hidroxiurea y de tres veces si el tratamiento

es con Imatinib.<sup>18</sup>

Se encontró que la mayoría de los pacientes tienen los genes metilados. La alta proporción de genes metilados ha sido reportado en otros estudios; para el caso de *ABL* 86 % y *NMP2* 74 % donde son similares a lo encontrado en el estudio; para los demás genes analizados se ha reportado un porcentaje menor de metilación, en el caso de *OSCP1* 30 %, para *PDLIM4* 21 %; y para *p15* fue de 11 %, <sup>19</sup> este mismo porcentaje también fue publicado por Bodoor K, et al, <sup>20</sup> en el 2014.

El alto porcentaje de genes metilados encontrado en el estudio, y por ende, las pocas asociaciones que se derivan del mismo; se atribuyen a varios aspectos entre ellos los metodológicos; en primer lugar la mayoría de los pacientes presentaron un fenotipo bialélico (metilado y no metilado), los cuales se consideraron como metilados, seguido que algunos grupos de comparación fueron muy pequeños, por lo que la potencia estadística es poca y se puede incurrir en error estadístico tipo beta o tipo II donde se acepta la hipótesis nula en contra de la alternativa, esto causado entre otras variables por el tamaño de la población estudiada.<sup>21</sup>

También se observan algunas posibles asociaciones o tendencias que son importantes de analizar; entre ellas se destaca que los pacientes tratados con hidroxiurea presentaron 100 % de metilación para los genes *OSCP1*, *ER* y *PDLIM4* este comportamiento no se observó en el grupo tratado con ITK's, en este orden de ideas es de suponer que la terapia diana puede modular de forma positiva a los mecanismos fisiológicos de la metilación. Resultados similares se han observado en otro tipo de neoplasias mieloides donde el porcentaje metilación disminuye con el tratamiento de elección.<sup>22</sup>

Lo que no ocurre con la terapéutica tipo hidroxiurea, en este caso el porcentaje mayor de metilación puede explicarse por la persistencia de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por el mismo BCR-ABL, debido a que los ROS pueden afectar los procesos de metilación.<sup>23</sup>

De igual manera se observó que la frecuencia de los genes *OSCP1* y *PDLIM4* metilados es mayor en los pacientes que han desarrollado resistencia en algún momento de la historia de la enfermedad, lo anterior ya había sido reportado por Jelinek J, et al, <sup>19</sup> en dicha investigación se asocia la metilación de *PDLIM4* a mal pronóstico de manera especial en los resistentes al tratamiento, pese a no encontrarse relacionado con el avance de fase, como ocurrió en el presente estudio. Por lo tanto, la metilación de este gen debe estudiarse más para probar la asociación con la progresión de fase y la resistencia.

El gen *OSCP1* también fue reportado por Jelinek J, et al, <sup>19</sup> en ese trabajo se encontró diferencias en el porcentaje de metilación en los pacientes en las diferentes fases de la enfermedad con una  $p=0,001$ , sin embargo en el presente estudio no se encontró esta relación. Al igual que *PDLIM4* la metilación de este gen se ha vinculado con los pacientes resistentes, puesto que la metilación de ambos genes afecta la supervivencia de estos pacientes. Aunque por variables metodológicas y de tipo técnico no es posible la comparación de los resultados de ambos estudios, los datos apuntan que estos dos genes son importantes para la predicción de resistencia a los ITK's.

Con respecto a la metilación de *p15* se encontró en una revisión sistemática realizada por Jiang D, et al, <sup>24</sup> que la metilación de *p15* contribuye a la malignidad mieloide, aun cuando la

inhibición de la expresión de *p15* se asocia con el incremento del riesgo de evolución de la enfermedad con una  $p=0,001$ .<sup>19</sup> Lo que no fue confirmado en el estudio, ya que no se encontró relación entre la metilación de este gen y la progresión de fase.

En la investigación algunos pacientes fueron tratados con más de un ITK's esto obedece al desarrollo de resistencia la cual se caracteriza por la aparición de mutaciones puntuales en el dominio quinasa o en el p loop la proteína de fusión BCR-ABL, en otro estudio realizado por Berrio D, et al,<sup>25</sup> se buscó entre los participantes la mutación T315I que causa resistencia a todos los ITK's disponibles en Colombia, donde se encontró que ninguno de los participantes presentó la mutación (dato no mostrado).<sup>25</sup> Otros mecanismos que pueden explicar el desarrollo de resistencia son las alteraciones epigenéticas;<sup>26</sup> en el estudio se logró apreciar un porcentaje de metilación mayor en los pacientes resistentes en los genes *OSCP1* y *PDLIM4*.<sup>19</sup>

En relación con la terapia otros investigadores han encontrado que la metilación es independiente de los ITK's, tal es el caso del factor de transcripción hematopoyético PU.1.<sup>27</sup> La hipermetilación del genoma puede estar facilitada por el tratamiento de elección, lo que causa metilación de genes implicados en la resistencia que es revertida por el uso de agentes hipometilantes.<sup>28</sup> En este orden de ideas es necesario realizar un estudio longitudinal que permita un seguimiento a los pacientes y analizar el perfil de metilación en diferentes etapas de la enfermedad, así mismo es importante determinar si la metilación puede considerarse un factor precedente a la evolución de fase, es decir; si aparece antes de que el paciente presente el deterioro clínico y la alteración en los diferentes pa-

rámetros de laboratorio. Lo anterior le permitiría al médico tratante tomar conductas clínicas y terapéuticas más inmediatas que eviten la selección clonal y la evolución de fase.

## CONCLUSIONES

Los resultados del estudio permiten proponer la metilación en dos de los seis genes candidatos (*OSCP1* y *PDLIM4*) como marcadores de pronóstico desfavorable, es posible que la metilación en la región promotora de dichos genes con su posterior silenciamiento favorezca la progresión de fase crónica a fase acelerada así como el desarrollo de resistencia a los ITK's, no obstante es necesario realizar este estudio con metodologías más sensibles y reproducibles como los microarreglos y el pirosecuenciamiento específico de metilación que además nos permitan cuantificar los niveles de metilación y comparar su comportamiento a lo largo de la enfermedad y con los diferentes tipos de respuesta hematológica, citogenética y molecular.

La metilación del gen *ER* puede estar relacionado con el efecto del Imatinib<sup>28</sup> o asociarse con el riesgo de presentar progresión de fase debido a la resistencia al ITK recibido, ambas hipótesis se apoyan de la bibliografía revisada y de los hallazgos de este estudio, dado que los pacientes que solo reciben como tratamiento imatinib presentan una alta frecuencia de genes metilados.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por el comité para el desarrollo de la investigación (CODI) de universidad de Antioquia, Medellín Colombia. A través de la convocatoria programática de las ciencias de la salud del año 2013.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JW\_Vardiman JV, Baccharani J MM. Thiele. Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001. p. 291-302.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, et al, editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013 [Internet]. Bethesda: National Cancer Institute; 2016 Apr [cited 2016 May 12]. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/).
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality. GLOBOCAN [Internet]. 2012 [cited 2016 May 12];1(1):[about 8 p.]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/old/summary\\_table\\_sitehtml.asp?selection=12280&title=Leukaemia&sex=0&type=0&window=1&america=2&sort=3&submit=%C2%A0Execute](http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_sitehtml.asp?selection=12280&title=Leukaemia&sex=0&type=0&window=1&america=2&sort=3&submit=%C2%A0Execute) accessed on 23/05/2016.
4. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol.* 2015;94(S2):241-7.
5. National cancer Institute. Chronic Myeloid Leukemia - SEER Stat Fact Sheets [Internet]. SEER Stat Fact Sheets: chronic Myeloid Leukemia (CML); 2016 [citado 2016 May 17]. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyle.html>
6. Direccion de medicamentos y tecnologias en salud. Actuación administrativa de la declaratoria de razones de interes público. Medellin: Universidad de Antioquia; 2016.
7. Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):930-7.
8. Huu NT, Yoshida H, Yamaguchi M. Overexpression of tumor suppressor protein OSCP1/NOR1 induces ER stress and apoptosis during development of *Drosophila melanogaster*. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2015 Jan [2016 citado Feb 29];5(5):[about 11 p.]. Available from: <http://pmc/articles/PMC4497438/?report=abstract>
9. Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S, Fibach E, Polliack A, Rachmilewitz E, et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1999 Oct 1;94(7):2452-60.
10. Issa J-PJ, Zehnbauser BA, Civin CI, Collector MI, Sharkis SJ, Davidson NE, et al. The Estrogen Receptor CpG Island Is Methylated in Most Hematopoietic Neoplasms. *Cancer Res.* 1996 Mar 1;56(5):973-7.
11. Hantschel O, Grebien F, Superti-Furga G. The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res.* 2012;72(19):4890-5.
12. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res.* 2013 Jan;3(3):191-200.
13. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 May [citado 2013 Nov 13];7(5):[about 12 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457302>
14. Kimura S. [State-of-the-art management of CML in 2015 and future prospects]. *Rinsho Ketsueki* [Internet]. 2015 Oct [citado 2016 Nov 19];56(10):[about 9 p.].

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458439>

15. Chen S, Sutiman N. Pharmacogenetics of drug transporters in modulating disposition and treatment outcomes in chronic myeloid leukemia & gastrointestinal stromal tumor patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17(17):1941-55.
16. Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W, et al. Analysis of DNA Methylation of Multiple Genes in Microdissected Cells From Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(5):477-89.
17. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol [Internet]*. abril de 2015 [citado 2016 Apr 1];94 Suppl 2:[about 7 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814080>
18. Furtado VF, Santos GR, de Carvalho DS, Staziaki PV, Pasquini R, Funke VAM. Accelerated phase chronic myeloid leukemia: evaluation of clinical criteria as predictors of survival, major cytogenetic response and progression to blast phase. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015 Ene;37(5):341-7.
19. Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MRH, 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(7):e22110.
20. Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, et al. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pa-*

*cific J Cancer Prev*. 2014;15(1):75-84.

21. Gómez Gómez M, Danglot Banck C, Vega Franco L. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas. *Rev Mex Pediatría*. 2003;70(2):91-9.
22. Preisler HD, Li B, Chen H, Fisher L, Nayini J, Raza A, et al. P15 INK4B gene methylation and expression in normal , myelodysplastic , and acute myelogenous leukemia cells and in the marrow cells of cured lymphoma patients. 2001;1589-95.
23. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):3927-37.
24. Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, Li Y, et al. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Jan;9(5):e96822.
25. Berrio Carvajal D, Acevedo Toro PA. Frecuencia de la mutación T315I y su relación con la resistencia a inhibidores tirosina kinasa en pacientes con leucemia mieloide crónica, en Medellín. 2015. Medellín: Universidad de Antioquia; 2016.
26. Elias MH, Baba AA, Husin A, Sulong S, Hassan R, Sim GA, et al. HOXA4 gene promoter hypermethylation as an epigenetic mechanism mediating resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Res Int*. 2013 Jan;2013:129715.
27. Yang H, Liang H, Yan J, Tao R, Hao S, Ma L. Down-regulation of hematopoiesis master regulator PU.1 via aberrant methylation in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol [Internet]*. 2012 Jul [citado 2013 Oct 25];96(1):[about 9 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674382>

28. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K, Yokoyama A causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins. Blood Cancer J. 2011 Dec;1(12):e48.

Recibido: 1 de enero de 2017

Aprobado: 21 de febrero de 2017

Paola Andrea Acevedo Toro. Microbióloga y Bioanalista. MSc en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente Escuela de Microbiología. Grupo de investigación Hematopatología Molecular. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.  
Email: [paola.acevedo@udea.edu.co](mailto:paola.acevedo@udea.edu.co)