



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA METILACIÓN DE LOS
MICRORNAs EN LA PATOGÉNESIS Y
PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA AGUDA
LINFOBLÁSTICA**

Doctorando:

Víctor Arqueros Martínez

Córdoba, 2010

TITULO: *Papel de la metilación de los microRNAs en la patogénesis en la patogénesis y pronóstico de la leucemia aguda linfoblástica*

AUTOR: *Victor Arqueros Martínez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-3003-6



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

PAPEL DE LA METILACIÓN DE LOS MICRORNAs EN LA PATOGÉNESIS Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

Memoria presentada por D. Víctor Arqueros Martínez, Licenciado en Medicina y Cirugía, en cumplimiento de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Córdoba.

Tesis realizada bajo la dirección de los doctores

Prof. D. Antonio Torres Gómez y D. José Román Gómez

SERVICIO DE HEMATOLOGÍA

HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA. CÓRDOBA.

ANTONIO TORRES GÓMEZ, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Córdoba,

JOSÉ ROMÁN GÓMEZ, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Córdoba,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: "PAPEL DE LA METILACIÓN DE LOS MICRORNAs EN LA PATOGÉNESIS Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA" ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Víctor Arqueros Martínez**, Licenciado en Medicina y Cirugía, y reúne, a nuestro juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor, aportando el siguiente informe razonado:

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

La disminución de la expresión de miRNAs en diversos tipos de neoplasias sugiere que muchos de ellos pueden funcionar como potenciales genes supresores de tumores en las mismas. Una posible explicación de esta alteración en la expresión es la existencia de un fallo en la regulación post-transcripcional de estos miRNAs en las células tumorales. Sin embargo, otros mecanismos adicionales pueden estar implicados. Puesto que el silencio transcripcional de numerosos genes supresores de tumores es dependiente de la metilación de su promotor, cabe pensar que dicho mecanismo epigenético también puede estar implicado en la regulación de los miRNAs en las neoplasias humanas.

Nuestro grupo ha desarrollado a lo largo de los últimos años proyectos de investigación relacionados con el papel que la regulación epigenética juega en el desarrollo y el pronóstico de la LAL. Así en diversas publicaciones hemos podido demostrar el papel que la hipermetilación de genes involucrados en distintas rutas de trasducción de señales juega en la patogénesis y pronóstico de la LAL (Blood. 2007,109:3462-3469; Clin Cancer Res. 2006,12:4845-4850; Blood. 2004,104:2492-2498; Oncogene. 2006,25:1862-1870; Int J Cancer. 2006;118:1945-1953; J Clin Oncol. 2005,23:7043-7049). Sin embargo, no existen estudios sobre el papel de los miRNAs y su posible regulación epigenética en la LAL.

La expresión de miRNAs supone un nuevo mecanismo de control epigenético lo que junto con la experiencia y los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo justifica el interés por estudiar qué papel pueden jugar los miRNAs en la LAL.

Para ello, el doctorando ha realizado un análisis secuencial de ChIP-on-chip, metilación y expresión de microRNAs, detectando que trece de ellos estaban silenciados por metilación del promotor y una estructura cromatínica cerrada en líneas celulares de LAL. Dicho control epigenético también ocurre in vivo, y el perfil de metilación se asoció con la supervivencia de los pacientes. Los resultados obtenidos por el doctorando, demuestran claramente que los microRNAs están regulados epigenéticamente en la LAL y que dicho patrón de regulación constituye un factor pronóstico independiente en estos pacientes.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS:

1.- San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, Gárate L, Fresquet V, Cervantes F, Martínez-Climent JA, Heiniger A, Torres A, Prósper F, Román-Gómez J. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia. Eur J Cancer. 2009 Jul;45(10):1877-89. Epub 2009 May 4. PubMedPMID:19403302.

2.- Román-Gómez J, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Arqueros V, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, Martín-Subero I, Gárate L, Cordeu L, San José-Eneriz E, Martín V, Castillejo JA, Bandrés E, Calasanz MJ, Siebert R, Heiniger A, Torres A, Prosper F. Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2009 Mar 10;27(8):1316-22. Epub 2009 Jan 21. PubMed PMID: 19164206.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, ____ de _____ de _____

Firma del/de los director/es

Fdo.: _____ Fdo.: _____

“No hay cuestiones agotadas, sino hombres agotados de las cuestiones”

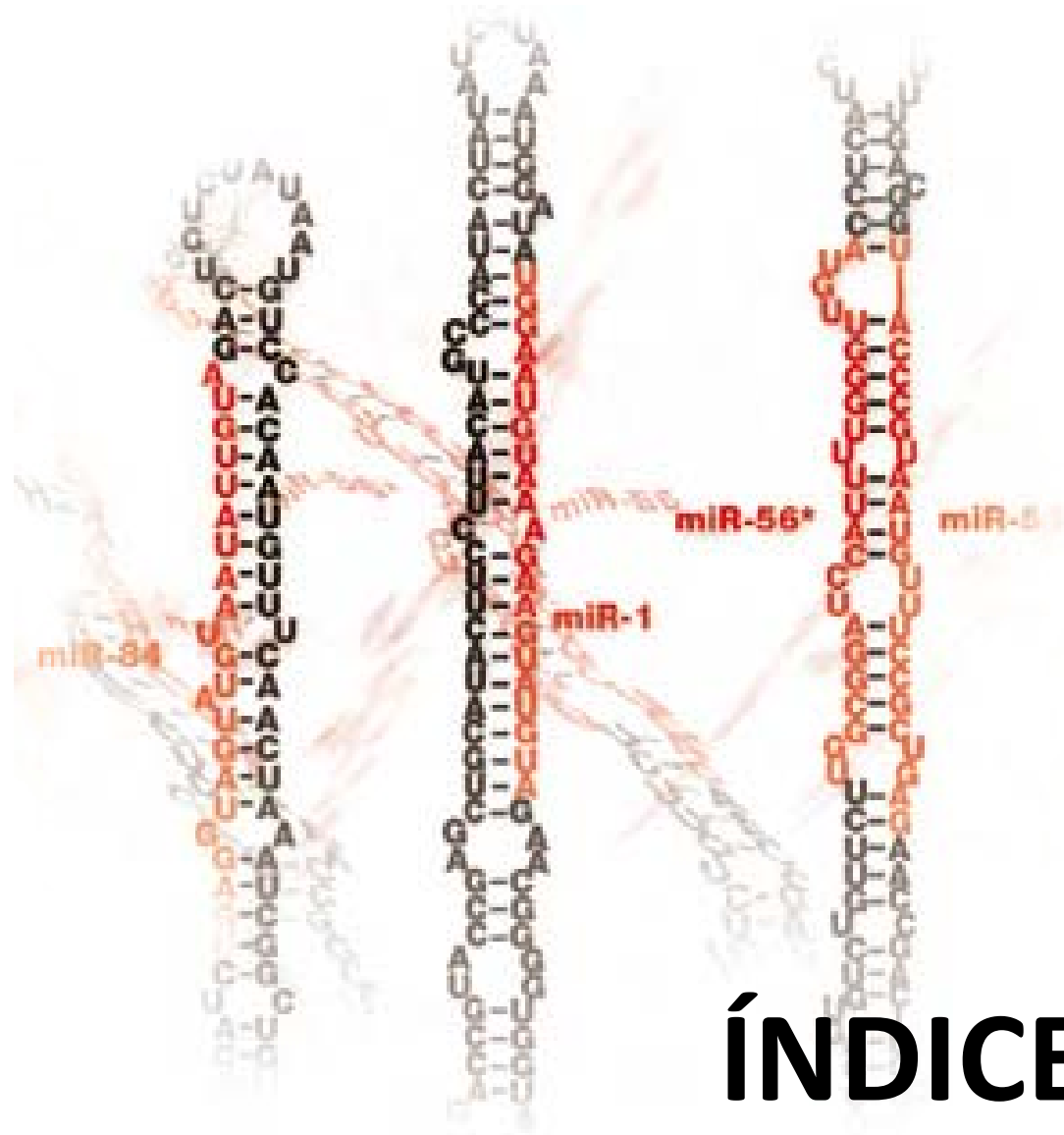
(Santiago Ramón y Cajal)

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

(Isaac Newton)

A mis padres.

A Sole.



ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Leucemia linfoblástica aguda y metilación del ADN.....	3
1.1.1.- Metilación del ADN y silencio transcripcional.....	3
1.1.2.- Metilación del ADN en la oncogénesis.....	9
1.1.3.- Hipermetilación de las islas CpG en la LLA.....	11
1.1.4.- Papel de la hipermetilación del ADN en la patogénesis y pronóstico de la LLA.....	13
1.1.5.- Hipometilación del ADN en la LLA.....	17
1.1.6.- Perspectivas terapéuticas.....	18
1.2.- Expresión y función de microARNs en el cáncer.....	20
1.2.1.- La nueva era del cáncer: la “miR-evolución”	20
1.2.2.- Biogénesis de los miARNs.....	22
1.2.3.- Perfil de expresión en pacientes oncológicos.....	23
1.2.3.1.- Estudios de expresión en tumores sólidos.....	24
1.2.3.2.- Estudios de expresión en hemopatías.....	25
1.2.4.- Los miRs como oncogenes y supresores tumorales....	26
1.3.- La hipermetilación de las islas CpG de los microARNs supresores tumorales en el cáncer.....	30
1.3.1.- El trastorno epigenético de los microARNs en el cáncer.....	30

2.- HIPÓTESIS.....	37
3.- OBJETIVOS.....	43
4.- PACIENTES Y MÉTODOS.....	47
4.1.- Líneas celulares y pacientes.....	49
4.2.- Inmunoprecipitación de cromatina e inmuno-precipitación-on-chip de cromatina.....	50
4.3.- Chip de gen simple usando PCR cuantitativa en tiempo real...52	
4.4.- PCR específica de metilación (MSP) para miARNs.....	54
4.5.- PCR semicuantitativa en tiempo real específica de metilación de hsa-miR-124a2.....	55
4.6.- Análisis cuantitativo de expresión para miARNs.....	57
4.7.- Tratamiento con el agente desmetilante 5-aza-2-deoxicitidina.....	58
4.8.- Dianas previstas y confirmadas para cada miARN.....	59
4.9.- Análisis estadístico.....	59
5.- RESULTADOS.....	61
5.1.- Los genes miRs presentan alteraciones en el patrón de metilación de las histonas.....	63
5.2.- La expresión de miRs en líneas celulares de LLA está regulada por hipermetilación de islas CpG.....	66
5.3.- Resultados clínicos y perfil de metilación de miARNs	71

5.4.- Impacto pronóstico del perfil de metilación de miARNs en grupos seleccionados de riesgo.....	75
6.- DISCUSIÓN.....	77
7.- CONCLUSIONES.....	83
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	87
9.- APÉNDICE.....	109

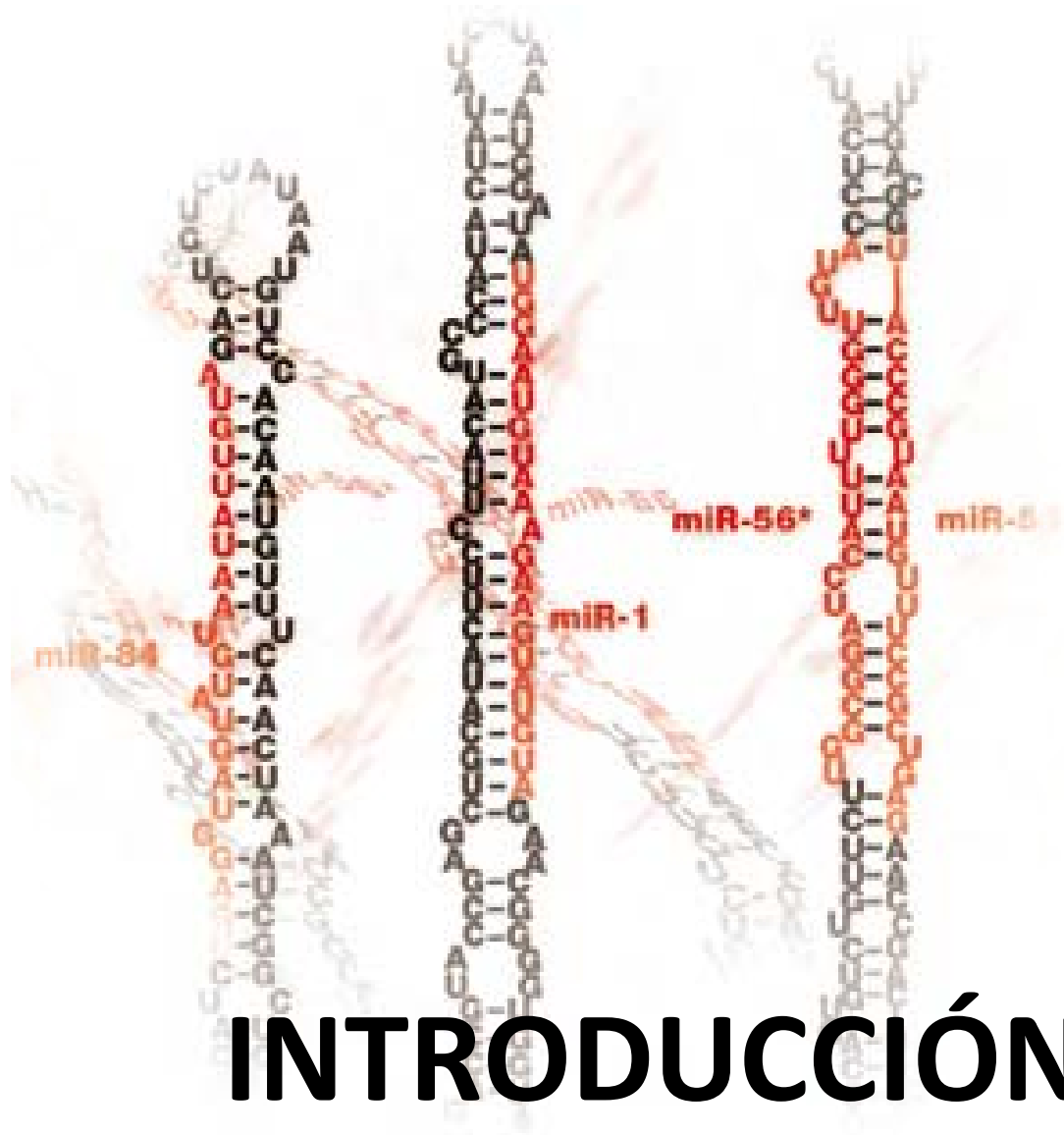
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metilación de la Citosina.....	4
Figura 2.- Papel de la metilación del ADN en el comportamiento normal y maligno de la célula.....	5
Figura 3.- Asociación entre las proteínas de unión a los nucleótidos CpG metilados y las DNMTs con las desacetilasas y metiltransferasas de histonas.....	6; 7
Figura 4.- Código de las histonas.....	9
Figura 5.- Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con LLA de acuerdo con los perfiles de metilación.....	16
Figura 6.- Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con LAL CIMP- de acuerdo con el estado de hipometilación.....	18
Figura 7.- Biogénesis del microARN.....	22
Figura 8.- MicroARNs como supresores tumorales u oncogenes.....	27
Figura 9.- Métodos para encontrar islas CpG metiladas en miARNs en el cáncer.....	33
Figura 10.- Repertorio de diferentes modelos de metilación en células normales y cancerígenas.....	35
Figura 11.- Resumen de la técnica de Inmunoprecipitación-on-Chip de Cromatina.....	52
Figura 12.- Resumen del CHIP-PCR-cuantitativo.....	54
Figura 13.- Resultados del análisis CHIP-on-Chip de miARNs representativos embebidos o localizados cerca de las islas CpG.....	64

Figura 14.- Resultados representativos del CHIP cuantitativo de gen sencillo de miARNs en las líneas celulares TOM-1 y NALM-20.....	65
Figura 15.- Análisis de metilación de genes microARN en las líneas celulares derivadas de LLA.....	67
Figura 16.- Análisis de metilación de <i>hsa-miR-320</i> en líneas celulares derivadas de LLA.....	67
Figura 17.- Análisis de expresión de los genes miARN en líneas celulares derivadas de LLA.....	68
Figura 18.- Metilación asociada con la infrarregulación de genes miARN representativos en pacientes LLA.....	70
Figura 19.- Función Kaplan-Meier de supervivencia para pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).....	73
Figura 20.- Función Kaplan-Meier de supervivencia para grupos seleccionados pronósticos de pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LLA).....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genes metilados en LLA.....	11
Tabla 2.- Ejemplos de microARNs localizados en regiones mínimas delecionadas, regiones mínimas amplificadas y puntos de rotura involucrados en las neoplasias humanas.....	21
Tabla 3.- Características clínicas del grupo de pacientes.....	50
Tabla 4.- Primers usados en este estudio.....	56
Tabla 5.- Características clínicas y resultados de acuerdo al estado de metilación del miARN.....	69
Tabla 6.- Modelo multivariante de Cox para Supervivencia Libre de Enfermedad y Supervivencia Global.....	74
Tabla 7.- Lista de miARNs mayormente metilados y sus genes diana predichos.....	80



1.1- LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA Y METILACIÓN DEL ADN.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de cáncer más prevalente, así como la forma de leucemia más común en los niños, aunque no es infrecuente en la población adulta [1]. Las células leucémicas de la mayoría de los pacientes con LLA expresan en su superficie, antígenos proteicos que también se encuentran en los diferentes estadios de maduración de los precursores linfoides T y B normales. De esta forma, las clonas leucémicas de la LLA parecen estar originadas en células linfoides bloqueadas en un estadio temprano de su maduración [2]. La característica central de la LLA y de otros tipos de neoplasias es la aparición progresiva de una conducta celular maligna generada por una función genética alterada [3]. Las translocaciones cromosómicas constituyen un indudable escalón oncogénico en la LLA y los genes estructuralmente alterados por ellas juegan papeles cruciales en la proliferación, diferenciación y apoptosis [4]. Sin embargo, estas alteraciones sólo aparecen en un bajo porcentaje de casos y además, en subtipos muy específicos de LLA [5]. Por otra parte, las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (*p53*, *RAS*), tan frecuentes en tumores sólidos, rara vez aparecen en las neoplasias linfoides agudas [6]. Junto a estas anomalías genéticas, es cada vez más evidente que las alteraciones epigenéticas también juegan un papel central en la patogénesis y progresión de este tipo de leucemias [7-9].

La epigenética hace referencia a aquellos cambios hereditarios en los patrones de expresión génica que no dependen de alteraciones en la secuencia normal de los nucleótidos que componen el genoma. Entre todos los eventos epigenéticos existentes, el que mejor caracterizado está es el denominado metilación del ADN.

1.1.1.- Metilación del ADN y silencio transcripcional

La metilación del nucleótido citosina es la única modificación conocida que ocurre de forma endógena en el ADN de los mamíferos y es debida a la

adición enzimática, mediada por las ADN metiltransferasas (DNMTs), de un grupo metilo al carbono en posición 5 de la citosina (**Figura 1**) [1, 10, 11]. La mayor parte de las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN humano están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' (Citosina-fosfato-Guanina, CpG), los cuales no se encuentran distribuidos de forma uniforme en el genoma ya que han sido deplecionados progresivamente de este a lo largo de la evolución. En el 98% del genoma, los dinucleótidos CpG aparecen una vez cada 100 dinucleótidos y se encuentran fuertemente metilados con objeto de estructurar la cromatina nuclear en un estado represivo que impida la transcripción de regiones poco útiles y potencialmente peligrosas del ADN, tales como las secuencias repetitivas *Alu* o transposones [11,12,13]. En contraste, regiones pequeñas del ADN que van desde 200 pb hasta varias kilobases, denominadas "islas CpG", contienen la frecuencia esperada de dinucleótidos CpG (1 por cada 10 dinucleótidos). Estas áreas están protegidas de la metilación y se encuentran localizadas en las regiones promotoras proximales de cerca del 50-60% de todos los genes [10,14]. Esta ausencia de metilación constituye un requisito básico para la transcripción activa y normal funcionamiento de los mismos.

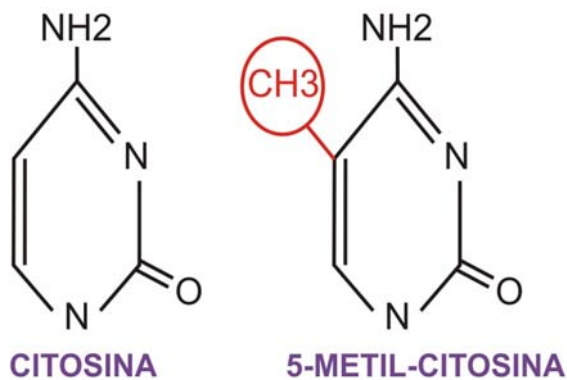


Figura 1. La metilación del ADN supone la adición de un grupo metilo al carbono en posición 5 del anillo de la citosina. En el genoma de los mamíferos, la metilación tiene lugar únicamente en las bases citosínicas que están localizadas en la posición 5' respecto a la guanina en un dinucleótido CpG.

La principal consecuencia de la metilación de los promotores es el silenciamiento en la expresión del gen correspondiente [11,14]. Gracias a este mecanismo se impide la transcripción de secuencias parásitas del ADN, potencialmente dañinas para la integridad celular, tales como retrovirus endógenos o transposones. Además, la metilación es muy útil para la célula en

la inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer, la impresión génica o la expresión de genes específicos de tejidos (**Figura 2**) [11,13].

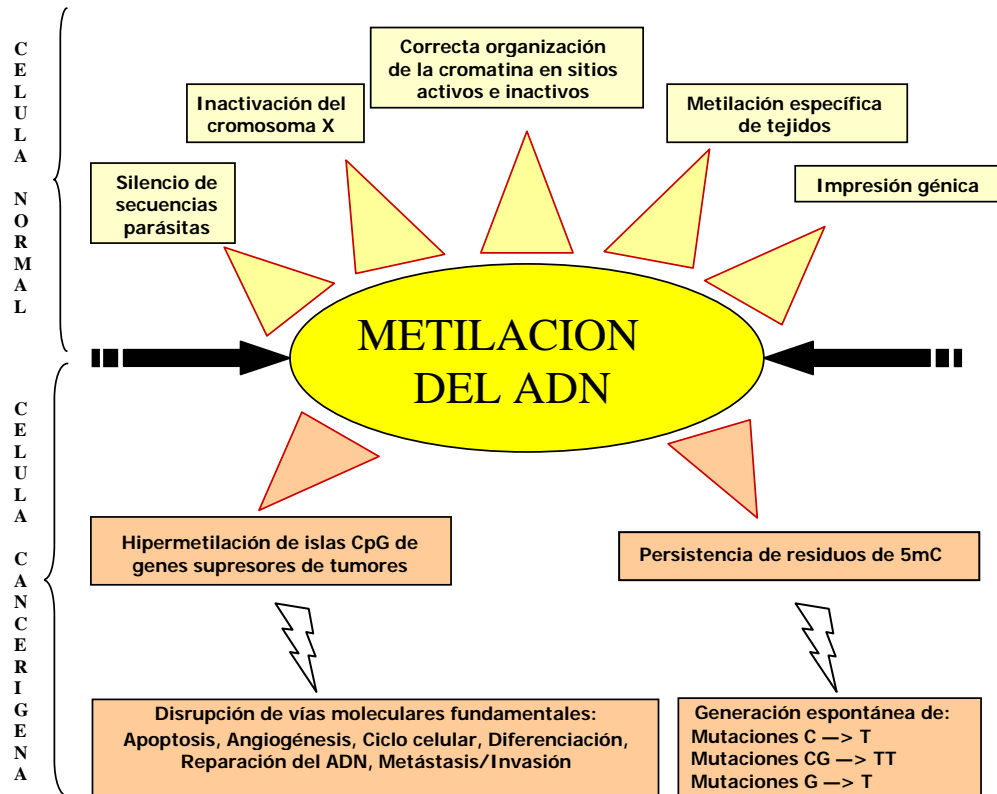


Figura 2. Papel de la metilación del ADN en el comportamiento normal y maligno de la célula.

La metilación del ADN está controlada por la actividad de al menos 3 DNMTs: DNMT1, la más activa en mamíferos, responsable del mantenimiento de la metilación; DNMT3a y DNMT3b, encargadas de la metilación *de novo*. Sin embargo, la metilación por sí misma no reprime directamente la transcripción; ésta sucede a través de mecanismos indirectos complejos que suponen cambios en la formación de la cromatina [15-22]. Aunque la importancia funcional de la metilación en la pérdida de función génica está claramente establecida, los mecanismos moleculares implicados en este proceso no están totalmente dilucidados. Recientemente, se ha demostrado la implicación funcional de la asociación entre metilación y una cromatina nuclear inactiva

desde el punto de vista transcripcional, donde las proteínas de unión a los CpG metilados y las DNMTs están asociados con desacetilasas y metiltransferasas de histonas, grandes reguladores de las modificaciones de las histonas (**Figura 3A y 3B**). Por tanto, podemos decir que la metilación del ADN ocurre junto con otras modificaciones epigenéticas como son las modificaciones de las histonas o también denominado “código de histonas” [15-22].

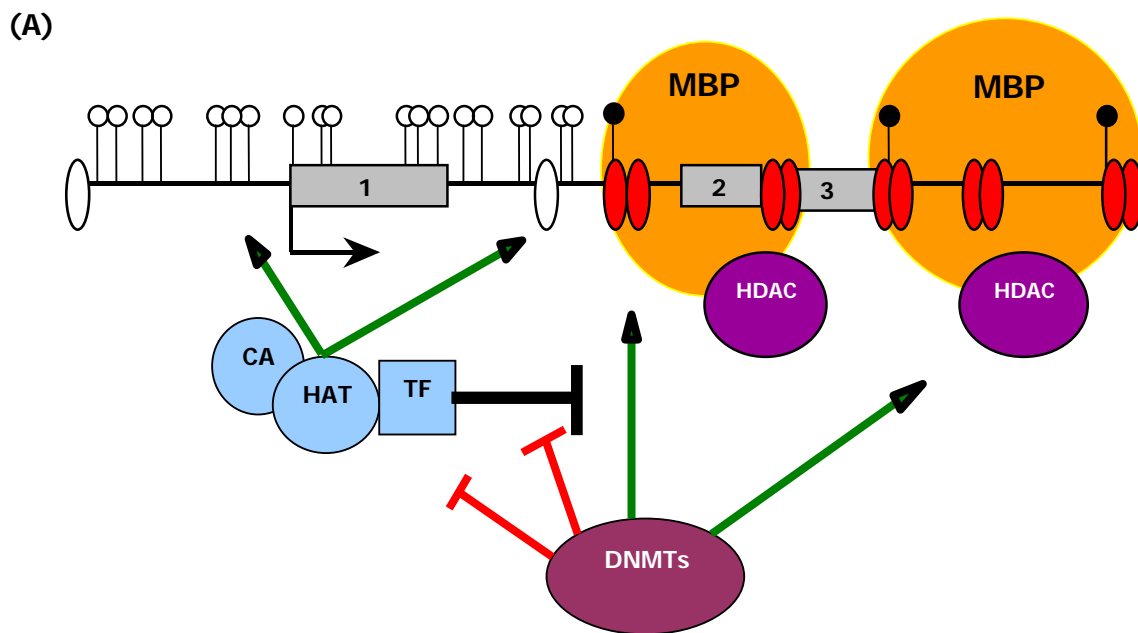


Figura 3 (A). Célula normal. Configuración típica de una transcripción activa (flecha al comienzo del exón 1), tres exones (rectángulos números 1, 2 y 3) con una región promotora no metilada en las islas CpG (círculos blancos). Las islas están constituidas por una región rica en CpG que está protegida de la metilación, mientras que las áreas inmediatas debajo de la cadena, tanto dentro del cuerpo del gen y en dirección 3', muestran depleción de CpG y fuerte metilación (círculos negros) típica de la mayor parte del genoma. La constitución de la cromatina en las islas es favorable a la transcripción y se caracteriza por estar ampliamente distendida y presentar nucleosomas no compactos con histonas acetiladas (óvalos claros sobre el ADN). A diferencia de esto, las regiones sin islas CpG tienen cromatina escasamente distendida y nucleosomas compactos con histonas desacetiladas (óvalos rojos). Las islas son accesibles a los complejos habituales de transcripción constituidos por una acetilasa de histonas (HAT), un co-activador (CA) y factores de transcripción (TF), pero no interactúan con las metil-transferasas del ADN (DNMTs). Por el contrario, el complejo de transcripción no interactúa con las regiones metiladas que sin embargo son plenamente accesibles a las DNMTs y presentan complejos proteicos constituidos por proteínas que se unen a las citosinas metiladas (MBPs, halo naranja) y desacetilasas de histonas (HDAC).

(B)

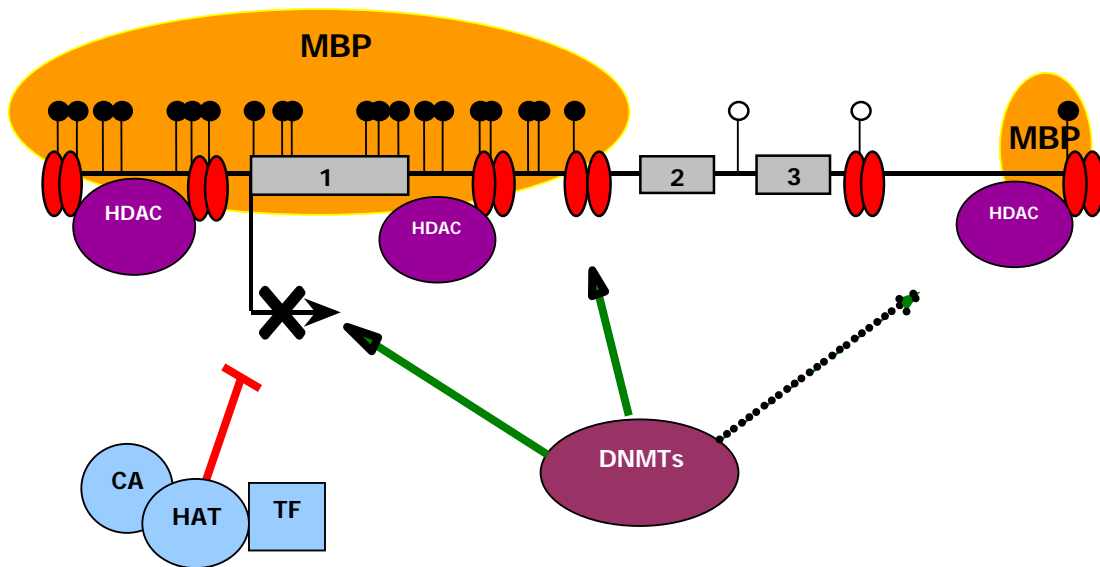
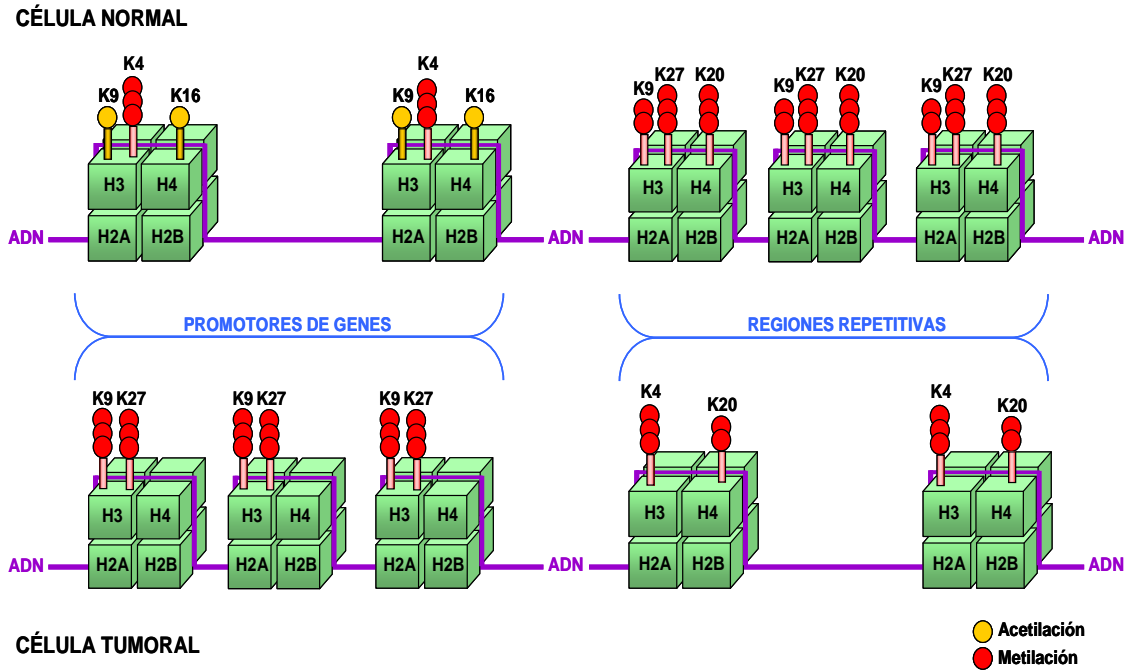


Figura 3 (B). Célula tumoral. El gen muestra metilación aberrante y silencio transcripcional (X). La isla CpG está ahora fuertemente metilada (círculos negros), plenamente accesible a las DNMTs y los nucleosomas contienen histonas desacetiladas y están aún más compactos con cromatina menos distendida (óvalos rojos). Las islas CpG metiladas interactúan ahora con los complejos MBP-HDAC y el complejo de transcripción está excluido de la región. El área por debajo de la isla muestra la hipometilación típica del genoma de la célula tumoral, con débil interacción con DNMTs, con un descenso del número de nucleosomas y pocos complejos MBP-HDAC.

Las histonas acumulan su información epigenética mediante un conjunto de modificaciones químicas post-traduccionales como son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. La mayoría de estas modificaciones ocurren en aminoácidos bien conservados durante la evolución que se localizan en las regiones o “colas” amino-terminales de las histonas que forman el nucleosoma (esta estructura de la cromatina se compone de unos 146 pb de ADN enrollado alrededor de un octámero formado por dos unidades de cada una de las siguientes cuatro histonas, la H2A, H2B, H3 y H4). La teoría que se propone es que en las histonas ocurren varias modificaciones que actúan secuencialmente o en combinación, definiendo lo que se denomina el “código de histonas”, confiriendo a una región concreta de la cromatina el estado general de transcripción. En general, en células normales la acetilación de las lisinas de las histonas 3 y 4 (AcH3, AcH4) se asocia con regiones

genómicas en conformación activa de la transcripción. La metilación de las histonas puede ocurrir en residuos de lisina o arginina y su consecuencia funcional depende de cuál sea el residuo o la región que se haya modificado. Así, la trimetilación de la lisina en posición 4 (3meK4H3) o 79 y de la arginina en posición 17 de la histona 3 se asocia con una transcripción activa, mientras que la trimetilación de la lisina en posición 9 (3meK9H3), 27 (3meK27H3) o 36 de la histona 3 y la lisina en posición 20 de la histona 4 se asocia con una represión de la transcripción. En una célula normal, las regiones de los promotores de los genes se asocian con marcas de cromatina abierta como son la AcH3 y AcH4 y la 3meK4H3, mientras que las regiones repetitivas se asocian con marcas de cromatina cerrada como son la 2-3meK9H3, la 3meK27H3 y la trimetilación de la lisina 20 de la H4. En contraposición, en el caso de una célula tumoral, se pierden las marcas de cromatina abierta y se ganan las marcas de cromatina cerrada como son la 3meK9H3 y 3meK27H3 en los promotores mientras que se pierden estas marcas en las regiones repetitivas del genoma (**Figura 4**). En conclusión, las modificaciones de las histonas, al igual que la metilación del ADN, tienen una gran importancia en el mantenimiento de la integridad del genoma y en la regulación normal de la transcripción génica.



CÉLULA TUMORAL

Figura 4. Código de las histonas. En una célula normal, las regiones de los promotores de los genes se asocian con marcas de cromatina abierta como son la Ach3 y Ach4 y la 3meK4H3, mientras que las regiones repetitivas se asocian con marcas de cromatina cerrada como son la 3mek9H3, la 3meK27H3 y la trimetilación de la lisina 20 de la H4. En la célula tumoral, se pierden las marcas de cromatina abierta y se ganan las marcas de cromatina cerrada como son la 3mek9H3 y 3meK27H3 en los promotores mientras que se pierden estas marcas en las regiones repetitivas del genoma

1.1.2.- Metilación del ADN en la oncogénesis

En las células tumorales, la hipermetilación aberrante de las islas CpG en torno a las regiones promotoras de los genes es, hoy por hoy, el cambio epigenético mejor caracterizado; se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias humanas y está asociada, como se ha mencionado anteriormente, con la transcripción inapropiada mediante el silenciamiento de genes. La hipermetilación del promotor es tan frecuente, o más aún, que los trastornos de los genes supresores de tumores clásicos por mutación o delección [7, 9, 11, 12, 13, 20, 23, 24]. La hipermetilación de los promotores puede encontrarse de manera temprana en la tumorigénesis. Estas alteraciones epigenéticas pueden ocasionar pérdidas prematuras en el control del ciclo celular, regulación alterada de los factores de transcripción génica,

trastornos de la interacción célula-célula y célula-sustrato, disregulación en la reparación del ADN, resistencia a drogas, destoxificación, apoptosis y angiogénesis, e incluso múltiples tipos de inestabilidad genética, todas ellas características del comportamiento maligno exhibido por las células tumorales humanas (**Figura 2**).

Aunque tanto la hipermetilación del promotor como la mutación de un gen se asemejan en que ambas originan una ventaja selectiva en la proliferación de la célula neoplásica, hay algunas diferencias fundamentales entre los eventos genéticos y epigenéticos que, en potencia, son muy significativas para la biología del tumor. Por ejemplo, la pérdida de la transcripción génica asociada con la metilación aberrante de los promotores en las islas CpG está mediada por la densidad de la metilación dentro de la región [25]. Dicha densidad puede aumentar durante el tiempo [26,27] y así estar asociada con un aumento gradual de la pérdida de transcripción en lugar de con una pérdida inmediata y fija de la función, como ocurre en los eventos genéticos según el clásico modelo en “2 hitos” de Knudson. Además, la hipermetilación del promotor y el silencio génico asociado permanecen, generalmente, muy estables en las células cancerosas [28] y son cambios que, a diferencia de las mutaciones, pueden ser potencialmente reversibles.

Además, los modelos de metilación de los genes pueden también aportar diferentes tipos de información útil sobre una célula tumoral: (a) cada tipo de tumor tiene un grupo característico de genes con una propensión incrementada a ser metilados [29]; el perfil de la hipermetilación del promotor para los genes difiere para cada tipo de cáncer, facilitando un perfil tumor-específico y génico-específico; (b) un tumor individual dentro de un mismo paciente tiene una única huella epigenética reflejo de la evolución de ese tumor en comparación con un tumor del mismo tipo en un paciente diferente [30]. Así, tal mapa epigenético puede ser inestimable en la detección del cáncer, en la predicción de la respuesta al tratamiento y en el pronóstico.

1.1.3.- Hipermetilación de las islas CpG en la LLA

Se ha determinado el estado de metilación del ADN para un número de genes en la LLA (**Tabla 1**). La mayoría de estos genes fueron elegidos originariamente a causa de su conocido o presumido papel en la inmortalización celular y transformación en el cáncer hematológico y de otros tipos. Algunos de estos genes analizados fueron seleccionados porque se encontraban silenciados de manera aberrante en las muestras tumorales en comparación con su modelo de expresión en los tipos celulares de los cuales derivaban. Sin embargo, las secuencias génicas de algunas muestras individuales fallaron en demostrar la pérdida de heterocigosidad, mutaciones, traslocaciones u otras alteraciones genéticas, indicando que otros mecanismos de control celular podrían ser responsables de la inactivación génica. Tales resultados minaban la hipótesis de que las hemopatías surgían a través de alteraciones genéticas puras. Posteriormente, se investigaron muchos de estos genes silenciados para establecer la presencia y el alcance de la metilación del ADN como fuente de silencio aberrante.

Tabla 1.- Genes metilados en LLA.

GEN	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	% PACIENTES METILADOS
<i>ADAMTS1</i>	21q21.2	Metaloproteasa	45
<i>ADAMTS5</i>	21q21.3	Metaloproteasa	36
<i>APAF1</i>	12q23	Regulación apoptosis	23
<i>ARTS</i>	17q22-23	Regulación apoptosis	22
<i>ASPP1</i>	14q32-33	Coestimulador p53; regulación apoptosis	22
<i>CHD1</i>	16q22	Adhesión célula-célula	37
<i>CHD13</i>	16q24	Adhesión célula-célula	35
<i>DAPK</i>	9q34	Regulación apoptosis	12
<i>DBC1</i>	9q32-33	Regulación apoptosis	13
<i>DIABLO</i>	12q24.31	Regulación apoptosis	22
<i>DKK3</i>	11p15	Antagonista señales vía Wnt	33
<i>FHIT</i>	3p14.2	GST; metabolismo purinas	19
<i>H DPR1</i>	14q23.1	Antagonista señales vía Wnt	26
<i>hRFC</i>	21q22.3	Transportador folato	18
<i>LATS1</i>	6q23-25	GST; control ciclo celular G2-M	34

LATS2	13q11-12	Control ciclo celular G1-S	28
LNHX2	9q33-34.1	Control diferenciación y crecimiento	12
NES1	19q13	Control diferenciación y crecimiento	56
P14	9p21	Control ciclo celular; regulación apoptosis	8
P15	9p21	Control ciclo celular G1-S	18
P16	9p21	GST; control ciclo celular G1-S	15
P57	11p25	Control ciclo celular G1-S	9
P73	1p36	Control ciclo celular G1-S	19
PACRG	6q26	Ubiquitinación	27
PARK2	6q26	Ubiquitinación	27
PTEN	10q23	GST; adhesión/movilidad celular; apoptosis; angiogénesis; regulación ciclo celular G1; transducción señales	16
PGR	11q22-23	Receptor progesterona	40
REPRIMO	2q23.3	Control ciclo celular G2-M	28
RIZ	1p36	GST; vía retinoblastoma	26
sFRP1	8p12-11.1	Antagonista señales vía Wnt	38
sFRP2	4q31.3	Antagonista señales vía Wnt	17
sFRP4	7p14.1	Antagonista señales vía Wnt	21
sFRP5	10q24.1	Antagonista señales vía Wnt	28
SHP1	12p13	Inhibidor señales vía Jak/STAT	12
SMC1L1	Xp11.22	Reparación ADN	8
SMC1L2	22q13.31	Reparación ADN	59
SYK	9q22	Transducción señales	14
TMS1	16p11-12	Regulación apoptosis	10
WIF1	12q14.3	Antagonista señales vía Wnt	30

Abreviaturas: GST, gen supresor tumoral.

Para aclarar esta cuestión, diversos investigadores incluyendo nuestro grupo han examinado múltiples genes tumorales clave sometidos a la inactivación epigenética en un gran conjunto de LLA *de novo* con el fin de obtener un mapa de esta alteración en la enfermedad [31-33, 34-36]. Los resultados de estos estudios indican que la metilación de múltiples genes es un fenómeno común en LLA y puede ser la vía más importante para inactivar los genes relacionados con el cáncer en esta enfermedad. Entre el 70% y 90% de los casos presentaban al menos un gen metilado, mientras que entre el 25% y 40% de los casos tenían tres o más genes metilados ya sean en el diagnóstico [31-33,34-36] o en el momento de la recaída [37,38]. Sin embargo, estos mismos genes no estaban metilados en los linfocitos de controles sanos y en

tejidos no malignos de los mismos pacientes [36]. Además, la metilación de varios de los genes analizados estaba fuertemente correlacionada, lo que sugiere que la metilación de la isla CpG se relaciona con defectos específicos de metilación en subconjuntos de LLA, en lugar de que la metilación de cada isla represente un suceso aleatorio seguido por la selección de la célula afectada [32].

Apoyando el papel de la metilación del ADN en la patogénia de la leucemia aguda, los pacientes con genes metilados mostraron un período de tiempo más corto para el desarrollo de una leucemia secundaria relacionada con la terapia que los pacientes con genes no metilados [39]. Además, en las células LLA se han descrito proteínas específicas vinculadas a la metilación que pueden explicar el fracaso de algunos promotores metilados ligados a factores de transcripción [40]. Nuestro grupo ya ha sugerido cómo la hipermetilación del promotor puede participar en la patogénesis y el pronóstico de la LLA [41].

1.1.4.- Papel de la hipermetilación del ADN en la patogénesis y pronóstico de la LLA

La metilación en las células humanas con LLA puede participar en la inactivación de las cinco principales vías celulares: (a) disregular aquellos eventos del crecimiento cuyo objetivo es el control principal de la fase G1-tardía del ciclo celular, ya sea directamente (inactivación de *p15*, *p16* y *p57*) o indirectamente (inactivación de *p73*, *PTEN*, *NES-1* y *LATS-2*) y aquellos que regulan la transición de G2 a M regulando a la baja la actividad cinasa de CDC2/Ciclina A (*LATS-1*); (b) el programa apoptótico a través de la inactivación de *p14*, *TMS1*, *APAF-1*, *ASPP-1*, *DIABLO*, *DBC-1* y *DAPK* [32,33,42,43,44]; (c) la inactivación de aquellos genes que antagonizan las señales oncogénicas de la vía WNT/ β -catenina (*DKK-3*, *sFRP-1*, *sFRP-2*, *sFRP-4*, *sFRP-5*, *WIF-1* y *HDPR-1*) [45,46]; (d) la adhesión célula-célula por la inactivación de algunos de los miembros de la familia de las cadherinas (*CDH13* y *CDH1*) y de las metaloproteasas (*ADAMTS1* y *ADAMTS5*) [32,33,44]; y (e) inactivar algunas

proteínas con actividad cinasa y fosfatasa que modulan las vías intracelulares inducidas por la estimulación de diferentes receptores de citocinas (*SHP-1* y *SYK-1*) [47,48].

Se acepta de manera general que las características clínicas de los pacientes con LLA incluyendo la edad y la cifra de leucocitos, son potentes factores relacionados con la respuesta al tratamiento. Sin embargo, a pesar de la estratificación por grupos de riesgo, hasta el 20% de los niños con riesgo estándar y más del 50% de los pacientes adultos están destinados a la recaída con el tratamiento actual adecuado [1]. Más recientemente se ha demostrado que reconocidos marcadores biológicos, como el inmunofenotipo, las características genéticas y la respuesta al tratamiento, son independientes de las características clínicas tradicionales y proporcionan marcadores adicionales de enfermedad más agresiva [2,4].

La evidencia a favor del papel de la metilación del ADN en la patogénesis de la leucemia está creciendo continuamente, pero aún no se ha demostrado que la metilación induzca la leucemia por sí misma. Además, el número de genes metilados encontrados en la LLA ha aumentado en los últimos años, pero sólo una minoría de ellos puede ser inscrita en mecanismos reconocidos de leucemogénesis. Por el contrario, se ha demostrado repetidamente que el estado de metilación influye en la progresión de la LLA y determina el pronóstico de la misma. Varios mecanismos podrían explicar esta influencia: primero, la metilación de genes individuales puede estar asociada con variables de mal pronóstico ya conocidas en la LLA; segundo, la metilación de los genes implicados en la progresión de la enfermedad o en la respuesta al tratamiento puede modular el pronóstico; finalmente, la acumulación de genes supresores de tumores metilados puede estar asociada con resultados progresivamente peores de la enfermedad.

Ya que el proceso de metilación puede actuar a nivel global en cada tipo de cáncer, o incluso en cada paciente, otro enfoque para determinar el valor pronóstico de la metilación consiste en el examen de los estados de metilación de varios genes, no sólo de uno, como el mejor indicador pronóstico en la LLA. En este sentido, una enfermedad determinada se podría incluir en una forma

más o menos grave en función del número de genes involucrados, lo que representaría un indicador de la situación general de metilación del paciente. Para confirmar esta hipótesis, nuestro grupo ha estudiado el estado de metilación de 39 genes potenciales o reconocidos supresores de tumores pertenecientes a todas las vías moleculares implicadas en la inmortalización y transformación celular (**Tabla 1**), y ha comparado el resultado entre los pacientes (n = 201) con un fenotipo metilador positivo (CIMP+, más de dos genes metilados) y pacientes (n = 106) con un fenotipo metilador negativo (CIMP-, menos de tres genes metilados) [32,33,44].

La tasa de remisión completa (RC) de los pacientes en los grupos CIMP- y CIMP+ fue de 91% y 87%, respectivamente, representando el 89% de la tasa general de RC. Esto sugiere que el perfil de metilación no se correlaciona con la respuesta a la terapia de inducción a la remisión. Sin embargo, los pacientes en el grupo CIMP- tuvieron una tasa de recaída más baja que los pacientes del grupo CIMP+ (26% vs. 58%, $p < 0.0001$). La tasa de mortalidad fue también más baja para el grupo CIMP- comparada con el grupo CIMP+ (34% vs. 58%, $p < 0.001$). La supervivencia libre de enfermedad (SLE) estimada a los 14 años fue del 68% y 32% para los grupos CIMP- y CIMP+, respectivamente ($p < 0.0001$; **Figura 5A**). La supervivencia global (SG) actuarial a los 14 años calculada para todos los pacientes leucémicos fue del 63% para los CIMP- y del 32% para los CIMP+ ($p = 0.0002$; **Figura 5B**). Un análisis multivariante de los factores pronósticos potenciales (incluyendo cifra de leucocitos, alteraciones citogenéticas, *BCR-ABL*, *TEL-AML1*, edad y fenotipo B/T), demostró que el perfil de metilación era un factor pronóstico independiente en predecir la SLE ($p < 0.0001$) y la SG ($p = 0.003$) en las series globales, así como en el análisis separado tanto en los niños como en los adultos con LLA.

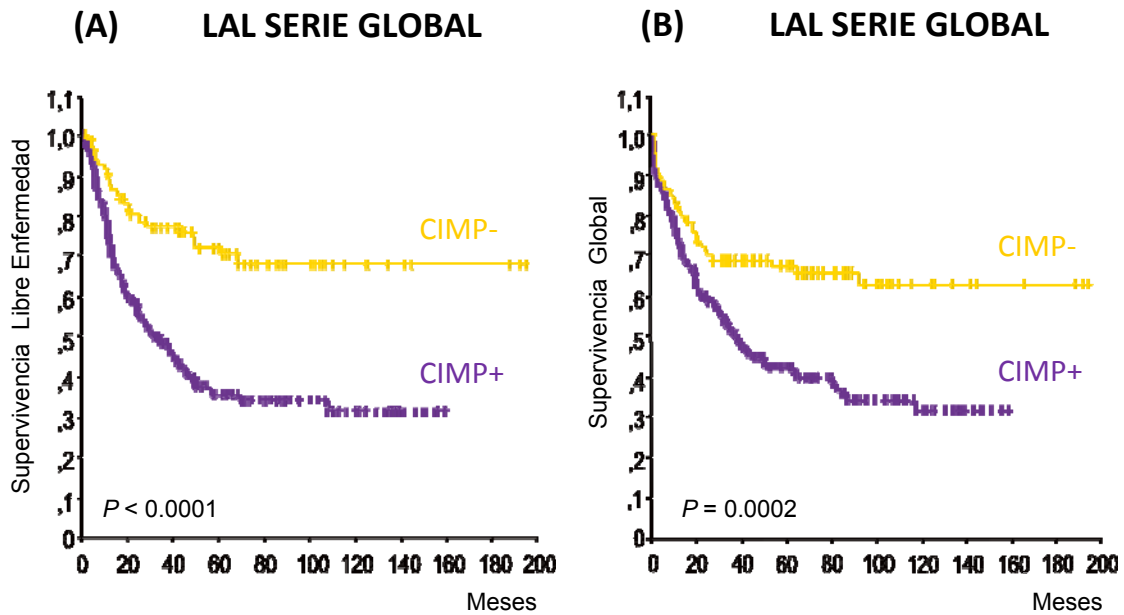


Figura 5. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con LLA ($n=307$; 162 adultos y 145 niños) de acuerdo con los perfiles de metilación. Curvas de Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y Supervivencia Global (B) para todos los pacientes estudiados. CIMP- (pacientes con 0-2 genes metilados); CIMP+ (pacientes con más de 2 genes metilados). Treinta y nueve genes relacionados con el cáncer se analizaron para la metilación (ver Tabla 1).

Además, el estado de metilación era capaz de redefinir el pronóstico de determinados grupos de LLA con características pronósticas bien establecidas. Un fenotipo CIMP- mejoró la mala respuesta general de pacientes que presentaban cromosoma Filadelfia [32], LLA de células T [33] o cifras altas de leucocitos al diagnóstico [32], mientras que la presencia de un fenotipo CIMP+ empeoró la buena respuesta general de los pacientes *TEL-AML1* positivos [44].

Por lo tanto, el perfil de metilación en la LLA podría tener importantes implicaciones clínicas complementando a los estudios inmuno-fenotípicos, citogenéticos y moleculares estándar para guiar la elección de la terapia.

1.1.5.- Hipometilación del ADN en la LLA

La hipometilación global, es decir, la disminución del contenido de 5mC en el genoma, se observa frecuentemente en las neoplasias afectando a secuencias repetitivas. Estas incluyen los transposones (especialmente el retrotransposon LINE1) y elementos endógenos retrovirales [49]. Aunque la hipometilación del ADN asociada al cáncer es tan prevalente como la hipermetilación, su significado biológico es más incierto [50].

Se ha visto que tanto la hipometilación genómica general y la hipermetilación regional coexisten en el ADN extraído de diferentes tipos de tejidos neoplásicos [11,50].

Recientemente, hemos analizado la extensión de la hipometilación e hipermetilación del ADN en una serie amplia de pacientes con LLA (n=307) para determinar si reflejan características biológicas y clínicas distintivas, y si representan dos elementos disfuncionales independientes del sistema de metilación del ADN. El promotor de LINE1 (L1) estaba hipometilado en 73/307 (24%) de los pacientes con LLA. No encontramos asociaciones significativas entre el estado de metilación de ninguna de las 39 regiones ricas en dinucleótidos CpG estudiadas y los niveles de hipometilación de L1. Además, la hipometilación de L1 estaba distribuida de manera similar entre los grupos CIMP- y CIMP+ (26% versus 23%). La ausencia de cada una de las relaciones sugiere que la hipometilación del ADN asociada al tumor contribuye a la leucemogénesis linfoide por separado de la hipermetilación aberrante del ADN y del consecuente silencio de los genes supresores de tumores. A diferencia de la hipermetilación del promotor, la hipometilación del ADN constituía un indicador de buen pronóstico en los análisis uni- y multivariante, y era capaz de definir un grupo de bajo riesgo entre el grupo de pacientes CIMP-. Los pacientes hipometilados con un estado CIMP- mostraron una SLE del 100% a los 12 años y una SG del 81% (**Figura 6**). Esta asociación opuesta entre hiper- e hipometilación es también consecuente con los papeles independientes de ambas anormalidades en el inicio y progresión del tumor.

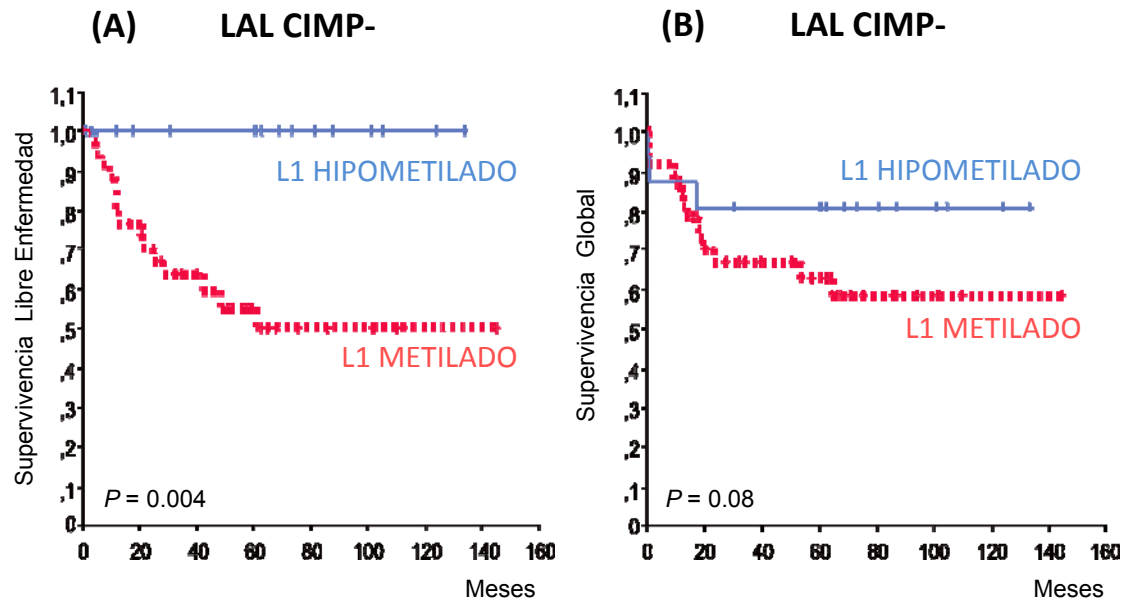


Figura 6. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con LAL CIMP- ($n=106$) de acuerdo con el estado de hipometilación. Curvas de Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y Supervivencia Global (B) para pacientes CIMP- (pacientes con 0-2 genes metilados) según el estado de metilación del retrotransposon LINE1 (L1).

Aunque, la pérdida de metilación del ADN en ciertas regiones puede favorecer la expresión de genes “virales” insertados y elementos repetidos con potencial tóxico celular, la hipometilación es otro mecanismo que puede facilitar la expresión de oncogenes específicos reprimidos, particularmente, en células LLA-T [51], como por ejemplo el proto-oncogen *HOX11*.

1.1.6.- Perspectivas terapéuticas

A diferencia de los cambios genéticos en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles. Así, existe la posibilidad de reactivar epigenéticamente genes tumorales silenciados para beneficio terapéutico. El agente desmetilante 5-azacitidina y su derivado 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) son poderosos inhibidores de la metilación del ADN, ya que son incorporados a los ácidos nucleicos de las células en división, donde actúan según un mecanismo basado en la inhibición de las DNMTs [52]. Sus usos para restaurar la función génica en células tratadas en cultivo han indicado que podrían también ser útiles para tratar pacientes con procesos

malignos [53]. De hecho, esas drogas han sido ya empleadas de manera satisfactoria para el tratamiento de hemopatías malignas, como SMD o LMA [54-56]. En asociación con otros tratamientos quimioterápicos, los inactivadores de las DNMTs pueden actuar de manera sinérgica, sensibilizando a otros tratamientos [56] y remitiendo leucemias previamente refractarias [57]. Apoyando esta idea, los agentes desmetilantes combinados con ATRA inducen la apoptosis en líneas celulares [58]. Sin embargo, en algunos casos, no se ha encontrado correlación entre la metilación génica y la expresión después del tratamiento con 5'-azacitidina, sugiriendo que otros mecanismos aparte de la desmetilación puedan jugar un papel en el efecto de estas drogas [59]. En la actualidad, se están diseñando moléculas antisentido contra las DNMTs y están siendo probadas en un intento de evitar algunos de los efectos indeseables de la 5'-azacitidina y análogos [54].

El hallazgo de que la deacetilación de las histonas está ligada a los procesos de metilación como un mecanismo adyuvante en el silencio génico ha constituido una base racional para el empleo de inhibidores de las HADCs, tales como el ácido valproico, el fenilbutirato sódico o el depsipéptido como agentes antineoplásicos. Una nueva estrategia basada en la combinación de inhibidores de las DNMT y HDAC reduce el crecimiento de las células leucémicas *in vitro* [60].

Hemos demostrado recientemente que la regulación epigenética de los inhibidores Wnt es un mecanismo clave que contribuye de manera significativa a la activación de las señales de la vía Wnt en LLA [46]. Este hallazgo tiene implicaciones clínicas potenciales para pacientes afectados de LLA. La demostración de que la inhibición de la β -catenina induce apoptosis en la LLA establece esta vía como una diana atractiva para el uso de terapias más específicas como la Quercetina [61] o los más recientes antagonistas farmacológicos del complejo proteínico Tcf/ β -catenina [62]. Además, el hecho de que el tratamiento con decitabina inactiva las señales de la vía Wnt como demostramos en nuestro estudio [46], puede justificar el uso de agentes desmetilantes clínicamente aprobados como la decitabina o 5-aza-2'-deoxicitidina en pacientes con LLA [63,64,65].

1.2.- EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE MICROARNs EN EL CÁNCER.

1.2.1.- La nueva era del cáncer: la “miR-evolución”

Los microARNs (miR) son pequeños ARNs no codificantes de 19-24 nucleótidos de longitud que fueron descubiertos hace más de una década por Víctor Ambros y colaboradores [66]. Estos autores encontraron que *lin-4*, un conocido gen que participa en el desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans*, no codificaba una proteína pero, en su lugar, daba origen a un pequeño ARN de 22 nucleótidos que, posteriormente, se vio que se relacionaba con la región 3' no-trasladada (UTR) del ARNm *lin-14* y reprimía su expresión [67].

Los descubrimientos efectuados durante los últimos años apoyan un papel para los miRs en la regulación de procesos cruciales tales como la proliferación [68], apoptosis [69], desarrollo [70], diferenciación [71] y metabolismo celular [72]. Recientemente, la expresión de miRs se ha ligado al cáncer. La primera evidencia de afectación de los miRs en las neoplasias vino del hallazgo de la disminución o ausencia de los *miR-15 α* y *miR-16-1* en la mayoría de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) [9]. Los *miR-15 α* y *miR-16-1* están localizados dentro del intrón de un gen no codificante de ARN de función desconocida, llamado *deleted in lymphocytic leukemia (DLEU2)*. Este gen reside en una región de 30-Kb en el cromosoma 13q14, la cual es delecionada en más del 65% de las LLCs [73], en el 50% de los linfomas del manto [74], en el 16-40% de los mielomas múltiples [75] y en el 60% de los cánceres de próstata [76]. Esta observación condujo a indagar en la asociación entre las localizaciones de los miRs y las regiones genómicas involucradas en el cáncer. Así, la mitad de los miRs conocidos están localizados dentro o cerca de sitios frágiles, en regiones de pérdida de heterocigosidad, en regiones de amplificación génica o en puntos de rotura habitualmente asociados a tumores [77]. Por ejemplo, el grupo 17-92 está localizado en 13q31, una región comúnmente amplificada en linfomas [78]; *miR-143* y *miR-145* están localizados en 5q33, el cual está frecuentemente delecionado en síndromes

mielodisplásicos, y *miR-142* está localizado en la vecindad de la región de rotura t(8;17), que afecta al cromosoma 17 y al gen *MYC*. Esta traslocación yuxtapone al gen *MYC* cerca del promotor del *miR-142* induciendo una sobreexpresión anormal de *MYC* que está asociada con linfomas y leucemia prolinfocítica [79] (**Tabla 2**).

Tabla 2.- Ejemplos de microARNs localizados en regiones mínimas delecionadas, regiones mínimas amplificadas y puntos de rotura involucrados en las neoplasias humanas.

CROMOSOMA	LOCALIZACIÓN (marcas definidas)	TAMAÑO (Mb)	MiR	HISTOTIPO	OG o ST
3p21.1–21.2-D	ARP–DRR1	7	Let-7g y miR-135–1	Cáncer mama y pulmón	Desconocido
3p21.3(AP2O)-D	GOLGA4–VILL	0.75	MiR-26a	Cáncer epitelial	Desconocido
3p23–21.31(MDR2)-D	D3S1768–D3S1767	12.32	MiR-26a y miR-138–1	Cáncer nasofaríngeo	Desconocido
5q32-D	ADRB2–ATX1	2.92	MiR-145 y miR-143	Síndrome mielodisplásico	Desconocido
9q22.3-D	D9S280–D9S1809	1.46	MiR-24–1, miR-27b y miR-23b; let-7a-1, let-7f-1 y let-7d	Cáncer urotelial	CPT y AFNCC
9q33-D	D9S1826–D9S158	0.4	MiR-123	Cáncer pulmón no células pequeñas	Desconocido
11q23–q24-D	D11S927–D11S1347	1.994	MiR-34a-1 y miR-34a-2	Cáncer mama y pulmón	PPP2R1B
11q23–q24-D	D11S1345–D11S1328	1.725	MiR-125b-1, let-7a-2 y miR-100	Cáncer mama, pulmón, ovario y cérvix	Desconocido
13q14.3-D	D13S272–D13S25	0.54	MiR-15a y miR-16a	LLC células-B	Desconocido
13q32–33-A	stSG15303–stSG31624	7.15	MiR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1 y miR-92–1	Linfoma folicular	Desconocido
17p13.3-D	D17S1866–D17S1574	1.899	MiR-22, miR-132 y miR-212	Carcinoma hepatocelular	Desconocido
17p13.3-D	ENO3–TP53	2.275	MiR-195	Cáncer pulmón	TP53
17q22–t(8;17)	MiR-142s–c-MYC		MiR-142s y miR-142as	Leucemia prolinfocítica	c-MYC
17q23-A	CLTC–PPM1D	0.97	MiR-21	Neuroblastoma	Desconocido
20q13A	FLI33887–ZNF217	0.55	MiR-297–3	Cáncer colon	Desconocido
21q11.1-D	D21S1911–ANA	2.84	MiR-99a, let-7c y miR-125b	Cáncer pulmón	Desconocido

LLC, leucemia linfática crónica; AFNCC, anemia Fanconi, grupo complementario C; OG, oncogen; PPP2R1B, proteína fosfatasa 2, subunidad A reguladora, isoforma β; CPT, carcinoma papilar tiroideo; TP53, proteína tumoral 53; ST, supresor tumoral.

El uso de microarrays de expresión de miRs hace posible estudiar sus perfiles en pacientes con cáncer, confirmando que los miRs están expresados de manera diferente en muestra normales frente a tumorales [80].

1.2.2.- Biogénesis de los miARNs

Los miRs son inicialmente transcritos por la ARN-Polimerasa II (pol II) en un transcrito primario largo (pri-miR) de varias kilobases de longitud [81]. Estos pri-miRs son poliadenilados y posteriormente fragmentados en el núcleo por la enzima Drosha para liberar otro precursor de \cong 60-75 nucleótidos (pre-miR) [82,83] (**Figura 7**).

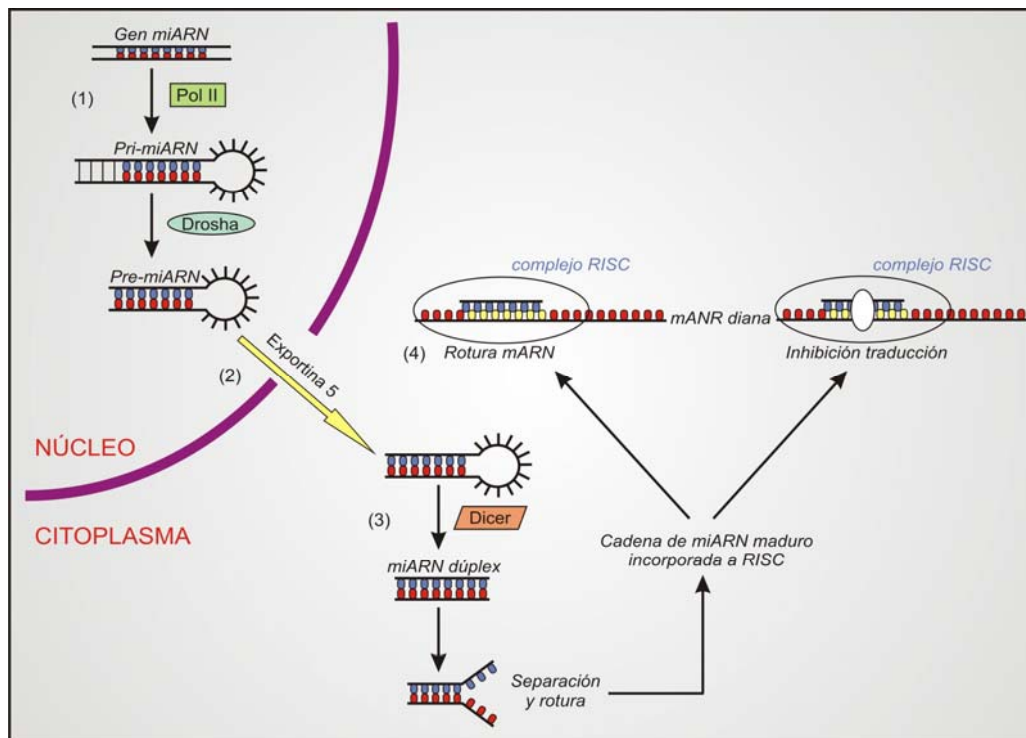


Figura 7. Biogénesis del microARN. (1) Los microARNs son transcritos por la ARN-polimerasa II (pol II) en largos transcritos de miARN de tamaño variable (pri-miARN), que son reconocidos y divididos en el núcleo por la enzima RNasa III Drosha, produciendo un precursor en forma de horquilla llamado pre-miARN. (2) Este pre-miARN es exportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5 y es procesado más adelante por otra enzima Rnasa denominada Dicer (3), que produce un polinucleótido 19-24 dúplex transitorio. Únicamente una cadena del dúplex miARN (miARN maduro) es incorporada a una larga proteína compleja llamada RISC (complejo ARN silenciador inducido). (4) El miARN maduro dirige a RISC a dividir el ARNm o induce represión traduccional dependiendo del grado de zonas complementarias entre el miARN y su diana.

El pre-miR es transportado al citoplasma por la exportina 5 [84,85] donde es procesado por la enzima Dicer, resultando un producto maduro dúplex de 19-24 nucleótidos, de las cuales una cadena es incorporada dentro de un complejo efector llamado complejo silenciador ARN-inducido (RISC) [86,87]. La cadena que es incorporada al RISC es el miR maduro, mientras que la cadena opuesta es eliminada por fragmentación o un mecanismo de bypass [88,89]. Los miRs regulan sus genes dianas por rotura directa del ARNm o por inhibición de la síntesis de proteínas, de acuerdo con el grado de complementariedad con sus regiones 3' UTR dianas [90]. Las complementariedades perfectas o casi perfectas entre el miR y su diana 3'UTR induce al RISC a la fragmentación del ARNm, mientras que la complementariedad imperfecta induce principalmente silencio en la traducción del gen (**Figura 7**) pero puede también reducir la cantidad del ARNm diana [91]. En los últimos años, se ha visto que los miRs también dirigen la deadenilación rápida de los ARNm diana, conduciendo a un deterioro rápido del ARNm y la reducción de sus niveles [92].

En la actualidad, hay más de 1000 miRs humanos reflejados en el registro de miRs (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) [93], y un trabajo reciente ha predicho que el número crecerá considerablemente [94]. Se estima que por encima del 30% de genes humanos están regulados por miRs [95]. Se supone que cada miR tiene varios cientos de transcritos diana [95], haciendo de los miRs una de las familias más importantes y extensas de reguladores genómicos.

1.2.3.- Perfil de expresión en pacientes oncológicos

Diversos grupos han estudiado la expresión de miRs en los pacientes oncológicos y han demostrado que los miRs están diferencialmente expresados en tejidos normales y sus correspondientes tumores [80]. Estas diferencias son tumor-específicas y, en algunos casos, están asociadas con el pronóstico [80].

1.2.3.1.- Estudios de expresión en tumores sólidos

El primer informe sobre la disregulación de los miRs en tumores sólidos fue la observación de una infrarregulación constante del *miR-143* y *miR-145* en el cáncer colorrectal [96].

Un único perfil de miRs constituido por 42 miRs fue capaz de distinguir con exactitud tejidos tumorales frente a normales. Entre los genes discriminativos, muchos estaban asociados con sitios y regiones frágiles que estaban amplificadas en el cáncer; en particular, *miR-21* y *miR-205* están localizados en una región amplificada en el cáncer pulmonar, mientras que *miR-126* en 9q34.3 está localizado en una región comúnmente delecionada en el cáncer de pulmón. Además, los perfiles de miRs se han correlacionado con la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar: la alta expresión de *miR-155* y la baja expresión de *let-7a-2* se asoció con una pobre supervivencia por análisis univariante y multivariante [97]. Esto fue confirmado en un grupo independiente de pacientes usando una tecnología diferente (PCR-tiempo real) para los precursores [97].

En el cáncer de mama, el primer estudio por microarrays de perfiles obtuvo resultados de 76 pacientes con cáncer de mama y diez muestras normales y encontró 29 miRs, cuya expresión estaba disregulada significativamente en los tumores [98]. Los miRs más disregulados fueron *miR-125b*, *miR-145*, *miR-21* y *miR-155*. Además, la expresión de los miRs estaba correlacionada con características patológicas específicas del tumor tales como el estado del receptor estrogénico, el estadio tumoral, la invasión vascular y el índice proliferativo [98]. Al igual que en el cáncer de pulmón, una expresión reducida de *let-7a* estaba relacionada con un mal pronóstico, caracterizado por metástasis ganglionares y alto índice proliferativo.

En el glioblastoma multiforme, se identificó un grupo de miRs cuya expresión estaba alterada significativamente en este tumor [99]. Entre ellos, el *miR-21*, *miR-221* y *miR-25* son miembros de un patrón común a seis cánceres sólidos [100].

Usando una plataforma de microarray similar que incluye sondas para detectar miRs precusores y maduros, Murakami *et al.* [101] estudiaron la expresión de miRs en 25 parejas de carcinoma hepatocelular y tejido adyacente no-tumoral, y nueve tejidos de hepatitis crónica. Su análisis mostró un número pequeño de miRs asociados con estados de diferenciación de los tumores, sugiriendo que estos miRs podrían contribuir tanto a la oncogénesis como a la pérdida de diferenciación [101].

Volinia *et al.* [100] realizaron un extenso análisis de miRs en 540 muestras incluyendo tumores de mama, pulmonar, de estómago, de próstata, de colon y pancreático, e identificaron un patrón para el cáncer sólido compuesto por una gran proporción de miRs sobre-expresados, incluyendo *miR-155*, *miR-17-5p*, *miR-20a*, *miR-21*, *miR-92* y *miR-106a*.

1.2.3.2.- Estudios de expresión en hemopatías

Se han observado diferencias significativas en la expresión del “*miRNoma*” entre las células humanas de la LLC-B y las CD5+ (que representan el equivalente normal de las células LLC-B) [102]. Se pudieron distinguir dos grupos de pacientes dependiendo de la presencia/ausencia de expresión de la proteína cinasa ZAP-70, un factor predictivo de la progresión de la enfermedad, y de la presencia/ausencia de mutaciones en la región variable (Vh) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig) [102]. En el mismo sentido, se ha descrito un perfil único de miRs compuesto por sólo 13 de ellos (de 190 analizados) asociado con el pronóstico y progresión en la LLC [103]. Este perfil distingue casos de LLC con comportamiento indolente (bajos niveles de ZAP-70 e IgVh mutada) de aquellos casos con un curso más agresivo (altos niveles de ZAP-70 e IgVh no mutada).

En otras hemopatías, una expresión alta de *miR-155* y del gen donde se localiza, *BIC* (*B-cell integration cluster*), se ha descrito en el linfoma de Burkitt pediátrico (LB) [104], en la enfermedad de Hodgkin, y en los linfomas primarios mediastínicos y difusos de células grandes [105]. *MiR-155* se encuentra sobre-expresado unas 100 veces en el LB pediátrico, mientras que en el LB adulto se

observa una reducción en los niveles de *BIC* y *miR-155* [106]. Esta diferencia podría estar relacionada con la edad de comienzo del LB.

Lu et al. [107] determinaron la expresión de 217 miRs humanos en un panel de 334 muestras que incluían múltiples tejidos neoplásicos y normales. Observaron una expresión diferencial de casi todos los miRs en los diversos tipos de cáncer. El agrupamiento jerárquico no supervisado de miRs reveló que las muestras agrupadas de acuerdo a su origen de desarrollo mostraban claras diferencias entre los tumores hematopoyéticos y los epiteliales. La estratificación supervisada dentro de los mismos tumores permitió una división clara según los distintos subtipos de tumor definidos por sus características moleculares, tal como las muestras *BCR-ABL* positivas. También observaron una infrarregulación general de miRs comparada con los tejidos normales (129 de 217, $p < 0.05$), sugiriendo que bajos niveles de miRs reflejan una pérdida del estado de diferenciación típico del cáncer.

En general, estos estudios han demostrado la existencia de patrones de miRs que son tejido- y tumor-específicos y hacen posible clasificar, diagnosticar y, en algunos casos, predecir los resultados de manera precisa en los pacientes oncológicos.

1.2.4.- Los miRs como oncogenes y supresores tumorales

Hipotéticamente, un miR que es infrarregulado en el cáncer y tiene como diana un oncogén podría actuar como un supresor tumoral, mientras que una sobreexpresión del miR que tenga como diana un supresor tumoral o un gen importante para la diferenciación podría actuar como un oncogén [80] (**Figura 8**).

La primera evidencia que sugiere un papel de supresor tumoral para los miRs vino de la infrarregulación frecuente de *miR-15a* y *miR-16-1* en pacientes con LLC [9]. Estos dos miRs están localizados en un área comúnmente deletada en la LLC y un estudio de Cimmino *et al.* [108] mostró que *miR-15a* y *miR-16-1* actúan ambos como supresores tumorales por infrarregulación de *BCL2*, un gen que está frecuentemente sobreexpresado en la LLC [109]. Por

lo tanto, la infrarregulación de *miR-15a* y *miR-16-1*, la cual es debida principalmente a una delección genética, podría promover la proliferación celular-B en la LLC, una enfermedad donde la principal característica es una proliferación incrementada de células B maduras.

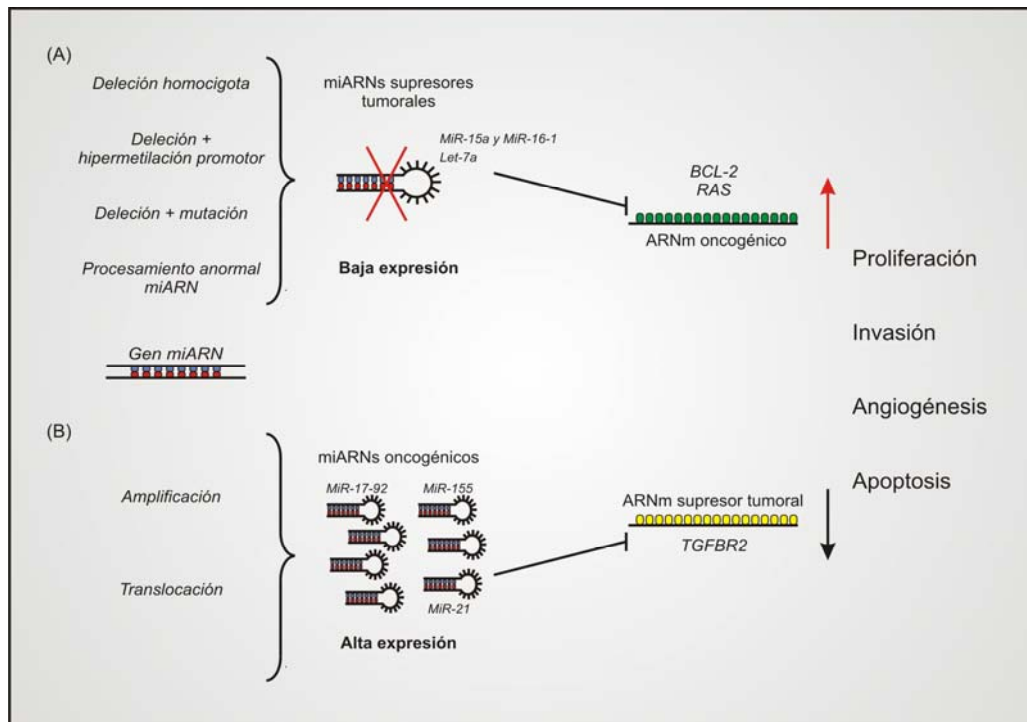


Figura 8. MicroARNs como supresores tumorales u oncogenes. (A) En este modelo, se propone que un miRNA que normalmente infrarregula un oncogén puede funcionar como un gen supresor tumoral cuando se pierde en un tumor. La pérdida de función de este miRNA por mutaciones, delecciones, metilación de promotor o cualquier anomalía en la biogénesis del miRNA podría dar lugar a una expresión anormal del oncogén diana, que posteriormente contribuye a la formación del tumor. Algunos de los mecanismos propuestos para la inactivación de los miRNAs en el cáncer están demostrados experimentalmente, tales como la identificación de las delecciones homocigóticas y heterocigóticas en 13q14.3 en LLC células -B, donde se encuentran *miR-15a* y *miR-16-1* [73,103]. Además, las mutaciones de la línea germinal se encontraron en el precursor de este grupo. (B) La amplificación o la sobreexpresión de un miRNA que infrarregula un gen supresor tumoral u otros genes importantes involucrados en la diferenciación podría contribuir también a la formación del tumor mediante la estimulación de la proliferación, la angiogénesis y la invasión. Por ejemplo, las amplificaciones de los miARNs oncogénicos, grupo miR-17-92, miR-21 y miR-155 se han asociado claramente con la iniciación y progresión tumoral [98, 112, 113, 114].

Por otra parte, la familia *let-7* contiene miRs que regulan la familia de oncogenes *RAS* en ratas a través de la represión post-transcripcional [110]. Estos, miembros de la familia *let-7* están localizados en regiones frágiles asociadas con el cáncer pulmonar, de mama, urotelial y cervical [77]. Los estudios de perfil han mostrado que la baja expresión de *let-7a* en pacientes con cáncer de pulmón se correlaciona con supervivencia post-quirúrgica acortada [111, 97]. Además, la sobre-expresión de *let-7a* en una línea de adenocarcinoma humano inhibe la proliferación celular, sugiriendo una potencial estrategia terapéutica para tratar el cáncer pulmonar [111].

He *et al.* [112] han mostrado que *miR-17-92*, que está localizado en 13q31-32, una región amplificada comúnmente en el linfoma celular-B, estaba sobrerregulado en el 65% de las muestras de linfoma celular-B testadas. Para probar si este miR contribuye a la oncogénesis, los autores usaron un modelo bien caracterizado en ratón de linfoma de células-B inducido por el gen *MYC*. Usando transducción retroviral, los investigadores sobreexpresaron el cluster – *miR-17-92* en las células pluripotenciales hematopoyéticas de ratones que transportaban el transgen *MYC*. La expresión forzada del cluster *miR-17-92* actuó, junto con la expresión de *MYC*, acelerando el desarrollo del tumor [112].

O'Donnell *et al.* [113] empleando un sistema inducible de expresión de *MYC* mostró que *MYC* activa la expresión del cluster *miR-17-19* en el cromosoma 13q31. Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que *MYC* se liga directamente a este locus. Además, indicaron que el factor 1 de transcripción *E2F* (*E2F1*) está infrarregulado por dos miRs del cluster, *miR-17-5p* y *miR-20a*. *E2F1* es una diana directa de *MYC* que promueve la progresión del ciclo celular. Así, *MYC* activa *E2F1* y limita su traducción a través de un mecanismo basado en miR simultáneamente, permitiendo una señal proliferativa fuertemente controlada [113]. Estos dos estudios parecen contradictorios: He *et al.* [112] sugieren un papel oncogénico para el cluster *miR-17-92*, mientras que O'Donnell *et al.* [113] una función anti-apoptótica para el mismo cluster. Sin embargo, se ha informado que altos niveles de *E2F1* podrían verdaderamente inducir apoptosis [115], así que la infrarregulación de este gen por el cluster *miR-17-92* podría funcionar

bloqueando la actividad apoptótica de *E2F1* y contribuir a incrementar la proliferación por *MYC* [116]. El papel oncogénico del cluster *miR-17-92* está además apoyado por los estudios de perfiles mostrando sobreexpresión de este cluster en la LLC celular-B [103] y en cánceres sólidos [105, 117]. Es lógico sugerir que estos miARNs tienen distintos papeles en los distintos tipos celulares, como fue anteriormente propuesto para genes bien conocidos que codificaban supresores tumorales u oncogenes [118].

Otro miARN, *miR-155*, y el gen donde se localiza, *BIC*, se han mostrado estar constantemente sobreexpresados en el LB pediátrico [104], la enfermedad de Hodgkin clásica, linfoma mediastínico primario y difuso de células grandes [105], LLC células-B [46] y, más recientemente, en el cáncer pulmonar y de mama [97, 98]. *MiR-155* es también parte del patrón común de seis cánceres sólidos [100] y ha estado ligado a la progresión temprana de la enfermedad [103] y pobre supervivencia en el cáncer de pulmón [97]. Constinean *et al.* [114] han mostrado recientemente en un modelo murino transgénico que la sobreexpresión selectiva de *miR-155* en células B induce la proliferación policlonal temprana de células B seguida por leucemia pre-B–linfoma alto grado. Esta es la primera evidencia de que un miR por sí mismo puede inducir una enfermedad neoplásica. El hecho de que este miR esté también sobreexpresado y asociado con el pronóstico en cánceres sólidos sugiere una función oncogénica más amplia que la diferenciación celular-B, y podría indicar que uno (o más) de sus dianas es (son) un gen (genes) importantes ligados a un proceso fundamental que está perdido comúnmente en todos los cánceres sin tener en cuenta su origen.

Voorhoeve *et al.* [119] desarrollaron una librería de vectores de expresión que contenía la mayor parte de los miRs humanos clonados y buscaron los miRs que cooperaran con oncogenes en la transformación celular [119]. Identificaron dos miRs, *miR-372* y *miR-373*, que inducen proliferación y tumorigénesis de las células humanas primordiales en cooperación con *RAS* mediante la neutralización de la onco-proteína p53 salvaje (*TP53*) a través de inhibición directa de la expresión del gen *LATS2*. Encontraron que este mecanismo participa en la oncogénesis de los tumores testiculares humanos

de células germinales, permitiendo el crecimiento por la vía de señalización de *p53* [119].

También hay pruebas de que *miR-21* funciona como un oncogén. Este miR está sobrerregulado en el glioblastoma [99], el cáncer de páncreas [100] y el de mama [98]. La eliminación de *miR-21* en células de glioblastoma cultivadas provoca la activación de las caspasas y conduce a un incremento de la muerte celular apoptótica [120].

Así, de manera general, el estudio de los miARNs provee indicios sobre vías que están trastornadas o activadas ectópicamente en el cáncer y puede ofrecer novedosas dianas potenciales para el tratamiento.

1.3.- LA HIPERMETILACIÓN DE LAS ISLAS CpG DE LOS MICROARNs SUPRESORES TUMORALES EN EL CÁNCER.

1.3.1.- El trastorno epigenético de los microARNs en el cáncer

En el cáncer, el silencio transcripcional debido a mecanismos epigenéticos es una de las alteraciones más importantes. La hipermetilación del ADN de los genes supresores tumorales, la hipometilación genómica global y las modificaciones aberrantes de las marcas de las histonas son las tres alteraciones epigenéticas más relevantes asociadas a la transformación maligna [121]. Por tanto, cabe especular que los miRs con características supresoras tumorales podrían experimentar silenciamiento en su función causada por la metilación aberrante del ADN acompañada por modificaciones de las histonas.

Se han tomado dos enfoques para el estudio de la metilación del ADN de los miRs. La primera estrategia está basada en el desenmascaramiento farmacológico de los miRs metilados. Se ha observado que el 5% de los miRs humanos se sobre-expresan en las células del cáncer vesical tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina y el ácido 4-fenilbutírico (ABP), un inhibidor de HDAC. Diecisiete miRs se sobre-expresaron

más de tres veces respecto a los niveles basales después del tratamiento, y de éstos, *miR-127* fue el que se sobre-expresó de forma más diferencial. Este miR está embebido en una isla CpG y el tratamiento induce una potente expresión de dicho miR asociada al descenso de los niveles de metilación del ADN alrededor de la región promotora del gen, mientras que el proto-oncogen *BCL-6*, una diana potencial de *miR-127*, está infrarregulado después del tratamiento [122].

Además, *miR-127* está localizado en el cromosoma 14q32, una región de pérdida de heterocigosidad en tumores sólidos e implicada en varios tipos de traslocaciones en hemopatías. Esto apoya la hipótesis de que *miR-127* es un auténtico gen supresor tumoral [123]. Este trabajo revela un miR que está metilado en tejidos tumorales. Así, se sugiere el uso de drogas epigenéticas para reactivar la expresión de *miR-127* y su actividad supresora tumoral a través de la represión de *BCL6* [122].

El segundo enfoque implica un modelo genético [124]. Se emplea una línea celular en la cual DNMT1 y DNMT3b, las dos principales ADN-metiltransferasas, han sido modificadas por recombinación homóloga. Estas células muestran una reducción drástica de la actividad de las DNMTs y del contenido de 5-metilcitosina lo que provoca una liberación del silencio génico asociado con la hipermetilación de la islas CpG [125]. Después de comparar los niveles de expresión de los miRs en la línea celular sin actividad DNMT y en su tipo salvaje homólogo, 18 miRs estaban sobrerregulados significativamente. Entre ellos, *miR-124a*, *miR-373*, y *miR-517c* están metilados en las células tumorales, de una manera similar a *miR-127*. Los dos últimos miRs estaban también metilados en las células normales, mostrando metilación tisular-específica. Por el contrario, *miR-124a* no estaba metilado en tejidos normales y específicamente metilado en células tumorales, sugiriendo un papel supresor tumoral. Se demostró que la hipermetilación de la isla CpG es un mecanismo que puede explicar la infrarregulación específica de los miRs en el cáncer humano [124]. El silencio epigenético de *miR-124a* conduce a la activación de la *ciclina dependiente de cinasas-6 (CDK6)*, un auténtico factor oncogénico, y a la fosforilación del gen supresor tumoral del retinoblastoma (*Rb*) [124].

Usando un modelo similar, pero con distinto enfoque, se ha descrito un modelo diferente de metilación. El gen del miR humano *let-7a-3* está localizado en el cromosoma 22q13.31 y está asociado con una isla CpG. Después del análisis secuencial con bisulfito se encontró que este gen está fuertemente metilado en tejidos humanos normales pero hipometilado en algunos adenocarcinomas pulmonares. La hipometilación de *let-7a-3* permite la reactivación epigenética del gen e incrementa la expresión de *let-7a-3* en líneas celulares tumorales dando como resultado un aumento de la capacidad transformante y cambios oncogénicos en los perfiles de transcripción [126].

Otro dato interesante es que el silencio de *miR-124a* por metilación del ADN estaba acompañado por la ausencia de marcadores de cromatina abierta, tales como la AcH3, la AcH4 y la 3meK4H3 [124]. En adición, dichos marcadores se recuperaron tras la hipometilación del ADN ya sea por eliminación de la actividad DNMT o por el tratamiento con agentes desmetilantes [124].

Así, diferentes métodos epigenómicos se pueden emplear para desenmarañar los miRs metilados en el cáncer (**Figura 9**).

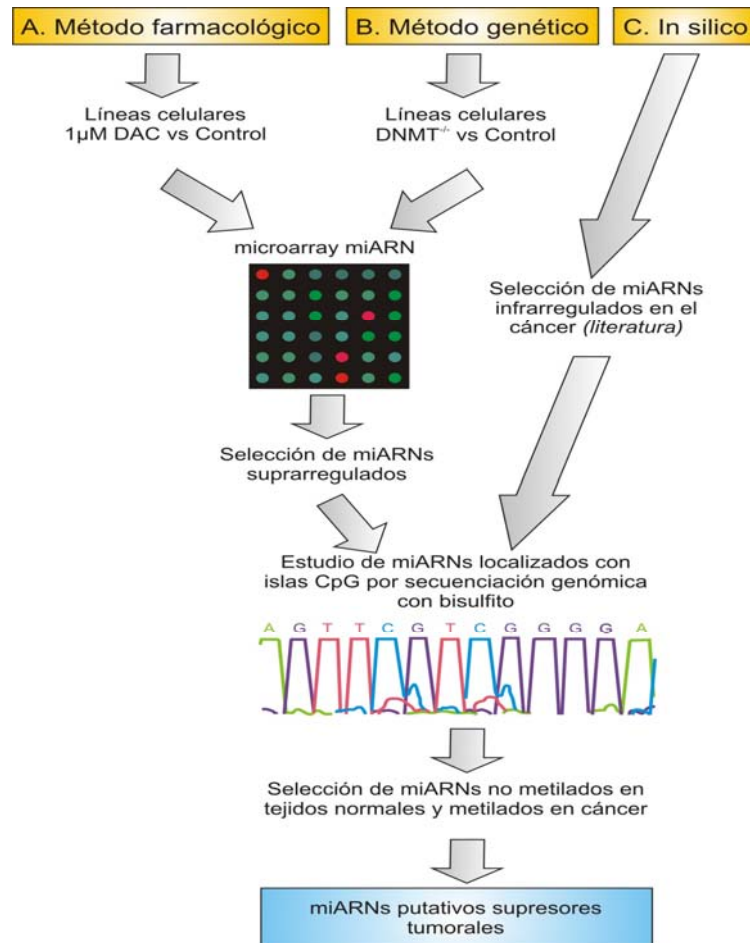


Figura 9. Métodos para encontrar islas CpG metiladas en miARNs en el cáncer.

(A) *Método farmacológico*. Este enfoque se basa en la extracción de ARN, antes y después del tratamiento con un agente desmetilante del ADN (DAC), seguido de análisis de expresión por microarrays del microARN. (B) *Método genético*. El procedimiento es similar, a diferencia de la materia prima, en el que se utiliza una línea celular con las ADN metiltransferasas modificadas. (C) *Modelo informático*. Este método se basa en el uso de herramientas bioinformáticas para colocalizar miARNs con islas CpG. La base de datos de información adicional, relacionada con los niveles de expresión de miARN en los tumores, puede ser muy útil.

El primer método consiste en el estudio farmacológico de los miRs que se basa en la capacidad que tienen las drogas epigenéticas, como la 5-aza-2'deoxicitidina, un agente desmetilante, y los inhibidores de las HDAC, de revertir el silencio mediado por la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas. Este tratamiento provoca la liberación de miRs metilados que pueden ser detectados por métodos de cuantificación de miRs como los

microarrays o la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los miRs sobrerregulados después del tratamiento e incrustados en una isla CpG se pueden estudiar por secuenciación genómica con bisulfito en la línea celular dada y los tejidos homólogos normales. La segunda estrategia está basada en un modelo genético en el que la metilación del ADN ha sido eliminada por la supresión de la actividad de las DNMTs. Como en el caso de las drogas epigenéticas, la hipometilación de miRs incrementa su expresión, que puede ser detectada por los métodos anteriormente mencionados. Finalmente, el tercer modelo está basado en el uso de herramientas bioinformáticas para encontrar los miRs empotrados en las islas CpG y que son susceptibles de metilación.

El estudio de células normales y tumorales ha permitido determinar que el modelo de metilación del ADN de los diferentes miRs es diverso y se parece al observado en las regiones 5'-reguladoras de los genes codificantes de proteínas (**Figura 10**). Los genes de los miRs pueden estar o no embebidos en las islas CpG, lo que determina la contribución de la metilación al estado transcripcional del miR. En este caso, los miRs pueden estar no metilados, tanto en tejidos normales como tumorales. Cuando el promotor de un miR está metilado en tejidos normales podemos hablar de metilación tisular-específica. Esta metilación puede estar mantenida en el cáncer, como en el caso del *miR-127* [122] o disminuida, como en el caso del *let-7a-3* [126,127]. En ambos casos, el significado funcional es el contrario. *MiR-127* parece actuar como un supresor tumoral y también su metilación está mantenida en el cáncer, mientras que se piensa que *let-7a-3* actúa como un oncogén, así que su desmetilación contribuiría al fenotipo tumoral. Finalmente, uno de los modelos más interesantes de metilación de ADN conocido por el campo biomédico es la metilación cáncer-específica, representada por el *miR-124a*, que no está metilado en tejidos normales y metilado de manera aberrante en el cáncer [124].

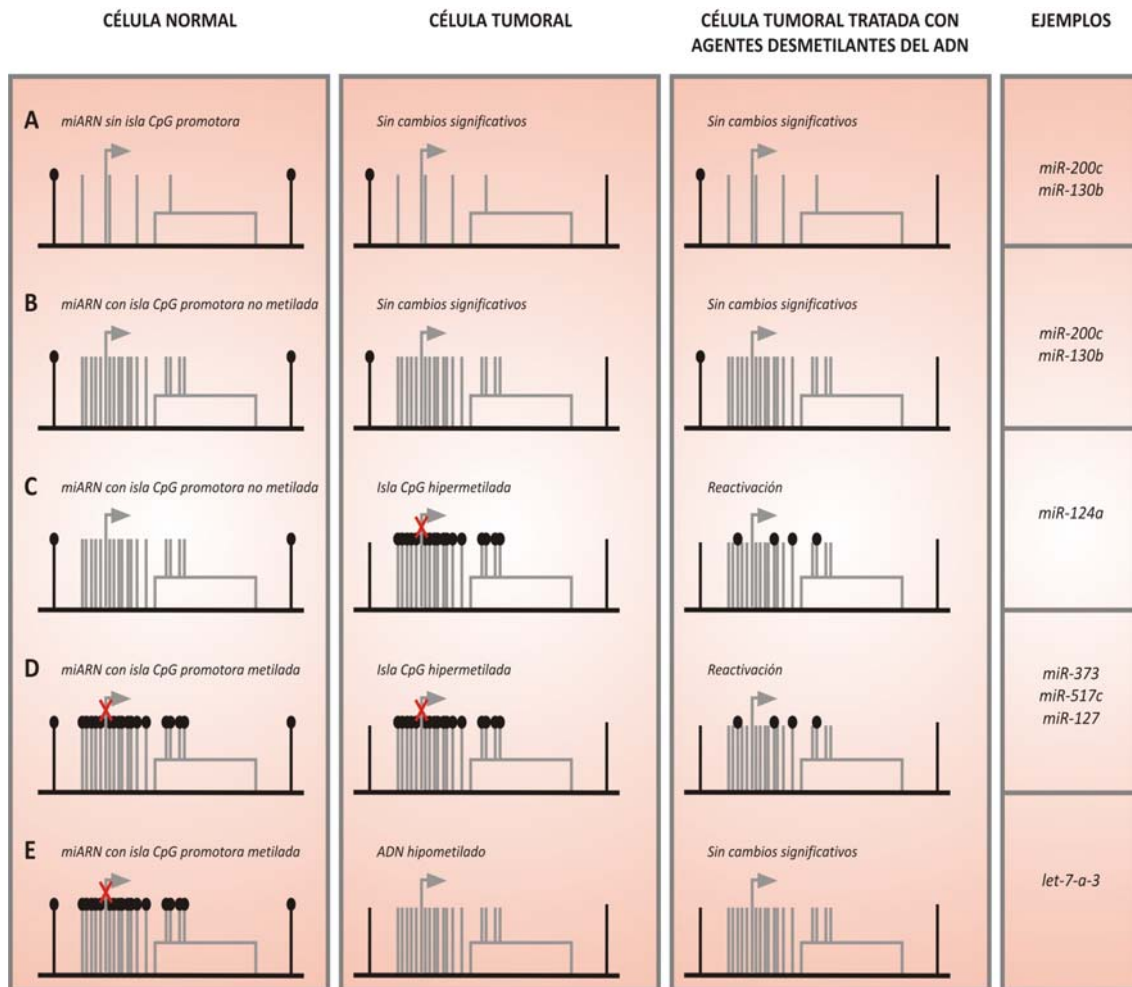


Figura 10. Repertorio de diferentes modelos de metilación en células normales y cancerígenas.

(A) miARNs que no se encuentran en una isla CpG podrían no estar muy influidos por los cambios de metilación del ADN. (B) miARNs situados en una isla CpG que no está metilada de manera normal ni en células tumorales. (C) Metilación tumor-específica. Los miARNs supresores tumorales, como miR-124a, no están metilados en células normales pero pueden sufrir metilación en las células cancerosas. Estos miARNs son susceptibles a la desmetilación por agentes desmetilantes de ADN, conduciendo a la expresión del miARN y a la infrarregulación de las dianas oncogénicas. (D) Metilación tisular-específica sin cambios en las células neoplásicas. La isla CpG del miARN está metilada tanto en las células normales como en las tumorales, tal como miR 127. Al igual que con los miARNs metilados tumor-específicos, estos miARNs se pueden reactivar mediante drogas epigenéticas. (E) Metilación tisular-específica perdida en las células tumorales que podría estar relacionada con la actividad oncogénica.

El estudio de este último modelo de metilación de ADN puede ayudarnos a descubrir nuevos miRs con papeles supresores tumorales desconocidos en el cáncer [122], y nos proveerá de nuevas y excelentes dianas para los agentes desmetilantes [128,129].

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el diagnóstico más frecuente en la oncología pediátrica [1]. Los estudios citogenéticos revelan una amplia variedad de translocaciones que afectan a esta enfermedad, las cuales pueden disregular un gen intacto por disrupción o eliminación y sustitución de los elementos de control genético; o crear un nuevo gen de fusión. Las translocaciones cromosómicas constituyen de forma inequívoca un paso oncogénico importante y los genes alterados estructuralmente por ellas desempeñan papeles cruciales en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y transcripción génica [4]. Aunque estas alteraciones cromosómicas pueden servir como marcadores en el diagnóstico y pronóstico y para monitorizar la enfermedad mínima residual, recaída precoz y respuesta al tratamiento, se detectan solamente en bajos porcentajes de determinados subtipos morfológicos de LLA [5]. Más aún, los oncogenes y genes supresores de tumores que se encuentran frecuentemente alterados en tumores sólidos, tales como *p53* o *RAS*, están raramente mutados en la LLA [6]. Además de estos cambios genéticos, el silencio epigenético de genes relacionados con tumores, debido a metilación, ha aparecido recientemente como uno de las alteraciones genéticas básicas en el desarrollo del cáncer y constituyen eventos patogénicos esenciales en la LLA [13].

Los miARNs, conforman un nuevo grupo de genes que en la mayoría de los casos se localizan en regiones intergénicas e intrónicas del genoma, dando lugar a pequeñas moléculas de ARN no codificantes de cadena simple, con una longitud de unos 21-25 nucleótidos y regulan negativamente la expresión de genes codificantes a nivel post-transcripcional. Los miARNs están codificados por genes que inicialmente se transcriben como parte de una larga molécula de ARN (≈ 1000 pb) denominada pri-miARN. Este pri-miARN sufre un primer procesamiento en el núcleo y en el citoplasma es procesado dando lugar al miARN maduro de unos 21-25 nucleótidos. El miARN maduro es incorporado al complejo RISC, complejo que induce un silenciamiento del ARN, el cual dirige al miARN hacia sus genes diana. En el caso que el miARN presente una total complementariedad con el ARNm de su gen diana, debido a que uno de los componentes del complejo RISC es la helicasa AGO2, dará

como resultado la degradación del ARNm diana. Pero en la mayoría de los casos, esta complementariedad no suele ser perfecta y la regulación negativa del gen diana suele producirse por una inhibición de la traducción del ARNm diana a su proteína [91,116].

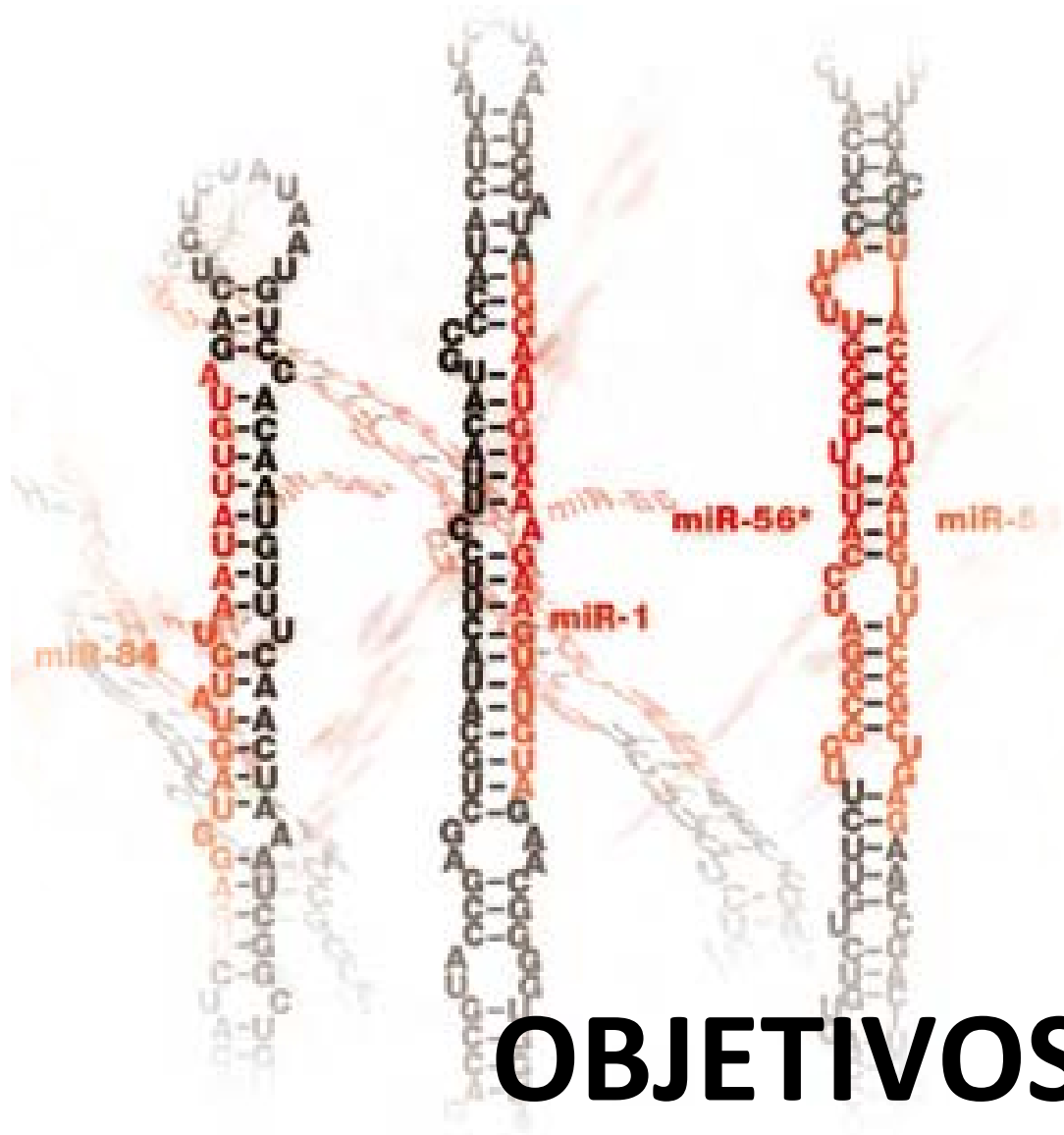
En distintos estudios se ha estimado que el genoma humano contiene alrededor de 1000 miARNs, estando la mayoría de ellos conservados durante la evolución. Un estudio realizado por *Calin GA* y colaboradores indica que el 50% de estos miARNs, se localizan en regiones frágiles del genoma asociados con cáncer, indicando que los miARNs pueden jugar un importante papel en el desarrollo y progresión tumoral [77]. En la actualidad se conoce la función de un número muy reducido de miARNs humanos, la mayoría de ellos relacionados con procesos neoplásicos en los que los miARNs participan como genes supresores de tumores u oncogenes.

La disminución de la expresión de miARNs en diversos tipos de neoplasias, vista en una serie amplia de estudios, sugiere que muchos de ellos pueden funcionar como potenciales genes supresores de tumores en las mismas. Una posible explicación de esta alteración en la expresión es la existencia de un fallo en la regulación post-transcripcional de estos miARNs en las células tumorales. Sin embargo, otros mecanismos adicionales pueden estar implicados.

Ya que el silencio transcripcional de numerosos genes supresores de tumores es dependiente de la metilación de su promotor, cabe pensar que dicho mecanismo epigenético también puede estar implicado en la regulación de los miARNs en las neoplasias humanas [130]. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito recientemente la reinstauración de la expresión del *miR-127* en células tratadas con agentes desmetilantes [122] así como la ausencia de expresión de *miR-124a* en cáncer de colon debido a la hipermetilación de su isla CpG [124].

Puesto que los miARNs actúan como genes supresores de tumores que pueden estar regulados epigenéticamente en las neoplasias y nuestro grupo ha demostrado que la metilación del ADN es la vía principal de inactivación de genes supresores y relacionados con el cáncer en la LLA, se establece la

hipótesis de que la regulación epigenética mediada por modificación de las histonas y metilación del ADN de estos miARNs pudiera contribuir a la patogénesis y pronóstico de la LLA.



OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO:

1.- *Determinar la validez para identificar microARNs regulados epigenéticamente en la LLA de una metodología secuencial basada en el análisis a gran escala de la modificación de las histonas, el análisis específico de la metilación de la isla CpG de cada microARN y la expresión de los mismos.*

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1.- *Estudio del papel de la metilación de islas CpG en la regulación de la expresión de miARNs en pacientes con LLA.*

2.- *Establecer perfiles de metilación de miARNs para relacionarlos con las características clínicas, respuesta al tratamiento y pronóstico de los pacientes con LLA.*

3.- *Identificación de genes dianas de los miARNs regulados epigenéticamente en la LLA que podrían contribuir a su patogénesis y constituir dianas para la terapéutica.*



PACIENTES Y MÉTODOS

4.1.- LÍNEAS CELULARES Y PACIENTES.

Estudiamos seis líneas celulares derivadas de LLA (TOM-1, NALM-20, MY, LOUCY, MOLT-4, Y TANOUE) y 353 pacientes consecutivos (210 hombres; 143 mujeres) con LLA *de novo* que fueron asignados a sucesivos estudios multicéntricos del *Programa Español para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas* (PETHEMA). Los pacientes fueron remitidos al Hospital Reina Sofía de Córdoba, España, desde Enero de 1989 a Diciembre de 2006. La mediana de edad en la población de estudio fue de 15 años (rango, 0'3 a 82 años). De éstos, 179 eran niños (mediana de edad, 5 años; rango, 0'3 a 14 años) y 174 adultos (mediana de edad, 29 años; rango, 15 a 82 años). El estudio fue aprobado por la comisión de ética e investigación clínica del Hospital Reina Sofía. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del paciente o de los tutores de los mismos. El diagnóstico fue establecido de acuerdo con los criterios morfológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos y citogenéticos habituales. Se estratificaron los pacientes según el riesgo de acuerdo al protocolo terapéutico usado y fueron asignados al protocolo vigente para LLA del grupo PETHEMA. Para los análisis estadísticos, los niños se agruparon también de acuerdo a los criterios de clasificación según el riesgo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) [131]. Los protocolos específicos de tratamiento PETHEMA en los cuales se enrolaron estos pacientes fueron: LLA-89 (n = 51), LLA-93 (n = 256), y LLA-96 (n = 46). El diseño y resultados de estos protocolos de tratamiento han sido previamente publicados [132-137]. Ciento veintisiete pacientes recayeron. Sesenta pacientes recibieron un trasplante de precursores hematopoyéticos (13 autólogo, 47 alogénico) en la primera (n = 35) o segunda remisión completa (RC; n = 25). Hay 175 pacientes vivos actualmente. Las características clínicas de los pacientes están enumeradas en la **Tabla 3**. Alguno de estos pacientes (n = 272) fueron previamente analizados para la metilación de 27 genes relacionados con el cáncer con objeto de determinar el fenotipo metilador de las islas CpG (CIMP) [32,33].

Tabla 3.- Características clínicas del grupo de pacientes

CARACTERÍSTICAS	VALOR N	CARACTERÍSTICAS	VALOR N
Edad		Tratamiento	
< 15 años	179	PETHEMA 89	51
> 15 años	174	PETHEMA 93	256
Sexo (M/F)	210/143	PETHEMA 96	46
Leucocitos		TPH	60
< 50 x 10 ⁹ /L	242	Mejor Respuesta	
> 50 x 10 ⁹ /L	111	RC	314
Clasificación FAB		Anormalidades Citogenéticas/Moleculares	
L1	135	BCR-ABL	81
L2	203	t(1;19)	6
L3	15	11q23	2
Línea Blástica		MYC	5
Célula B	287	7q35-14q11	5
Célula T	66	TEL-AML1	56
Grupos de Riesgo NCI		Normal	183
Estándar	128	Otras	4
Pobre	51	NT	11
Grupos de Riesgo PETHEMA		Recaída	127
Estándar	128	Muerte	178
Pobre	225		

4.2.- INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA E INMUNOPRECIPITACIÓN-ON-CHIP DE CROMATINA.

Linfocitos de sangre periférica de donantes sanos y de las líneas celulares TOM-1 y NALM-1 fueron sometidos a inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (**Figura 11**) con el fin de evaluar la trimetilación de la lisina 4 de la Histona 3 (K4H3me3, marca de cromatina abierta) y la dimetilación de la lisina 9 de la H3 (K9H3me2, marca de cromatina cerrada). Veinte millones de linfocitos de sangre periférica procedentes de cuatro donantes sanos y células de las líneas celulares LLA, TOM-1 y NALM-20 fueron entrecruzados con 1% de formaldehído durante 10 minutos. Posteriormente, se utilizó glicina 0,125 M para revertir el entrecruzamiento. La ChIP se llevó a cabo tal y como ha sido descrita por diversos autores incluyendo nuestro grupo [138,139]. Adquirimos de Abcam (Cambridge, MA) anticuerpos contra la trimetil-K4H3 (K4H3me3, ab8580) y dimetil-K9H3 (K9H3me2, ab1220). Se utilizaron las fracciones de

cromatina inmunoprecipitada (ChIP) tanto para el análisis ChIP-on-Chip como para el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa. Para el análisis ChIP-on-chip, se amplificaron 20 ng de las fracciones de ADN inmunoprecipitado de los experimentos ChIP usando el Kit *GenomePlex Complete Whole Genome Amplification* (Sigma, St Louis, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un μ g de ADN amplificado de donante sano y las fracciones de líneas celulares de LLA fueron procesados de acuerdo con el protocolo *Agilent array-based comparative genomic hybridization (CGH)* e hibridados en el *Agilent Human CpG Island microarray* (Agilent Tchs, Santa Clara, CA). Las fracciones ChIP de las líneas celulares de LLA fueron marcadas con Cy5 (rojo) y las fracciones de donantes sanos con Cy3 (verde). El ADN marcado de cada línea celular de LLA y las muestras de donante sano fueron mezclados e hibridados en el microarray de Agilent el cual contiene 27.800 islas CpG [140]. Se realizaron lavados de poshibridación tal y como se ha publicado previamente anteriormente [141]. Los portaobjetos lavados fueron escaneados utilizando un Scanner de Agilent (G2565BA [G25053]) y las imágenes en formato tif adquiridas del microarray fueron medidas y evaluadas con el programa *Feature Extraction v9.5* (Agilent Tchs). Se realizaron hibridaciones por duplicado para cada anticuerpo. De entre las 27.800 islas CpG incluidas en el microarray de Agilent, 78 de ellas englobaban genes miARN o estaban localizadas en su vecindad (menos de 500 pb en dirección 5'). Se definieron las marcas de la disminución de K4H3me3 o del aumento de K9H3me2 en todas las líneas celulares de LLA con el valor relativo de $\pm 0,4$ respectivamente.

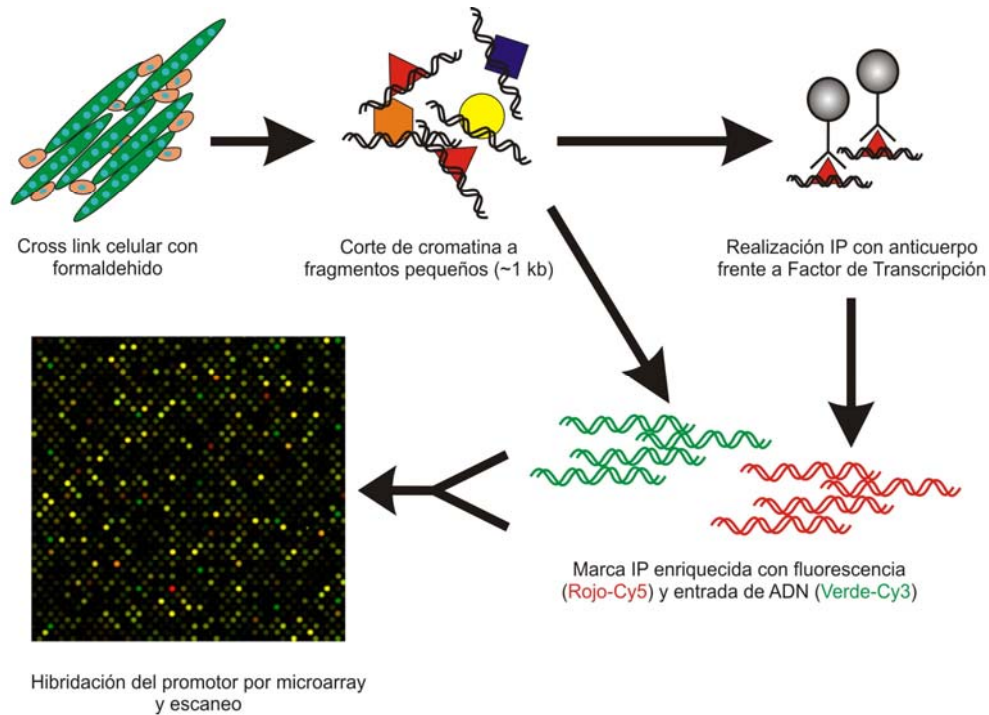


Figura 11. Resumen de la técnica de Inmunoprecipitación-on-Chip de Cromatina

4.3.- CHIP DE GEN SIMPLE USANDO PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.

La ChIP (**Figura 12**) fue llevada a cabo del mismo modo que la ChIP-on-chip. Las muestras de ADN fijado al anticuerpo y la cromatina total (input) fueron analizadas con una PCR en tiempo real utilizando SYBR green para su detección y la plataforma LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Se diseñaron cebadores para estudiar las regiones alrededor de las islas CpG de los genes miARN seleccionados. Las secuencias de primers están expuestas en la **Tabla 4**. Se utilizó la amplificación de la fracción de inmunoprecipitación (IP) como secuencia diana. Se aplicaron las siguientes condiciones de programa para la realización de la PCR cuantitativa en tiempo real: programa de desnaturalización, consistente en un ciclo a 95°C, durante 10 minutos; programa de amplificación, consistente en 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 10 segundos y 72°C durante 10 segundos; programa

de disociación (melting) consistente en un ciclo de 95°C durante 0 segundos, 40°C durante 60 segundos y 90°C durante 0 segundos; y programa de enfriado con un ciclo de 40°C durante 60 segundos. El índice de transición de la temperatura fue de 20°C/s, excepto en el programa de disociación que fue de 0,2°C/s entre 40°C y 90°C. Se realizó una amplificación del ADN de entrada (In) como secuencia de referencia. Fue amplificada en la misma serie y siguiendo el mismo procedimiento descrito más arriba para el IP. Se utilizó un procedimiento basado en la cuantificación relativa de la secuencia diana (IP) contra sus controles/calibradores en relación a la secuencia de referencia (In) para evaluar los niveles de las marcas de histonas diferentes. Los cálculos fueron realizados automáticamente por el software LightCycler (RealQuant, versión 1.0, Roche). El índice normalizado se obtuvo a partir de la siguiente ecuación y fue expresada como porcentaje del control/calibrador:

$$\text{Índice normalizado (N)} = (E_{\text{diana}})^{\Delta C_p \text{ diana (control-muestra)}} \div (E_{\text{ref}})^{\Delta C_p \text{ ref (control - muestra)}}$$

Las Eficiencias (E) de cada gen fueron calculadas a partir de las pendientes de los puntos de cruce (Cp) contra el diagrama de concentración de ADN, según la fórmula $E=10(-1/\text{pendiente})$. La ΔC_p correspondía a la diferencia entre la Cp del control/calibrador y la Cp de la muestra, tanto para la secuencia diana como para la secuencia de referencia. El control/calibrador seleccionado fue los linfocitos de los donantes sanos. Fueron considerados como 100%.

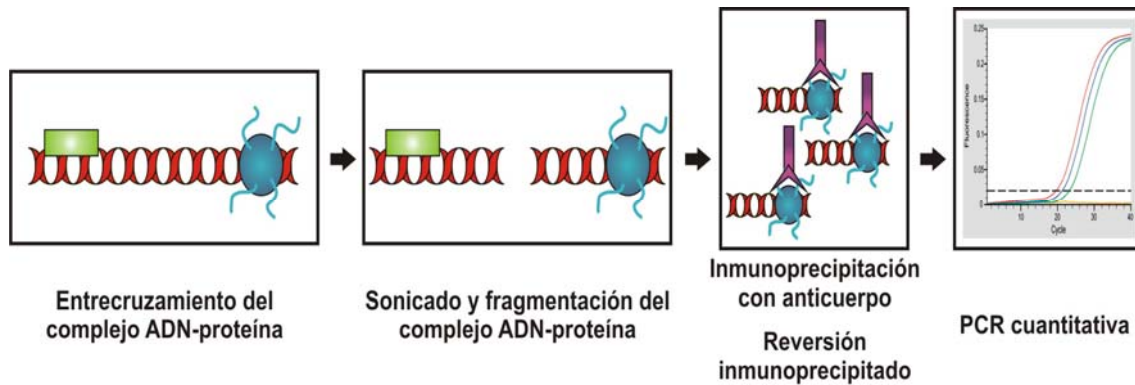


Figura 12. Resumen del ChIP-PCR-cuantitativo

4.4.- PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP) PARA miARNs.

Se obtuvieron muestras de médula ósea de todos los pacientes en el momento del diagnóstico. Se preparó el ADN de alto peso molecular a partir de células mononucleares de la médula ósea utilizando métodos convencionales. El ADN fue congelado a -80°C y analizado retrospectivamente para evaluar el papel del perfil de metilación. En todos los casos, la muestra de médula ósea obtenida en el diagnóstico contenía células blásticas en un índice de al menos 70%. La metilación anormal de los miARNs seleccionados fue determinada por el método de MSP tal y como fue descrito por *Herman et al* [142]. Después del tratamiento del ADN con bisulfito sódico, se realizó una PCR “hot start” durante 30 ciclos que consistían en la desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, seguido de una extensión de 7 minutos para todas las parejas de cebadores. En la **Tabla 4** se describen las secuencias de cebadores de cada miARN para las reacciones no metiladas y metiladas. Los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Los linfocitos de la medula ósea y periféricos de los donantes sanos fueron utilizados como control negativo para los ensayos específicos de metilación. Un ADN genómico humano de varón universalmente metilado para todos los genes (IntergenCompany, Purchase, NY) se utilizó como control positivo para los alelos metilados. Se incluyeron muestras negativas blancas de agua en cada análisis. Los resultados fueron

siempre confirmados repitiendo los análisis MSP después de un tratamiento de bisulfito realizado de forma independiente.

4.5.- PCR SEMICUANTITATIVA EN TIEMPO REAL ESPECÍFICA DE METILACIÓN DE HSA-MIR-124a2.

Se realizó una PCR en tiempo real como se ha descrito previamente por nuestro grupo [49,143-145] en un termociclador rápido de detección de fluorescencia con capacidad de monitorización de 3 colores de fluorescencia (LightCycler, Roche), utilizando 1 µl de ADN modificado con bisulfito sódico en un volumen de reacción de 10 µl con 0,4 µmol/L de cada cebador, y 1µL de *10x LightCycler FastStar DNA Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals). La concentración final de Mg^{2+} en la mezcla de reacción fue ajustada a 3,5 mmol/L. La amplificación de las secuencias metiladas del *hsa-miR124a2* se utilizaron como secuencia diana (**Tabla 4**). Se realizó la amplificación de una secuencia repetitiva *Alu* que no es modificada por el tratamiento con bisulfito sódico como secuencia de referencia (**Tabla 4**). Los índices normalizados de la metilación de *hsa-miR124a2* fueron calculadas como se describe más arriba para la PCR cuantitativa en tiempo real de ChIP de gen simple. El control/calibrador seleccionado fue los linfocitos de los donantes sanos. Se consideró como 100% (no es un valor absoluto que indique un paciente totalmente metilado sino un valor relativo utilizado como una medida para el nivel relativo de la metilación de *hsa-miR-124a2* en la muestra particular).

Basado en estos prerequisites y para determinar el valor de corte para la metilación alterada de *hsa-miR124a2* en las muestras de LLA, cuantificamos por medio de una MSP *en tiempo real* cuantitativa el estado de metilación de la isla CpG de *hsa-miR-124a2* en 30 donantes sanos. Los índices normalizados estaban comprendidos entre el 65% y el 100% ($85\% \pm 15\%$). Un índice normalizado de 130% o mayor (determinado como la media más 3 SD) fue

elegido para definir la hipermetilación de *hsa-miR-124a2* en las muestras de ADN de LLA.

Tabla 4.- Primers usados en este estudio.

GENES	TÉCNICA	PRIMERS	PRIMERS
<i>Hsa-miR-9-1</i>	MSP	MIR-9-1-MD	5'- ATCGAAAGTAAAAATAATTTTATATATTGC -3'
		MIR-9-1-MR	5'- CTAATACTAATCAATCCTCGCGAC -3'
		MIR-9-1-UMD	5'- ATTGAAAGTAAAAATAATTTTATATATTGT -3'
<i>Hsa-miR-9-2</i>	MSP	MIR-9-1-UMR	5'- TCTAATACTAATCAATCCTCACAAC -3'
		MIR-9-2-MD	5'- TATTAGTACGGAGGAGGTAAAAGGTC -3'
		MIR-9-2-MR	5'- CCTACTACCCGAACAACGAC -3'
<i>Hsa-miR-9-3</i>	MSP	MIR-9-2-UMD	5'- TTATATTAGTATGGAGGAGGTAAAAGGTT -3'
		MIR-9-2-UMR	5'- CCTACTACCCAAACAACAAC -3'
		MIR-9-3-MD	5'- TTGGTCGATTTTTGGATTGAC -3'
<i>Hsa-miR-10b</i>	MSP	MIR-9-3-MR	5'- CGCTTAAAAAACCTCGAACG -3'
		MIR-9-3-UMD	5'- ATGGTTGATTTTTGGATTGATG -3'
		MIR-9-3-UMR	5'- AAACACTTAAAAAACCTCAAACACC -3'
<i>Hsa-miR-34b/c</i>	MSP	MIR-10B-MD	5'- CGTTGTTTATATATATTTTTGTAGAATCGA -3'
		MIR-10B-MR	5'- GACTACTTCTAATCTCCATATCGCA -3'
		MIR-10B-UMD	5'- AATGTTGTTTATATATATTTTTGTAGAATTG -3'
<i>Hsa-miR-124a1</i>	MSP	MIR-10B-UMR	5'- AACTACTTCTAATCTCCATATCACA -3'
		MIR-34-MD	5'- GTTCGTTGGTTTAGTTACGC -3'
		MIR-34-MR	5'- GACTACAACCTCCGAACGAT -3'
<i>Hsa-miR-124a2</i>	MSP	MIR-34-UMD	5'- GTTTGTTGGTTTAGTTATGTGT -3'
		MIR-34-UMR	5'- CAACTACAACCTCCAAACAAT -3'
		MIR-124A1-MD	5'- AAAGAGTTTTTGGAAAGACGTC -3'
<i>Hsa-miR-124a3</i>	MSP	MIR-124A1-MR	5'- AATAAAAAACGACGCGTATA -3'
		MIR-124A1-UMD	5'- AATAAAGAGTTTTTGGAAAGATGT -3'
		MIR-124A1-UMR	5'- AAAAAAATAAAAAACAACACATATAC -3'
<i>Hsa-miR-132/212</i>	MSP	MIR-124A2-MD	5'- GGTAATTAATTTGGATTTACGTC -3'
		MIR-124A2-MR	5'- ACCGCTATTAATTAATCTATTCCG -3'
		MIR-124A2-UMD	5'- GGGGTAATTAATTTGGATTTATGTT -3'
<i>Hsa-miR-196b</i>	MSP	MIR-124A2-UMR	5'- AAAACCACTATTAATTAATCTATTCCA -3'
		MIR-124A3-MD	5'- GCGAGGATTTTACGTAAGTTC -3'
		MIR-124A3-MR	5'- CCGCGTACCTTAATTATATAA -3'
<i>Hsa-miR-203</i>	MSP	MIR-124A3-UMD	5'- GGGTGAGGATTTTATGTAAGTTT -3'
		MIR-124A3-UMR	5'- TTCACCACATACCTTAATTATATAAAC -3'
		MIR-132-MD	5'- TTCGTTTTTTTTGCGTTTTTC -3'
<i>Hsa-miR-203</i>	MSP	MIR-132-MR	5'- CCCCTCTAAAACATCTTAAACGTC -3'
		MIR-132-UMD	5'- TGTTTTGTTTTTTTTGTGTTTTTG -3'
		MIR-132-UMR	5'- ACCCCCTCTAAAACATCTTAAACAT -3'
<i>Hsa-miR-203</i>	MSP	MIR-196B-MD	5'- GAGGTTGTATCGTAGGTTTGGTAC -3'
		MIR-196B-MR	5'- TTATTTAAATCCACCTTCTCTCGA -3'
		MIR-196B-UMD	5'- GGTTGTTATTGTAGGTTTGGTATGA -3'
<i>Hsa-miR-203</i>	MSP	MIR-196B-UMR	5'- TATTTAAATCCACCTTCTCTCAAC -3'
		MIR-203-MD	5'- GAGTATTTTCGGTTTAGACGAGAC -3'
		MIR-203-MR	5'- GAAAAAACCCTAACTCAACGAC -3'
<i>Hsa-miR-203</i>	MSP	MIR-203-UMD	5'- GAGTATTTTGGTTTAGATGAGATGG -3'
		MIR-203-UMR	5'- CAAAAAACCCTAACTCAACAAC -3'
		<i>Alu</i>	Qrt-MSP
<i>Hsa-miR-9-1</i>	ChiP	ALU-R	5'- ATTAACATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA -3'
		ALU-R	5'- ATTAACATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA -3'
<i>Hsa-miR-9-2</i>	ChiP	CHIP-9-1-D	5'- AGGACTGACCAGCACCAGAG -3'
		CHIP-9-1-R	5'- AACTCTGCTGGGGGAAAAAT -3'
<i>Hsa-miR-9-3</i>	ChiP	CHIP-9-2-D	5'- TAACGCTGCCGGAGATTACT -3'
		CHIP-9-2-R	5'- CTCTTGCCAGACTCCAGGTC -3'
<i>Hsa-miR-9-3</i>	ChiP	CHIP-9-3-D	5'- TGTGTCTGTCCATCCCCTCT -3'
		CHIP-9-3-R	5'- TGTGTCTGTCCATCCCCTCT -3'

<i>Hsa-miR-34b/c</i>	ChiP	CHIP-9-3-R	5'- GGCTCTGTGGCACTCATACA -3'
		CHIP-34-D	5'- CAGCTACGCGTGTGTGC -3'
		CHIP-34-R	5'- ACTGCCTACAAACCGAGCA -3'
<i>Hsa-miR-124a1</i>	ChiP	CHIP-124A1-D	5'- CAAAGAGCCTTTGGAAGACG -3'
		CHIP-124A1-R	5'- GGAAGAGGGGTGGGTAGAAG -3'
<i>Hsa-miR-124a2</i>	ChiP	CHIP-124A2-D	5'- GCGTGGTCCTTAAAAACCTG -3'
		CHIP-124A2-R	5'- CCATGCCATTTACAGCACAC -3'
<i>Hsa-miR-124a3</i>	ChiP	CHIP-124A3-D	5'- GGAGAAGTGTGGGCTCCTC -3'
		CHIP-124A3-R	5'- AATCAAGGTCGCTGTGAAC -3'

4.6.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE EXPRESIÓN PARA miARNs.

El ARN total fue extraído con Ultraspec (Biotecx, Houston, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies). Cinco ng de ARN total fueron utilizados para sintetizar un cADN específico de los diferentes miARNs utilizando un cebador con estructura en bucle para cada miARN específico según el protocolo de Ensayo TaqMan MicroARN (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de transcripción inversa contenían 1,5 µL del cebador en bucle específico y 6 µL de Master Mix compuesto de 5 ng de ARN, 1 x RT buffer, 0'25 mmol/L de cada dNTP, 3'33 U/µL de la transcriptasa inversa MultiScribe y 0'25 U/µL de inhibidor de ribonucleasa (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones con un volumen total de 7,5 µL fueron incubadas en un termociclador Perkin Elmer 2700 durante 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y posteriormente mantenidas a 4°C. La expresión de los diferentes miARNs fue analizada utilizando cebadores y sonda TaqMan específicos para cada miARN de acuerdo con el protocolo de Ensayo TaqMan MicroARN (Applied Biosystems). La PCR cuantitativa en tiempo real fue realizada en una plataforma LightCycler 2.0, utilizando 0'7 µL del producto RT de cada miARN en un volumen de reacción de 10 µL con 1 X Master mix PCR TaqMan Universal y 1µL de la mezcla de cebadores y sonda según el protocolo de Ensayo TaqMan MicroARN (PE Applied Biosystems). Las reacciones fueron incubadas a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60 grados durante 30 segundos. Los datos del ciclo umbral (Ct)

fueron determinados usando valores de umbral por defecto. El Ct es definido como el número fraccionario en el que la fluorescencia supera el umbral fijado. Se utilizaron ensayos de microARN TaqMan para los diferentes miARNs (Applied Biosystems). Las expresiones de los miARNs estudiados fueron normalizadas usando la expresión del gen *RNU6B* en cada muestra. Para la expresión *RNU6B* utilizamos un ensayo de RNU6B TaqMan (PN: 4373381; PE Applied Biosystems). Los índices normalizados de las expresiones de miARN fueron calculadas como anteriormente se describe para la PCR en tiempo real cuantitativa de gen simple ChIP. El control/calibrador seleccionado fue los linfocitos de medula ósea de un donante sano. Fue considerado como 100% de expresión para cada miARN.

4.7.- TRATAMIENTO CON EL AGENTE DESMETILANTE 5-AZA-2-DEOXCITIDINA.

Las líneas celulares TOM-1 y NALM-20 crecieron a una densidad de 600.000 células/ml en frascos de 25 cm² con 10 ml de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de suero fetal bovino y mantenido a 37°C en ambiente húmedo con un 5% de CO². Las líneas celulares fueron tratadas con 4 µmol/l de 5-Aza-2-deoxicitidina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 4 días. Después del tratamiento, se lavaron las células con buffer de fosfato salino (PBS), se precipitaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos y se usaron para el aislamiento de ADN genómico y ARN. El ADN fue extraído usando QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y el ARN total utilizando Ultraspec (Biotecx, Houston, TX) siguiendo las indicaciones del fabricante.

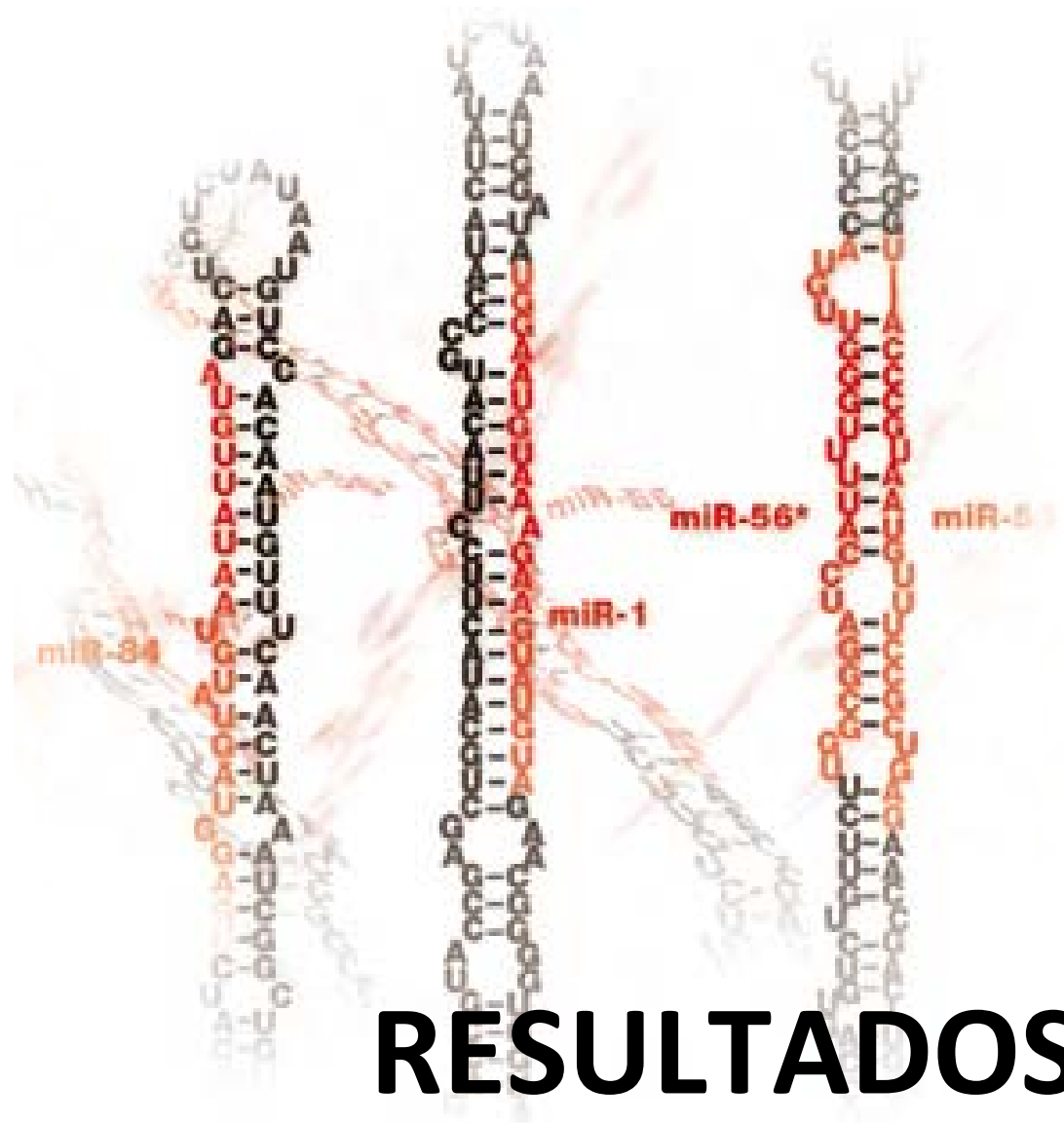
4.8.- DIANAS PREVISTAS Y CONFIRMADAS PARA CADA miARN.

Ya que la significación biológica de la desregulación del miARN recae en la alteración sus genes diana, analizamos los genes diana previstos para cada miARN metilado identificado en nuestra cohorte. El análisis fue llevado a cabo con el servidor miRGen (www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html), una herramienta online que obtiene conjuntos de genes dianas, previstos por los programas individuales, y presenta listas compiladas de la intersección de los algoritmos miRanda, TargetScan, DIANA-microT, miRBase, PicTar (cuatro modos), y PicTar (cinco modos). Debido a que cualquiera de las seis estrategias genera un número impredecible de falsos positivos, los resultados fueron cruzados para identificar los genes comúnmente previstos por al menos 5 de los algoritmos.

4.9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico, los pacientes con LLA se clasificaron en dos grupos diferentes de metilación: no metilado (ningún miARN metilado) y metilado (al menos, un miARN metilado). La justificación para agrupar los pacientes con algún gen metilado (a pesar del número de genes metilados) en el mismo grupo de metilación fue deducida después del análisis estadístico (tasa de recaída, tasa de mortalidad, supervivencia libre de enfermedad [SLE], y supervivencia global [SG]) de acuerdo con el número de genes metilados (de 0 a 10). Los resultados de estos análisis mostraron que el pronóstico para los pacientes no metilados era mejor que para los pacientes con genes metilados (incluyendo aquellos con un gen metilado únicamente). Además, el pronóstico de los pacientes con genes metilados en número de 1 a 10 fue similar con diferencias estadísticas no significativas. Los valores de P para las comparaciones de variables continuas fueron de dos colas y se basaron en el test de rango de suma de Wilcoxon. Los valores de P para las variables dicotómicas se fundamentaron en el test exacto de Fisher. Los restantes

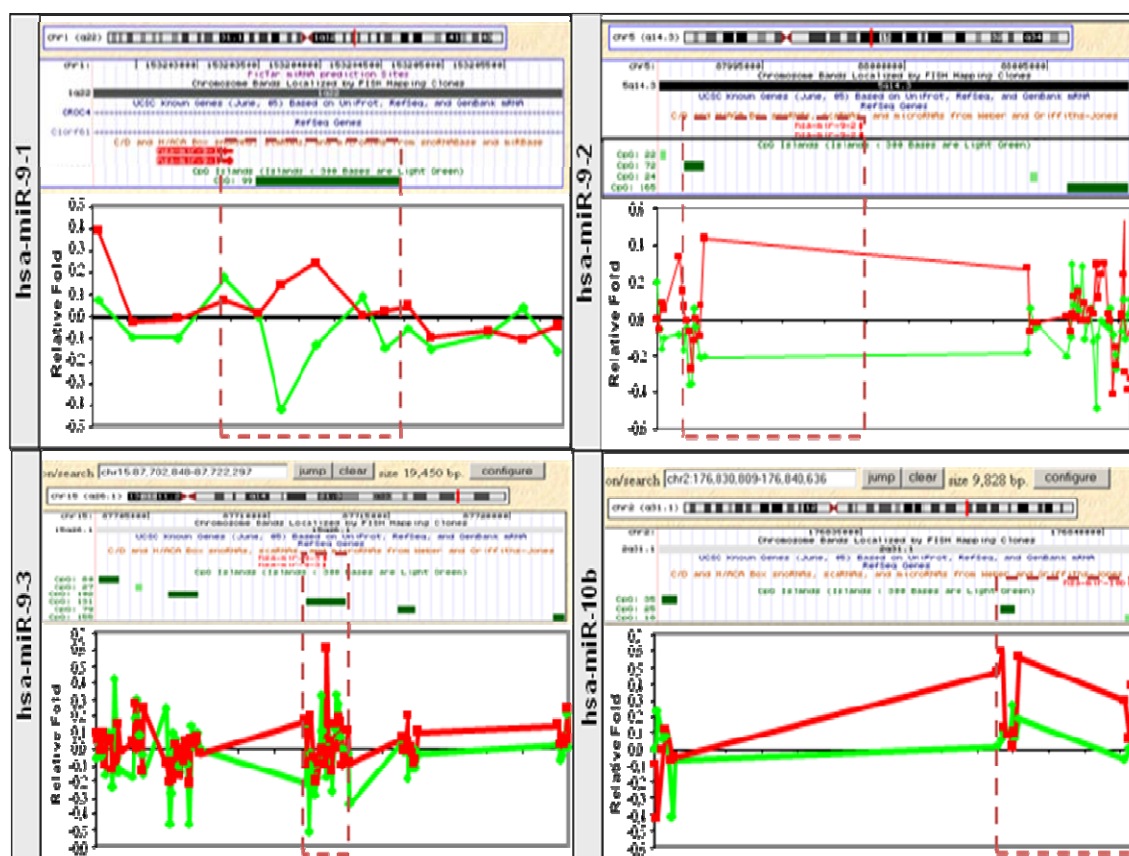
valores de P se basaron en el test χ^2 de Pearson. La supervivencia global (SG) se obtuvo desde el día del diagnóstico hasta la fecha de la muerte y fue censada sólo para aquellos pacientes que se encontraban vivos en el último seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calculó a partir de la fecha en la que el paciente alcanzó la Remisión Completa (RC) hasta la fecha de la primera recaída o muerte en primera RC. Para este análisis fueron censados, por lo tanto, los pacientes que permanecían vivos y en remisión durante el último seguimiento. Los pacientes que fueron sometidos a Trasplante de progenitores hematopoyéticos se incluyeron en el análisis pero fueron censados a la fecha del trasplante. La distribución de las curvas de la SG y la SLE se estimó mediante el método de Kaplan y Meier con un 95% de intervalo de confianza y se calculó mediante la media de la fórmula de Greenwood's. La comparación de la SG y la SLE entre grupos está basada en el test de log-rank. Los análisis univariante y multivariante (modelos de regresión logística) se utilizaron para determinar factores asociados a la SLE y SG. En primer lugar se realizó el análisis univariable, como un primer paso que permitiera decidir qué variables serían potencialmente incluidas en el análisis multivariable final. El criterio utilizado para la inclusión en el análisis multivariable de Cox era presentar un valor de p inferior a 0.1 en el análisis univariable. Sin embargo el límite del valor de p para la significación estadística no fue mayor de 0.05 en el modelo final. El seguimiento de los pacientes se realizó hasta Diciembre de 2007. Todos los pacientes han sido censados hasta este punto.

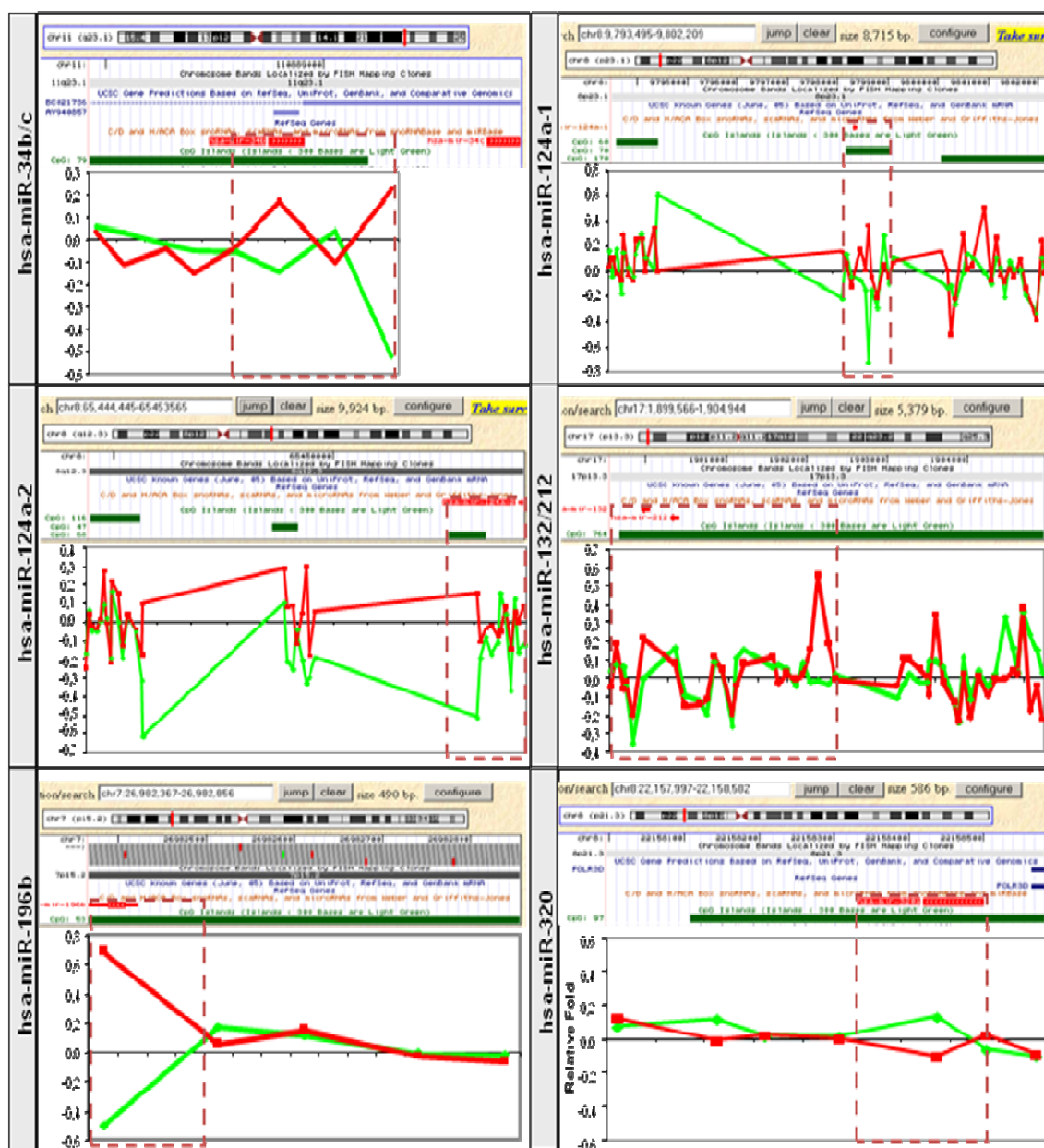


RESULTADOS

5.1.- LOS GENES MIRS PRESENTAN ALTERACIONES EN EL PATRÓN DE METILACIÓN DE LAS HISTONAS.

Comprobamos que 78 islas CpG del array comercial “*Agilent human CpG island microarray*” empleado para el análisis ChIP-on-Chip englobaban o se encontraban en la proximidad (a menos de 1Kb en dirección 5’) de un miARN. El análisis reveló que 13 de estas 78 islas CpG (*hsa-miR-9-1*, *-9-2*, *-9-3*, *-10b*, *-34b*, *-34c*, *124a1*, *-124a2*, *-124a3*, *-132*, *-196b*, *-203* y *-212*) mostraban una disminución de la marca de cromatina abierta K4H3me3 y/o un incremento de la marca de cromatina cerrada K9H3me2 en las muestras de líneas celulares de LLA respecto a los linfocitos de sujetos sanos (**Figura 13**).





■ K9H3me2 LLA vs LS ■ K4H3me3 LLA vs LS

Figura 13. Resultados del análisis ChIP-on-Chip de miARNs representativos embebidos o localizados cerca de las islas CpG.

En la parte superior de cada panel se muestran la estructura del cromosoma, los miARNs y la ubicación de la isla CpG. Las cajas azules indican la región de la isla CpG analizada mediante MSP en el caso de cada miRNA. Las variaciones relativas de K4H3me3 o K9H3me2 obtenidas en líneas celulares derivadas de LLA (TOM-1 and NALM-20) respecto a muestras de linfocitos sanos (LS) están representados en verde y rojo respectivamente en la parte baja de cada panel. El valor relativo "0" indica la cantidad de las marcas de las histonas analizados en las muestras de linfocitos sanos.

Estos resultados fueron posteriormente confirmados mediante ChIP cuantitativo específico por PCR en tiempo real (**Figura 14**). Todos estos miRNos vinculados a una estructura de cromatina cerrada fueron elegidos para su posterior análisis de metilación. Como gen control para el análisis epigenético estudiamos el *hsa-miR-320* que no estaba asociado con las marcas de cromatina cerrada (**Figura 13**).

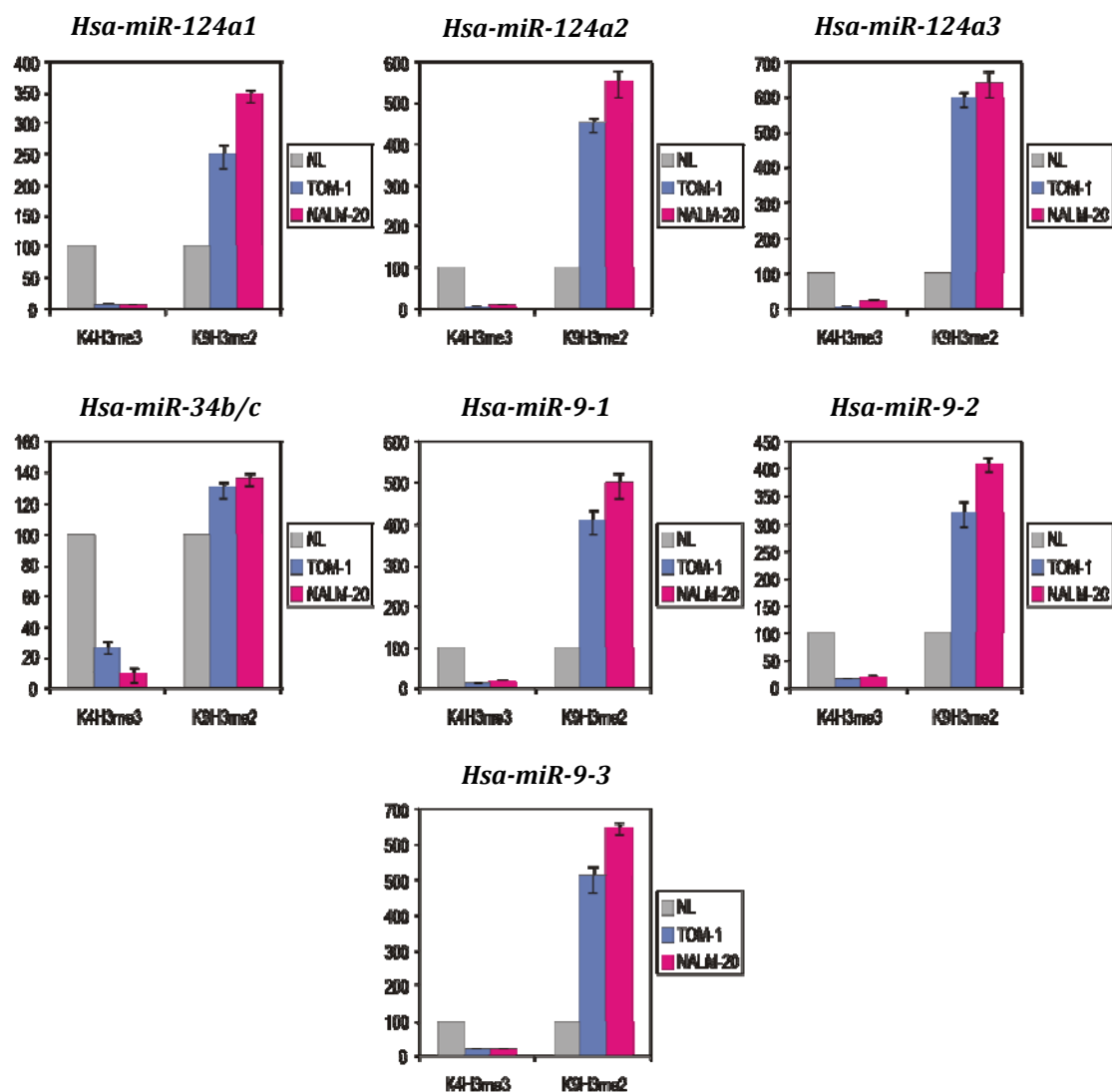
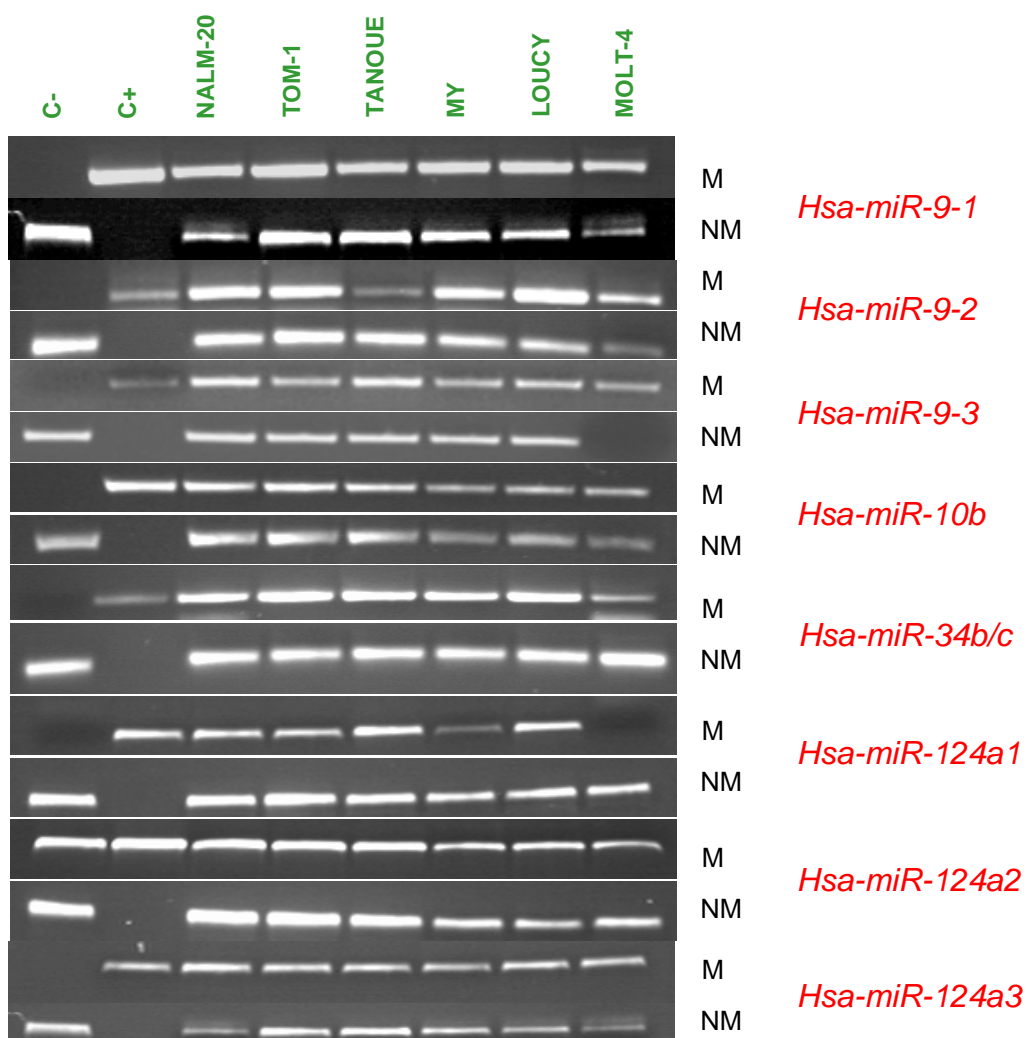


Figura 14. Resultados representativos del ChIP cuantitativo de gen sencillo de miARNs en las líneas celulares TOM-1 y NALM-20.

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo sobre el ChIP K4H3me3 / K9H3me2 y muestras de ADN de entrada. Las gráficas muestran la media \pm DS para tres experimentos separados, con cada PCR ejecutada por triplicado. Los niveles de cada marca de histona se normalizaron con los de los linfocitos sanos (NL, ratio normalizado = 100%).

5.2.- LA EXPRESIÓN DE MIRS EN LÍNEAS CELULARES DE LLA ESTÁ REGULADA POR HIPERMETILACIÓN DE ISLAS CPG.

Analizamos la expresión de nueve miARNs (todos los genes *hsa-miR-124a* originan un único transcrito maduro *hsa-miR-124a* y lo mismo ocurre con los genes *hsa-miR-9*) y el estado de metilación de 11 islas CpG asociadas con estos miRs (*hsa-miR-34b* y *-34c* están controlados por la misma isla CpG y lo mismo ocurre con los genes *hsa-miR-132* y *-212*) en las líneas celulares derivadas de LLA y en linfoblastos de los pacientes con LLA. Se observó metilación en la práctica totalidad de miRs en cada línea celular analizada pero no en los linfocitos sanos (**Figura 15**). Sin embargo, los linfocitos normales mostraron metilación fisiológica de *hsa-miR-124a2* (**Figura 15**).



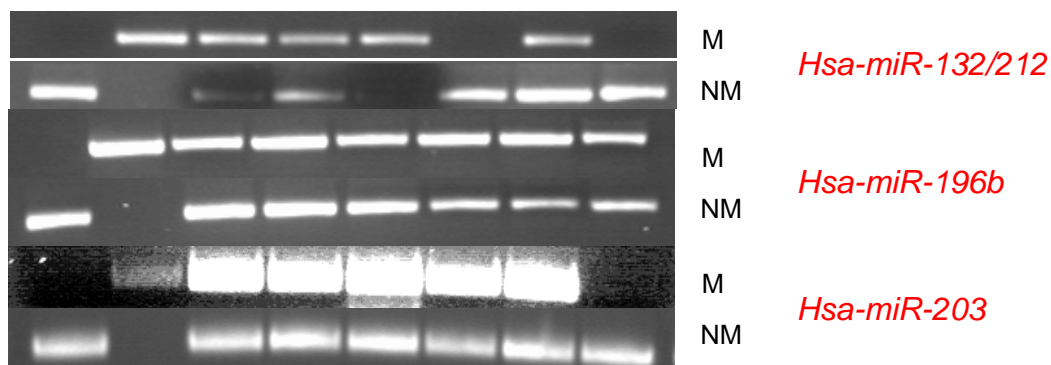


Figura 15. Análisis de metilación de genes microARN en las líneas celulares derivadas de LLA.

MSP, análisis de las secuencias metiladas y no metiladas en diferentes líneas celulares LLA; C-, control no metilado (linfocitos periféricos de donantes sanos); C+, control metilado.

Por esta razón, se realizó una MSP-cuantitativa para cuantificar el grado de metilación de *hsa-miR-124a2*. Mediante esta técnica, la isla CpG del *hsa-miR-124a2* se encontró hipermetilada en las líneas celulares LLA (media de la ratio normalizada, $180\% \pm 38\%$). Como era de esperar, *hsa-miR-320* (no ligado a una estructura de cromatina cerrada) no presentaba metilación en ninguna de las líneas celulares analizadas (**Figura 16**).

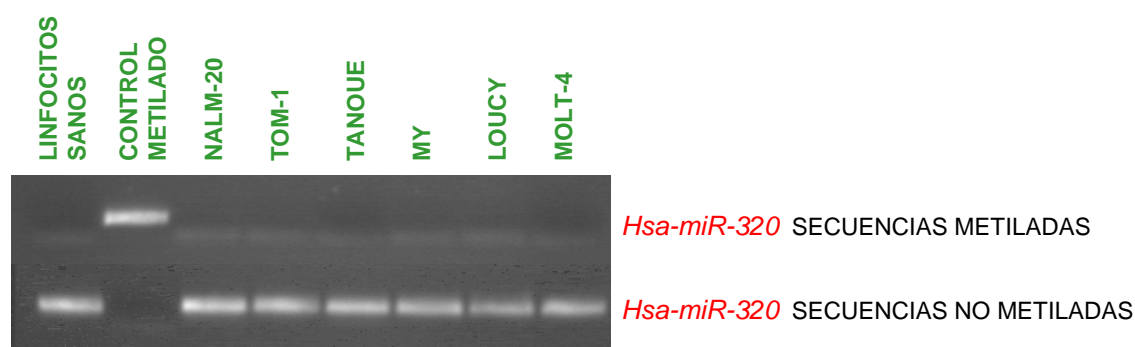


Figura 16. Análisis de metilación de *hsa-miR-320* en líneas celulares derivadas de LLA.

Se empleó *Hsa-miR-320* como control negativo para el análisis de metilación del miARN porque este miARN no mostró marcas de histona ligadas a cromatina cerrada en los arrays de ChIP-on chip. Como esperamos, MSP demostró que *hsa-miR-320* no estaba metilado en las líneas celulares derivadas de LLA.

La metilación de cada isla CpG se asoció con la infrarregulación de la expresión de su correspondiente miR. Además, dicha expresión disminuida

pudo reinstaurarse parcialmente tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina en las líneas celulares TOM-1 y NALM-20 (**Figura 17**).

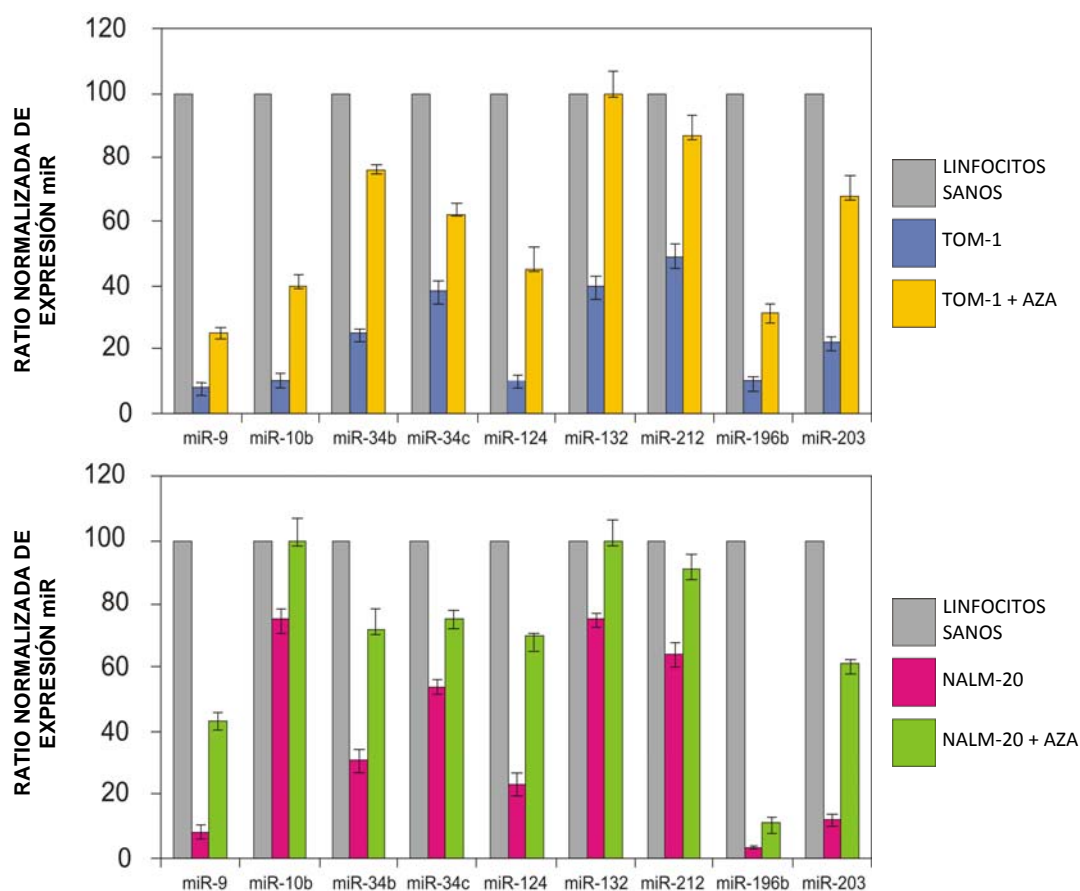


Figura 17. Análisis de expresión de los genes miARN en líneas celulares derivadas de LLA. Expresión de diferentes miARNs en las líneas celulares TOM-1 y NALM-20 antes y después del tratamiento con el agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (AZA) demostrando una suprarregulación de la expresión del gen después del tratamiento. La expresión del gen se normalizó respecto a linfocitos sanos. (ratio normalizada = 100%). Se muestra la media \pm DS de 3 experimentos diferentes.

Entre los 353 pacientes con LLA incluidos en este estudio (**Tabla 5**), las frecuencias de pacientes metilados (en orden descendente) fueron las siguientes: 49% para *hsa-miR-124a1*, 46% para *hsa-miR-124a2*, 42% para *hsa-miR-124a3*, 34% para *hsa-miR-34b/c*, 34% para *hsa-miR-9-1*, 33% para *hsa-miR-9-3*, 25% para *hsa-miR-10b*, 27% para *hsa-miR-203*, 25% para *hsa-miR-196b*, 21% para *hsa-miR-9-2*, y 7% para *hsa-miR-132/212*. En 123 de 353 pacientes no se encontró ningún miR metilado (grupo no metilado, 35%)

mientras que la mayoría de las LLAs (230 [65%] de 353) presentaron metilación de al menos un miR (grupo metilado), oscilando el número de genes metilados entre uno y diez. Al igual que lo observado en líneas celulares, los pacientes metilados mostraron una infrarregulación significativa de la expresión de los miRs representativos comparado con los pacientes no metilados (**Figura 18**).

Tabla 5.- Características clínicas y resultados de los 353 pacientes LLA de acuerdo al estado de metilación del miARN.

CARACTERÍSTICAS	NO METILADO (n=123)	METILADO (n=230)	VALOR P
Edad, n			0.003
< 15 años	76	103	
> 15 años	47	127	
Sexo (M/F), n	67/56	143/87	NS
Leucocitos, n			0.007
< 50 x 10 ⁹ /L	101	141	
> 50 x 10 ⁹ /L	22	89	
Clasificación FAB, n			NS
L1	55	80	
L2	63	140	
L3	5	10	
Línea Blástica, n			NS
Célula B	104	183	
Célula T	19	47	
Grupos de Riesgo NCI n			NS
Estándar	60	68	
Pobre	16	35	
Grupos de Riesgo PETHEMA, n			NS
Estándar	50	78	
Pobre	73	152	
Tratamiento, n			NS
PETHEMA 89	17	34	
PETHEMA 93	87	169	
PETHEMA 96	19	27	
TPH, n	20	40	NS
Mejor Respuesta, n			NS
RC	112	202	
Anormalidades			
Citogenéticas/Moleculares, n			
BCR-ABL	20	61	0.03
t(1;19)	4	2	NS
11q23	1	1	NS
MYC	2	3	NS
7q35-14q11	2	3	NS
TEL-AML1	16	40	NS
Normal	70	113	NS
Otras	3	1	NS
NT	5	6	NS
Recaída, n	22	105	< 0.001
Muerte, n	37	141	< 0.001

Datos expresados en porcentajes. FAB, Francés-Americana-Británica; NCI, National Cancer Institute; PETHEMA, "Programa para el estudio y tratamiento de las hemopatías malignas"; TPH, trasplante progenitores hematopoyéticos; RC, remisión completa. NT, no testado.

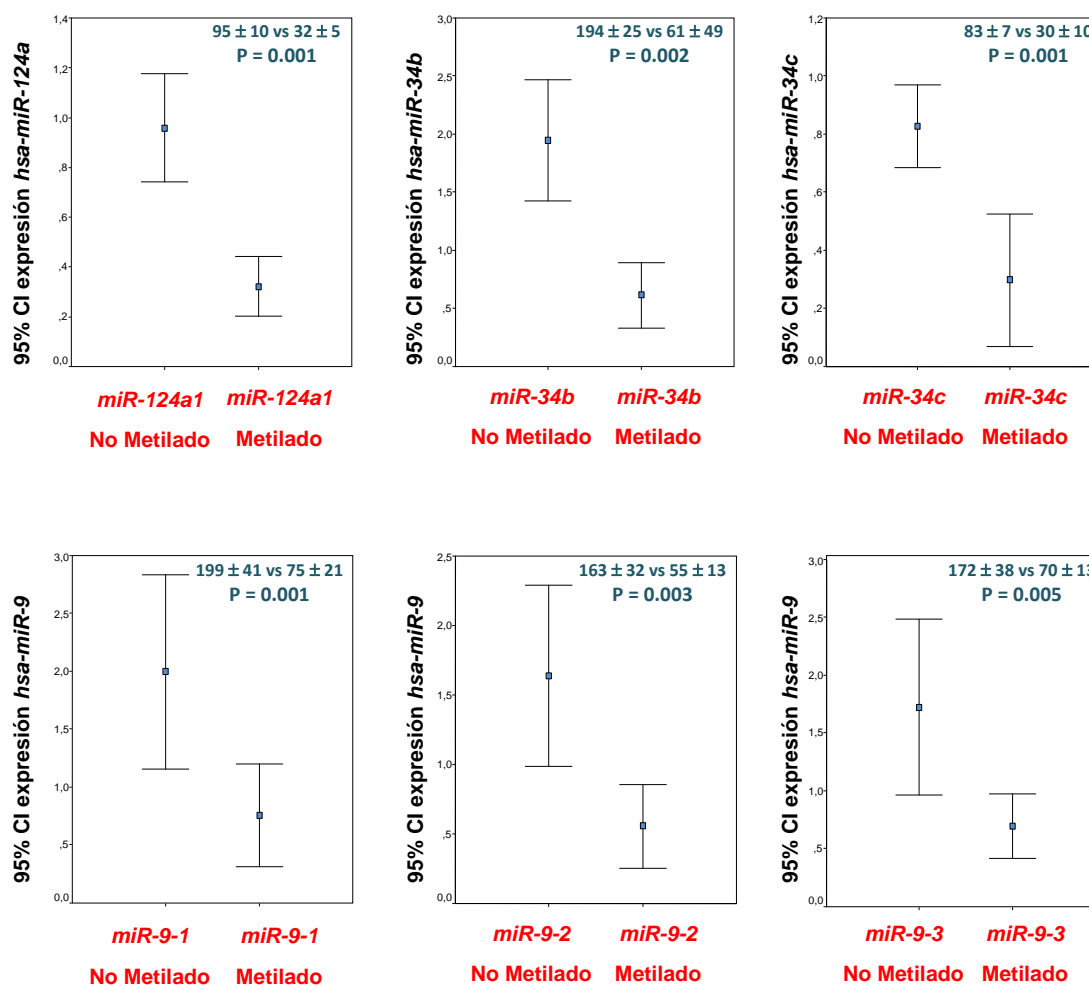


Figura 18. Metilación asociada con la infrarregulación de genes miARN representativos en pacientes LLA.

La expresión de miARNs en pacientes con LLA se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se detectaron niveles de transcritos miARN significativamente bajos entre pacientes LLA metilados frente a los pacientes no metilados. Las barras representan la expresión de la media (95% CI) en los pacientes con LLA en comparación con los linfocitos sanos (ratio normalizada = 100%).

Dado que la mayoría de los pacientes enrolados en este estudio habían sido previamente analizados para la presencia de metilación en 27 genes relacionados con el cáncer [32,33], se decidió estudiar la correlación entre la metilación de miRs y la metilación de estos genes. Hubo una concordancia significativa entre la metilación de miR y la presencia de un fenotipo metilador (CIMP); la metilación de miR estaba presente en 146 de 186 (78%) tumores

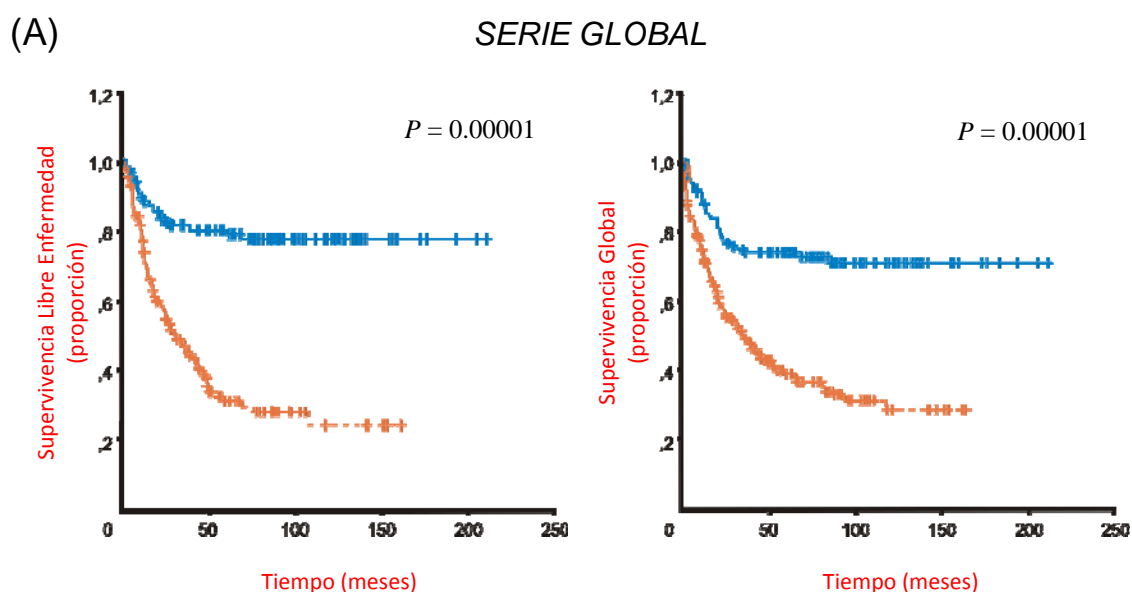
CIMP-positivos (>2 genes metilados) frente a 40 de 86 (49%) tumores CIMP-negativos (de 0 a 2 genes metilados) ($P = 0,001$).

5.3.- RESULTADOS CLÍNICOS Y PERFIL DE METILACIÓN DE miARNS.

Tal como se presenta en la **Tabla 5**, la edad adulta (127 de 174 pacientes [73%] frente a 103 de 179 [57%]; $P = 0,003$), las cifras elevadas de leucocitos ($> 50000 \text{ mm}^3$) al diagnóstico (89 de 111 [80%] frente a 141 de 242 [58%]; $P = 0,007$) y la positividad del transcrito *BCR-ABL* (61 de 81 [75%] frente a 164 de 272 [60%]; $P = 0,03$) se asociaron significativamente con el grupo metilado. Sin embargo, las demás características clínicas y de laboratorio se distribuyeron de forma similar entre ambos grupos de metilación.

La **Tabla 5** detalla la historia de recaídas, las tasas de remisión completa (RC) y de mortalidad para los pacientes incluidos en los diferentes grupos de metilación. Las tasas de RC de los pacientes en los grupos no metilados y metilados fue del 91% y 88%, respectivamente, representando una tasa de RC global del 90%. Esto sugiere que el perfil de metilación no se correlacionaba con la respuesta a la terapia de inducción a la remisión. Sin embargo, los pacientes en el grupo no metilado presentaron una tasa de recaídas más baja que los pacientes del grupo metilado (22 de 111 [20%] versus 105 de 184 [57%]; $P < 0,001$). La tasa de mortalidad era también más baja para el grupo no metilado comparada con el grupo metilado (37 de 123 [30%] versus 141 de 230 [61%]; $P < 0,001$). Se obtuvieron resultados similares en el análisis separado de las LLAs infantiles (tasa de recaída, 15% para el grupo no metilado frente a 45% para el grupo metilado; $P = 0,0001$; tasa de mortalidad, 17% para el grupo no metilado frente a 30% para el grupo metilado; $P = 0,046$) y del adulto (tasa de recaída, 27% para el grupo no metilado frente a 68% para el grupo metilado; $P = 0,0001$; tasa de mortalidad, 43% para el grupo no metilado frente a 79% para el grupo metilado; $P = 0,0001$).

Se analizó la supervivencia libre de enfermedad (SLE) entre los pacientes que alcanzaron una RC de acuerdo al perfil de metilación. Las probabilidades estimadas de SLE a los 14 años fueron del 78% y 24% para el grupo no metilado y metilado, respectivamente ($P = 0,00001$; **Figura 19A**). Entre los niños, la probabilidad de SLE a los 14 años fue del 82% para el grupo no metilado y del 33% para el grupo metilado ($P = 0,00001$; **Figura 19B**). Entre los pacientes adultos, la probabilidad de SLE a los 14 años fue del 70% para el grupo no metilado y del 12% para el grupo metilado ($P = 0,00001$; **Figura 19C**). La supervivencia global (SG) calculada a los 14 años para todos los pacientes leucémicos fue del 71% para los pacientes no metilados y del 28% para los pacientes metilados ($P = 0,00001$; **Figura 19A**). Se observaron diferencias significativas en la SG entre los grupos no metilado y metilado en el análisis separado de las LLA infantiles (81% versus 54%; $P = 0,01$; **Figura 19B**) y adultas (55% versus 10%; $P = 0,00001$; **Figura 19C**)



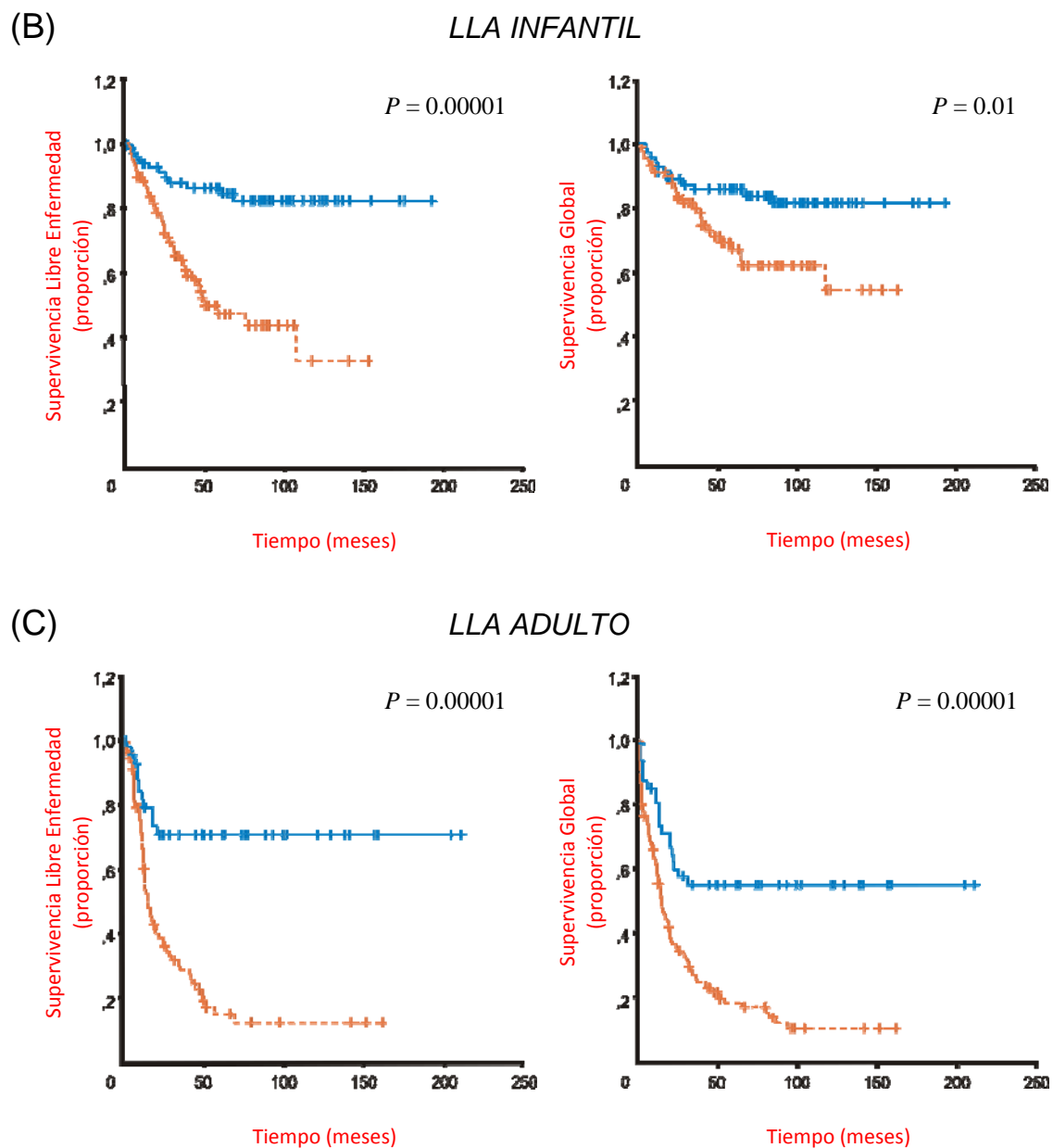


Figura 19. Función Kaplan-Meier de supervivencia para pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Curvas de Supervivencia libre de Enfermedad (SLE) y Supervivencia Global (SG) para (A) todos los pacientes incluidos en este estudio, (B) LLA en adultos, y (C) LLA infantil de acuerdo al perfil de metilación. Líneas continuas, pacientes no metilados; líneas discontinuas, pacientes metilados.

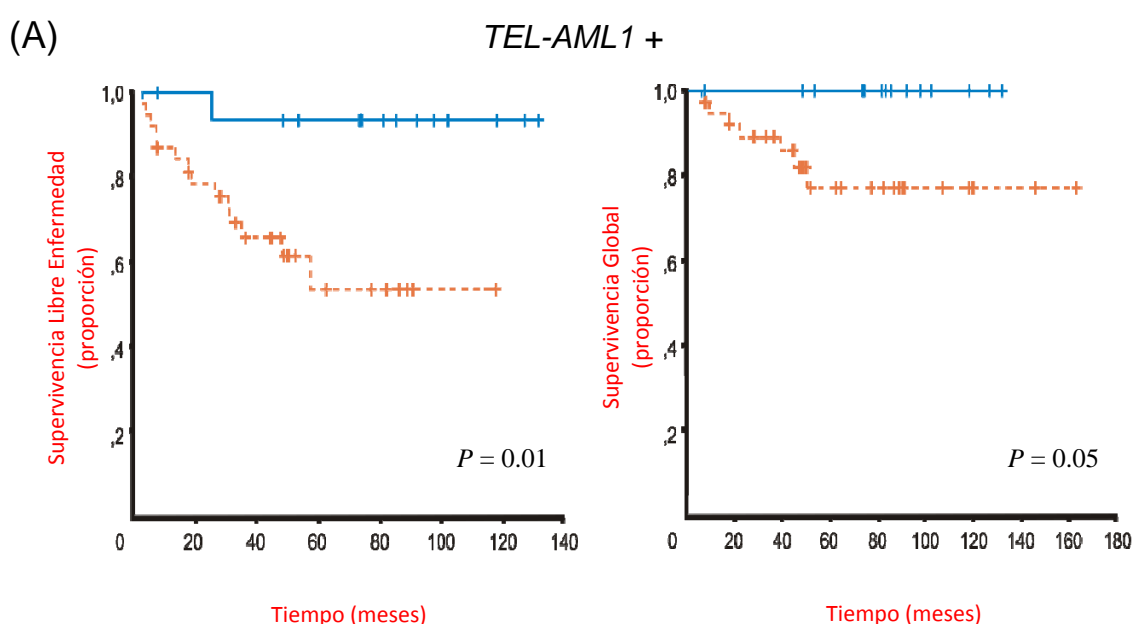
El análisis multivariante de los factores potencialmente pronósticos demostró que el perfil de metilación constituía un factor pronóstico independiente en la predicción de la SLE tanto en la serie global ($P = 0,0001$), las LLA infantiles ($P = 0,0001$) como en las LLA del adulto ($P = 0,0001$; **Tabla 6**). El perfil de metilación estaba también asociado de manera independiente con la SG en las serie global ($P = 0,0001$), LLA infantiles ($P = 0,019$) y LLA del adulto ($P = 0,001$; **Tabla 6**).

Tabla 6.- Modelo multivariante de Cox para Supervivencia Libre de Enfermedad y Supervivencia Global.

CARACTERÍSTICAS PARA SLE	ANÁLISIS UNIVARIANTE	ANÁLISIS MULTIVARIANTE
	Valor P	Valor P
Serie Global		
Metilación microARN	< 0.001	< 0.001
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	0.004	NS
Positividad BCR-ABL	< 0.0001	< 0.001
Fenotipo T	0.1	NS
Edad > 15 años	< 0.001	< 0.001
PETHEMA bajo riesgo	0.05	NS
LLA Infantil		
Metilación microARN	< 0.001	< 0.001
NCI bajo riesgo	0.04	NS
Fenotipo T	0.05	NS
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	0.04	NS
LLA Adulto		
Metilación microARN	< 0.001	< 0.001
Fenotipo T	0.1	NS
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	0.01	NS
Positividad BCR-ABL	< 0.001	< 0.001
CARACTERÍSTICAS PARA SG	ANÁLISIS UNIVARIANTE	ANÁLISIS MULTIVARIANTE
	Valor P	Valor P
Serie Global		
Metilación microARN	< 0.001	< 0.001
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	< 0.001	0.07
Positividad BCR-ABL	< 0.001	< 0.001
Fenotipo T	0.1	NS
Edad > 15 años	< 0.001	< 0.001
PETHEMA bajo riesgo	0.08	NS
LLA Infantil		
Metilación microARN	0.015	0.019
NCI bajo riesgo	0.09	NS
Fenotipo T	0.001	0.001
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	0.063	NS
LLA Adulto		
Metilación microARN	< 0.001	< 0.001
Leucocitos > 50 x10 ⁹ /L	0.011	NS
Positividad BCR-ABL	< 0.001	< 0.001
Fenotipo T	0.1	NS

5.4.- IMPACTO PRONÓSTICO DEL PERFIL DE METILACIÓN DE miARNS EN GRUPOS SELECCIONADOS DE RIESGO.

Para determinar el impacto pronóstico del perfil de metilación en subgrupos de LLA con factores pronósticos bien establecidos, analizamos la SLE y la SG en pacientes *TEL-AML1* y *BCR-ABL* positivos y también en pacientes con una cifra elevada de leucocitos ($> 50000/\text{mm}^3$) al diagnóstico. Entre las LLA infantiles *TEL-AML1* positivas ($n = 56$), la SLE a los 10 años fue del 93% para el grupo no metilado y del 53% para el grupo metilado ($P = 0,01$; **Figura 20A**). La SG a los 12 años para los mismos pacientes fue del 100% para los pacientes no metilados y del 77% para los pacientes metilados ($P = 0,05$; **Figura 20A**). Entre los pacientes *BCR-ABL* positivos ($n = 81$), la SLE a los 9 años fue del 58% para los pacientes no metilados y del 4% para los pacientes metilados ($P = 0,0009$; **Figura 20B**). La SG estimada a los 9 años fue del 53% para los pacientes *BCR-ABL* no metilados y del 3% para los pacientes metilados ($P = 0,0002$; **Figura 20B**). Entre las LLAs con una cifra elevada de leucocitos al diagnóstico ($n = 111$), la SLE a los 11 años fue del 72% para los pacientes no metilados y del 25% para los metilados ($P = 0,009$; **Figura 20C**). La SG estimada a los 11 años para estos mismos pacientes fue del 56% para los no metilados y del 22% para los metilados ($P = 0,02$; **Figura 20C**).



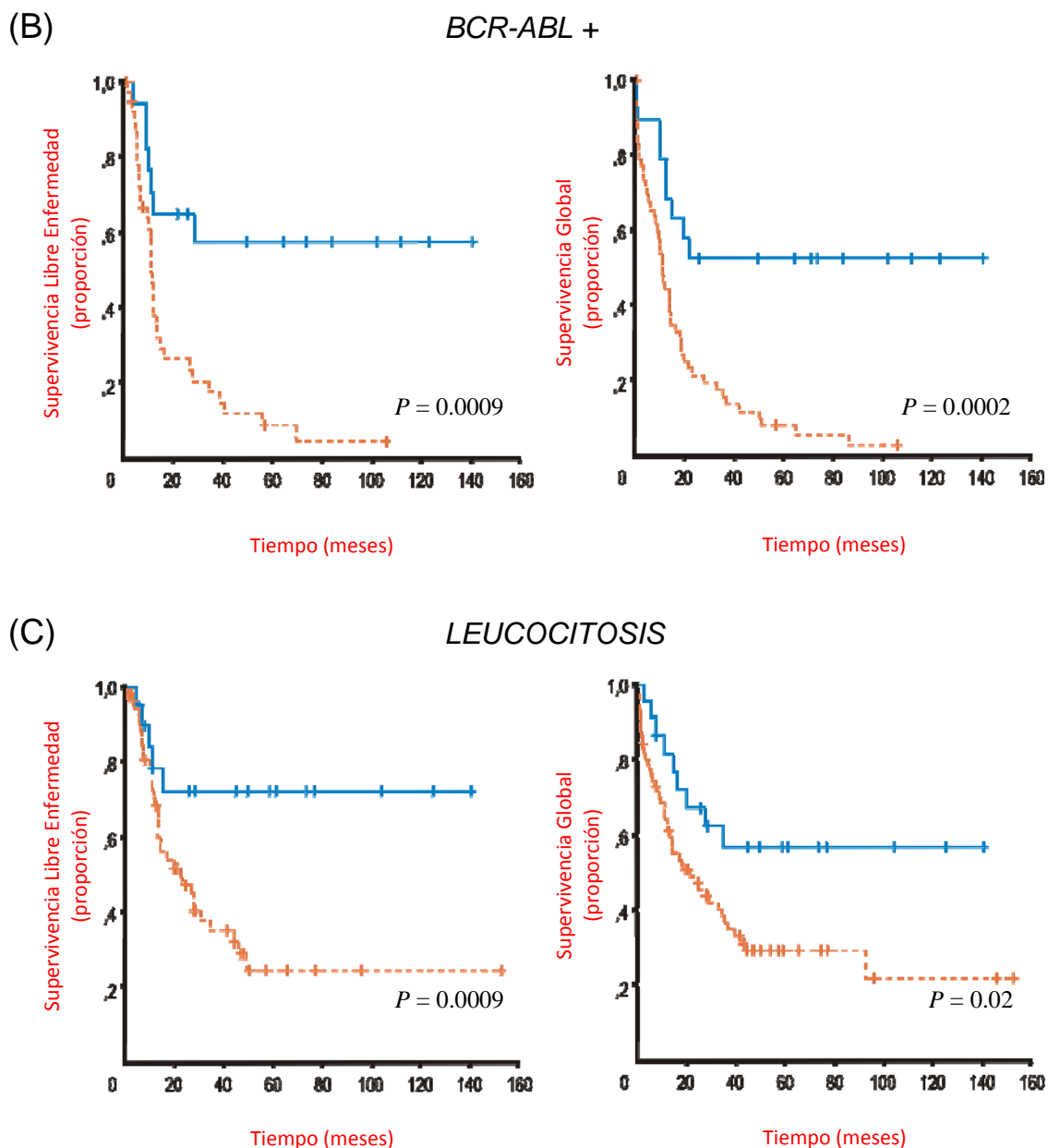
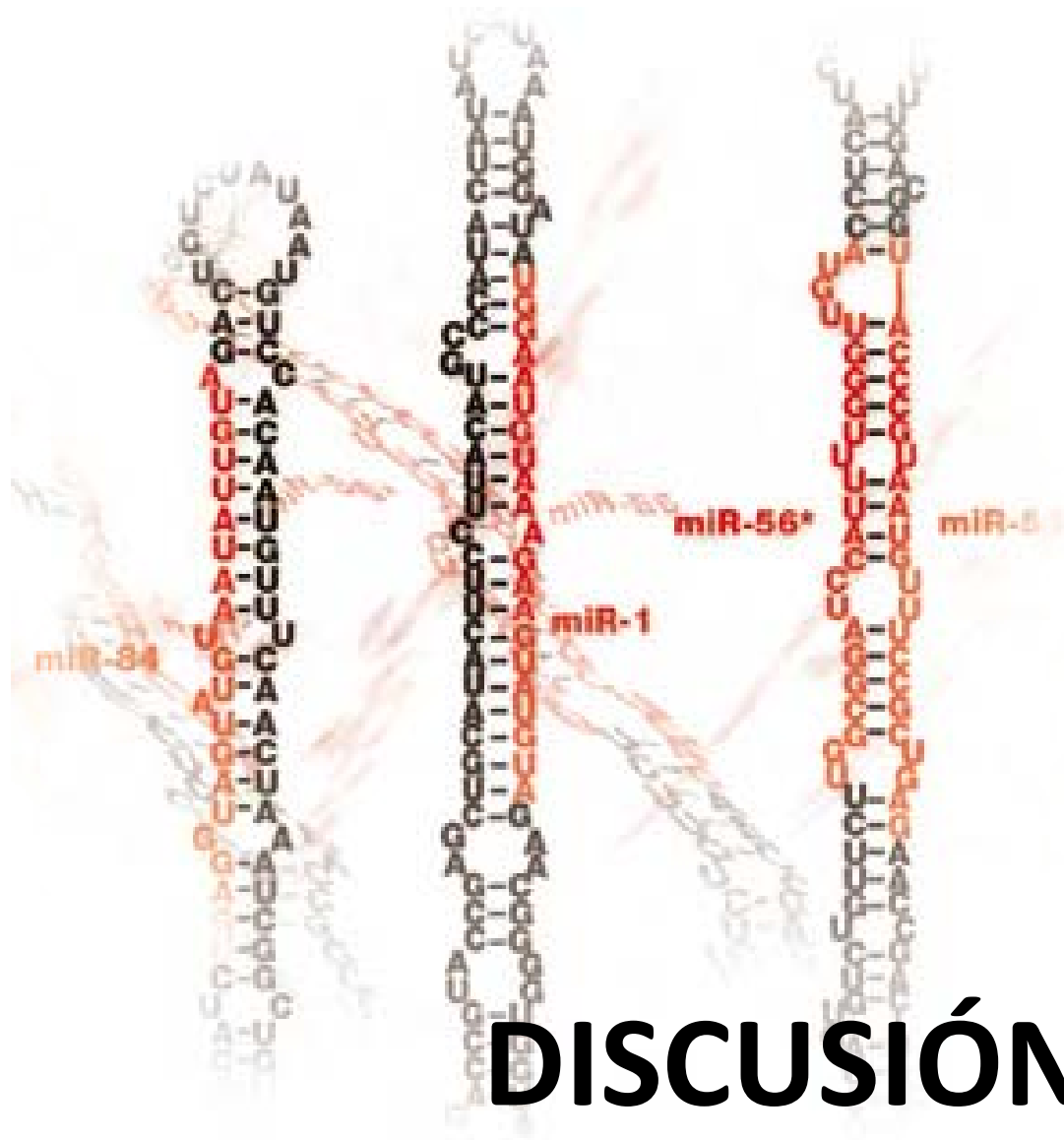


Figura 20. Función Kaplan-Meier de supervivencia para grupos seleccionados pronósticos de pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LLA).

Curvas de Supervivencia libre de Enfermedad (SLE) y Supervivencia Global (SG) para (A) pacientes con TEL-AML1 positivo, (B) pacientes con BCR-ABL positivo, y (C) pacientes con una cifra alta de leucocitos al diagnóstico de acuerdo al perfil de metilación. Líneas continuas, pacientes no metilados; líneas discontinuas, pacientes metilados.



DISCUSIÓN

Este estudio muestra claramente que un acercamiento integrado y secuencial usando la técnica ChIP-on-chip para detectar las modificaciones químicas de las histonas, el estudio de la metilación del ADN y los análisis de expresión génica hacen posible la identificación eficiente de miARNs con un posible papel supresor tumoral y silenciados epigenéticamente en las células neoplásicas. Nuestros datos muestran diferencias marcadas en los niveles de K4H3me3 y K9H3me2 entre linfocitos sanos y células derivadas de LLA. De hecho, las islas CpG asociadas a 13 miARNs mostraron niveles altos de K9H3me2 y/o niveles bajos de K4H3me3. Se sabe que este modelo de modificaciones de las histonas marca una estructura de cromatina cerrada asociada con un estado represivo en la expresión del gen. Además, la consistencia completa en la correlación entre ambas marcas de las histonas, la presencia de metilación del ADN alrededor de estos miARNs y sus modelos de expresión fue confirmada en un panel de seis líneas celulares de LLA. Adicionalmente, el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina recuperó parcialmente los niveles de expresión de estos genes, sugiriendo claramente que los mecanismos epigenéticos alrededor de las islas CpG contribuyen al silenciamiento de la expresión de estos miARNs en las líneas celulares de LLA. De manera importante, la metilación de los miARNs se observó también en las muestras primarias tumorales de una serie amplia de pacientes con LLA. Por último, se observó la metilación de al menos un miARN en un 65% de nuestros pacientes al diagnóstico, apoyando un papel de la metilación del miARN en las fases tempranas de la leucemogénesis linfoide.

Se usó el servidor web MiRGen para determinar las listas de los posibles genes dianas de los miARNs metilados en la LLA [146]. Dicha lista de dianas estaba enriquecida con genes involucrados en la proliferación y apoptosis celular (**Tabla 4 y 7**). Estas anomalías no son sorprendentes. Debajo de la complejidad de cada cáncer se encuentra un número limitado de eventos críticos que impulsan a la célula tumoral y su progenie clonal hacia la expansión incontrolada y la invasión. Uno de estos eventos es la proliferación celular aumentada, que, junto con la supresión compensatoria de la apoptosis

necesaria para soportarla, proveen una plataforma mínima necesaria para mantener más allá la progresión neoplásica [147]. Nuestros datos publicados previamente [32,33,44,46] junto a los resultados del presente trabajo muestran que en la LLA esta plataforma común puede ser alcanzada por un mecanismo de metilación afectando no sólo a los genes supresores tumorales clásicos sino también a los miARNs.

Tabla 7.- Lista de miARNs mayormente metilados y sus genes diana predichos.

MiARN	GENES MiR DIANAS
<i>Hsa-miR-9</i>	<i>FBN1, EN1, AUH, FBN2, SNX25.</i>
<i>Hsa-miR-10b</i>	<i>GRM3, ACTG1, TFAP2C, GATA6, NCOR2, NCOA6, SLC38A2.</i>
<i>Hsa-miR-34</i>	<i>UHRF2, NOTCH1, GRM1, HTR2C, MYC, RNF4, MLLT3, THRAP1, DLL1, PDGFRA, KHDRBS1, STK39, ZZZ3, UBE2Q1, TAOK1, ARRDC3, HOXC8, DHX40, RBM24.</i>
<i>Hsa-miR-124</i>	<i>JAG1, ITPR3, LAMC1, NEUROD1, PTPN12, FLOT2, RALA, RNF11, PARP16, RAVER2, FAM38B, XPO4, ABHD3, LRP6, CUL5, KLF4, MLLT3, EVI1, CDK6, HOXA1.</i>
<i>Hsa-miR-132</i>	<i>EIF4A2, EP300, PNN, TCF7L1, PTCH.</i>
<i>Hsa-miR-196b</i>	<i>XAGE1, HOXC8, COL1A2, HOXB7, GATA6, HOXB6.</i>
<i>Hsa-miR-203</i>	<i>SPEN, EPC2.</i>
<i>Hsa-miR-212</i>	-

Aunque las anomalías genéticas de los principales genes supresores tumorales, tales como *RB* y *p53*, son las lesiones moleculares más comunes en el cáncer humano [148], estas son muy poco frecuentes en la LLA [6]. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la metilación en las células de la LLA puede ayudar a inactivar respuestas apoptóticas o de supresión del crecimiento tumoral, ya sea por encima de *p53* (en *p14*, *DAPK* o *ASPP-1*) o por debajo (*p21* o *APAF-1*) y también inactivando *p73*, el cual codifica una proteína que es a la vez estructural y funcionalmente homóloga a la proteína *p53*. Por lo tanto podemos afirmar que también en la LLA, hay una fuerte selección en las células tumorales para perder la funcionalidad de *p53*, pero, en este caso, indirectamente a través de una vía epigenética alternativa. Además, la metilación en la LLA altera el crecimiento tumoral disregulando ciclinas dependientes de cinasas que fosforilan e inactivan funcionalmente la proteína *RB* [32,33,44,46].

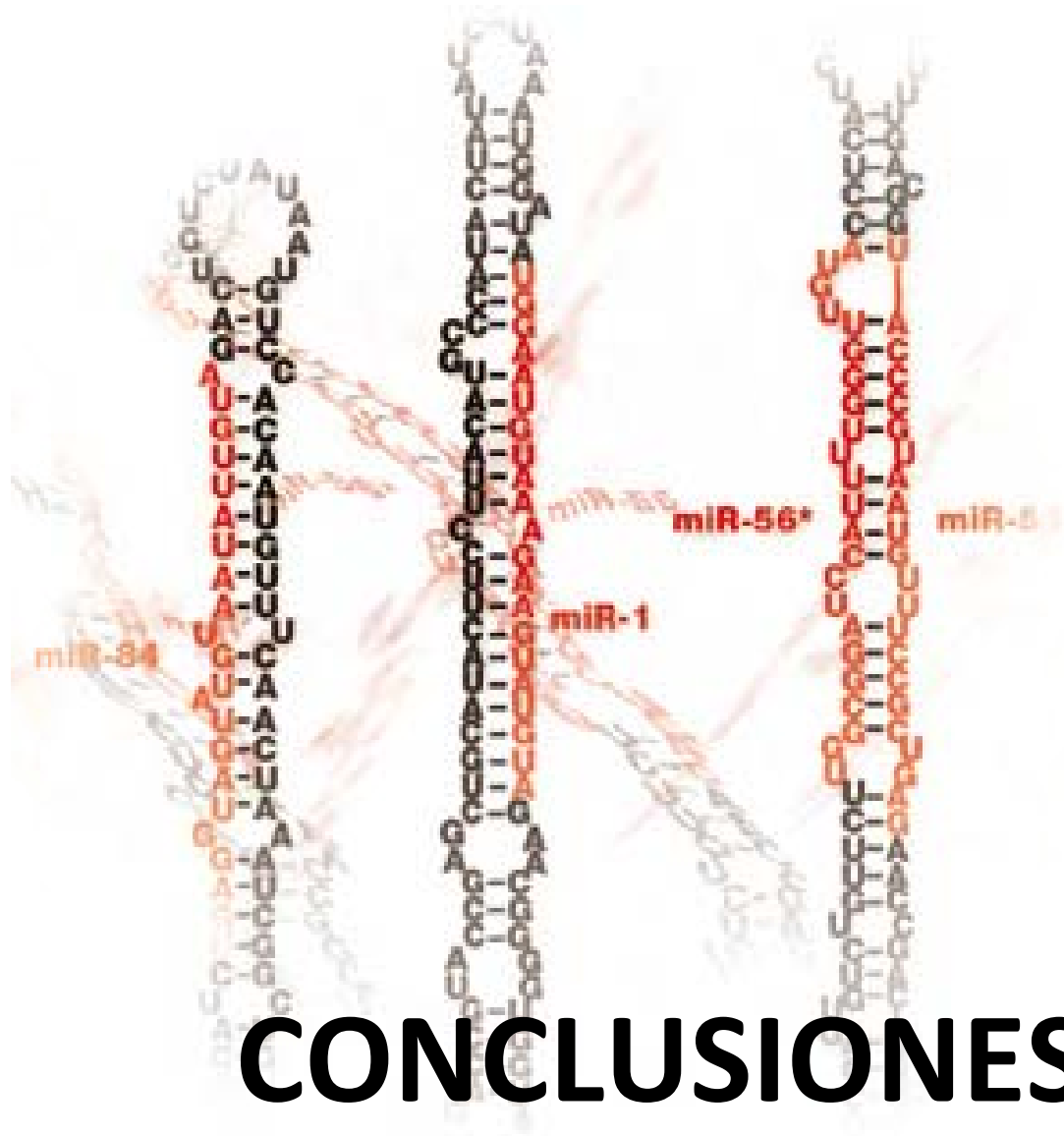
Nuestros resultados presentes sugieren que la metilación de *hsa-miR-34* y *miR-124a* puede cooperar con las vías anteriormente mencionadas inactivando estos genes supresores tumorales clásicos. Recientemente, se ha descrito que la familia *miR-34* era diana transcripcional directa de *p53* [149], indicando que *miR-34* juega un papel pivote en la vía del supresor tumoral *p53*.

De manera interesante, los miARNs de la familia *miR-124a* fueron los microARNs más frecuentemente metilados en las muestras de LLA y la mayoría de pacientes incluidos en el grupo metilado mostraron, al menos, la metilación de un miembro de esta familia. Previamente ha sido demostrado que *CDK6* (el cual está involucrado en la proliferación y diferenciación celular) es una diana directa de *miR-124a* [124]. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la pérdida epigenética de *miR-124a* incrementa la activación de *CDK6* y la fosforilación del retinoblastoma y contribuye a la proliferación anormal de células LLA tanto in vitro como in vivo [150]. Tomando todo junto, estos datos implican que en la LLA también hay una fuerte selección para que las células tumorales pierdan funciones críticas en los genes supresores tumorales, pero en este caso, a través de una vía epigenética alternativa. De manera relevante, este mecanismo indirecto no está sólo restringido a la LLA, ya que la metilación de *hsa-miR-124a* y *miR-34b/c* se ha observado también en otras patologías [124,151-153].

Estudios recientes han puesto de manifiesto la relevancia de los perfiles de expresión de miARNs en la progresión de diversos tipos de tumores [154-159]. Sin embargo, no hay estudios concernientes al impacto pronóstico de dichos patrones de metilación. En este trabajo, mostramos que la metilación de los miARNs es diferente en los tumores individuales dentro del mismo tipo tumoral, y este perfil de metilación paciente-específico proporciona información pronóstica importante en la LLA. La presencia en los tumores individuales de eventos epigenéticos que afectan a los miARNs es un factor de mal pronóstico tanto en niños como en adultos con LLA. Los pacientes con metilación de miARNs presentaron una supervivencia libre de enfermedad (SLE) y una supervivencia global (SG) más pobre que los pacientes no metilados. El

análisis multivariante confirmó que el perfil de metilación estaba asociado con una SLE y una SG más corta. Además, el estado de metilación fue capaz de redefinir el pronóstico de grupos seleccionados de LLA con características pronósticas bien establecidas. La ausencia de metilación de miARNs mejora el pobre resultado general de los pacientes que presentan el cromosoma Filadelfia o altas cifras de leucocitos, mientras que la presencia de metilación empeoraba el buen resultado general de los pacientes con reordenamiento *TEL-AML1*. Por lo tanto, el perfil de metilación de miARNs en la LLA podría tener implicaciones clínicas importantes complementando los estudios habituales de inmunofenotipo, citogenética y moleculares para guiar la selección de la terapia y proveer una base para el desarrollo de nuevos tratamientos, tales como los agentes desmetilantes o los inhibidores de las deacetilasas de las histonas.

En resumen, nuestros resultados indican que la metilación aberrante que afecta a genes miARN es un fenómeno común en la leucemia linfoblástica aguda. El perfil de metilación parece ser un factor importante en la predicción del resultado clínico de los pacientes con esta patología.



CONCLUSIONES

1.- El estudio del estado de metilación del ADN, la técnica CHIP-on-chip para detectar las modificaciones químicas de las histonas y los análisis de expresión génica permiten de manera eficiente la identificación de miARNs con un probable papel supresor tumoral y silenciados por mecanismos epigenéticos en la LLA.

2.- El tratamiento con agentes desmetilantes, como la 5-aza-2'-deoxicitidina recupera en cierta medida los niveles de expresión de los genes analizados, sugiriendo de forma evidente que los mecanismos epigenéticos en torno a las islas CpG contribuyen al silencio en la expresión de los miARNs.

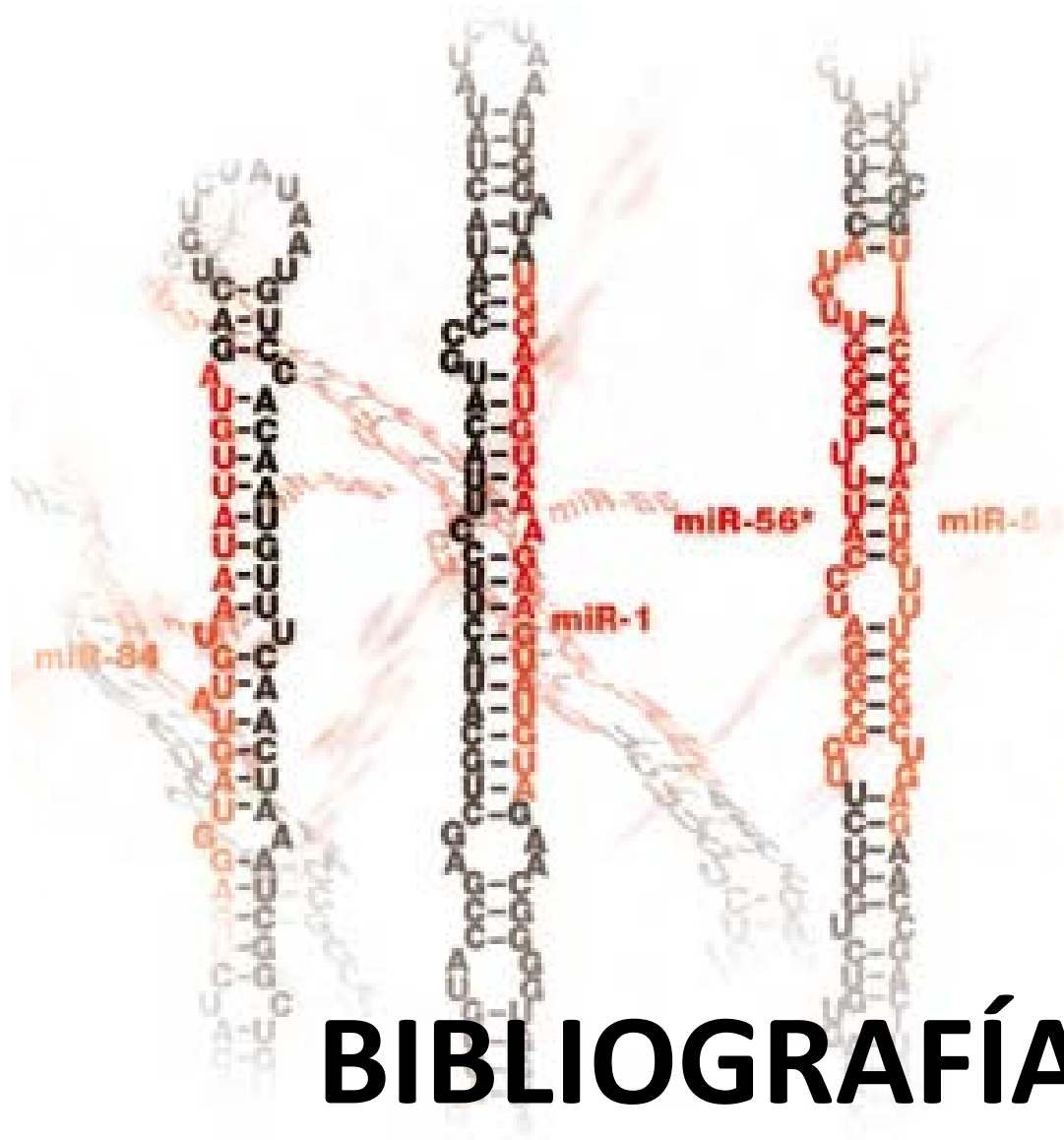
3.- La proliferación celular aumentada y la supresión de la apoptosis, en la LLA, se puede alcanzar por mecanismos de metilación afectando tanto a genes supresores neoplásicos clásicos como a los miARNs.

4.- La metilación de hsa-miR-34 y miR-124a actúa conjuntamente con la vía de p53, alterada epigenéticamente en las células de la LLA, inactivando algunos genes supresores tumorales.

5.- El perfil de metilación de los miARNs constituye un parámetro importante para definir un grupo de pacientes con una evolución clínica desfavorable.

6.- Dicho perfil es capaz de modificar el pronóstico de la enfermedad en subtipos establecidos de LLA con peor pronóstico como la LLA Filadelfia positiva o la LLA hiperleucocitósica.

7.- El resultado de este trabajo, junto con los estudios complementarios usuales, pueden constituir en un futuro una base fundada para el uso de nuevos tratamientos, como los agentes desmetilantes o los inhibidores de las deacetilasas de las histonas.



BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Pui C-H, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339:605 – 615.
- 2.- Pui C-H, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:343 – 362.
- 3.- Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature* 2001; 411:336 – 341.
- 4.- Pui C-H, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990; 76:1449 – 1463.
- 5.- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 91:3995 – 4019.
- 6.- Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993; 82:3163 – 3169.
- 7.- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* 1999; 21:163 – 167.
- 8.- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286:481 – 486.
- 9.- Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest* 2000;105:401 – 407.
- 10.- Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253 – 266.
- 11.- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042 – 2054.

- 12.- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:143 – 153.
- 13.- Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999; 93:4059 – 4070.
- 14.- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33:245 – 254.
- 15.- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998; 12:599 – 606.
- 16.- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393:386 – 389.
- 17.- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass KU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 9:187 – 191.
- 18.- Mannervik M, Nibu Y, Zhang H, Levine M. Transcriptional coregulators in development. *Science* 1999; 284:606 – 609.
- 19.- Hendrich B, Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249:55 – 74.
- 20.- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20:3156 – 3165.
- 21.- Im H, Grass JA, Christensen HM, Perkins A, Bresnick EH. Histone deacetylase-dependent establishment and maintenance of broad low-level histone acetylation within a tissuespecific chromatin domain. *Biochemistry* 2002; 41:15152 – 15160.

- 22.- El Osta A. DNMT cooperativity – the developing links between methylation, chromatin structure and cancer. *Bioessays* 2003; 25:1071 – 1084.
- 23.- Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15:835 – 842.
- 24.- Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21:5427 – 5440.
- 25.- Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994; 14:5487 – 5494.
- 26.- Vertino PM, Yen RW, Grao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4555 – 4565.
- 27.- Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem* 1997; 272:22322 – 22329.
- 28.- Myohanen SK, Baylin, SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4a alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58:591 – 593.
- 29.- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225 – 3229.
- 30.- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24:132 – 138.

- 31.- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, Pierce S, et al. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101:4131 – 4136.
- 32.- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 104:2492 – 2498.
- 33.- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* 2005 ;23:7043 – 7049.
- 34.- Garcia-Manero G, Daniel I, Smith TL, Kornblau SM, Kantarjian HM, Issa J-P. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2217 – 2224.
- 35.- Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* 2003; 17:1845 – 1850.
- 36.- Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, et al. DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2928 – 2935.
- 37.- Garcia-Manero G, Bueso-Ramos C, Daniel J, Williamson J, Kantarjian HM, Issa JP. DNA methylation patterns at relapse in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1897 – 1903.
- 38.- Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, Matsushita M, van Dongen JJ, Szczepanski T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2004; 12:97 – 99.

- 39.- Uehara E, Takeuchi S, Tasaka T, Matsushashi Y, Yang Y, Fujita M, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia. *Int J Oncol* 2003; 23:693 – 696.
- 40.- Ren Y, Roy S, Ding Y, Iqbal J, Broome JD. Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein. *Oncogene* 2004; 23:3953 – 3961.
- 41.- Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Barrios M, Heiniger A, Torres A. The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:1855 – 1864.
- 42.- Agirre X, Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C, Navarro G, et al. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2006; 25:1862 – 1870.
- 43.- San Jose-Eneriz E, Agirre X, Roman-Gomez J, Cordeu L, Garate L, Jimenez-Velasco A, et al. Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter. *Br J Haematol* 2006; 134:137 – 144.
- 44.- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Calasanz MJ, et al. CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4845 – 4850.
- 45.- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, et al. Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 2004; 91:707 – 713.
- 46.- Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, Jimenez-Velasco A, San Jose-Eneriz E, Garate L, et al. Epigenetic regulation of WNT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109:3462 – 3469.

- 47.- Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 2002; 62:6390 – 6394.
- 48.- Goodman PA, Burkhardt N, Juran B, Tibbles HE, Uckun FM. Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2003; 22:2504 – 2514.
- 49.- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate J, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 2005; 24:7213 – 7223.
- 50.- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21:5400 – 5413.
- 51.- Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga J, Nishikata I, Morishita K, Matsuoka M. Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2004; 103:2753 – 2760.
- 52.- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20:85 – 93.
- 53.- Lubbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249:135 – 164.
- 54.- Claus R, Lubbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2003; 22:6489 – 6496.
- 55.- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Lett* 2004; 211:133 – 143.

- 56.- Ruter B, Wijermans PW, Lubbert M. DNA methylation as a therapeutic target in hematologic disorders: recent results in older patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2004; 80:128 – 135.
- 57.- Avramis VI, Mecum RA, Nyce J, Steele DA, Holcenberg JS. Pharmacodynamic and DNA methylation studies of highdose 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine before and after in vivo 5-azacytidine treatment in pediatric patients with refractory acute lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24:203 – 210.
- 58.- Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, Kondo Y, Garcia-Manero G, Lotan R, et al. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res* 2004; 64:2411 – 2417.
- 59.- Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I. Induction of gene expression by 5-aza-20-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia* 2005; 19:103 – 111.
- 60.- Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler RL. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-20-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res* 2003; 27:437 – 444.
- 61.- Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. Quercetin, a potent inhibitor against b-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:227 – 234.
- 62.- Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/b-catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004; 5:91 – 102.

- 63.- Fenaux P. Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2 (Suppl 1):S36 – S44.
- 64.- Montiel-Duarte C, Cordeu L, Agirre X, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, José-Eneriz ES, Gárate L, Andreu EJ, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Prósper F. Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk Res* 2008; 32(5): 709-16.
- 65.- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Vilas-Zornoza A, San José-Eneriz ES, Gárat L, Castillejo JA, Martín V, Prósper F, Heiniger A, Torres A, Agirre X. WNT5A, a putative tumor suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Cancer* 2007; 43(18): 2736-46.
- 66.- Lee, R.C. et al. The *C. Elegans* heterochromic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14*. *Cell* 1993; 75, 843–845.
- 67.- Wightman, B. et al. Post-transcriptional regulation of heterochromic gene *Lin-14* by *Lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75, 855–862.
- 68.- Cheng, A. et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acid Res* 2005; 33, 1290–1297.
- 69.- Xu, P. et al. MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet* 2004; 20, 617–624.
- 70.- Karp, X. and Ambros, V. Developmental biology, encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 2005; 310, 1330–1333.
- 71.- Chen, C. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303, 83–85.

- 72.- Poy, M.N. et al. A pancreatic-islet specific miRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432, 226–230.
- 73.- Calin, G.A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99, 15524–15529.
- 74.- Stilgenbauer, S. et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumorsuppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1998; 16, 1891–1897.
- 75.- Elnenaei, M.O. et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36, 99–106.
- 76.- Dong, J.T. et al. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* 2001; 49, 166–171.
- 77.- Calin, G.A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101, 2999–3004.
- 78.- Ota, A. et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* 2004; 64, 3087–3095.
- 79.- Tsujimoto, Y. et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226, 1097–1099.
- 80.- Calin, G.A. and Croce, C.M. MicroRNA–cancer connection: ‘the beginning of a new tale’. *Cancer Res.* 2006; 66, 7390–7394.
- 81.- Lee, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23, 4051–4060.

- 82.- Cai, X. et al. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10, 1957–1966.
- 83.- Lee, Y. et al. The nuclear RNase Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425, 415–419.
- 84.- Yi, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNA precursors. *Genes Dev.* 2003; 17, 3011–3016.
- 85.- Lund, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303, 95–98.
- 86.- Bernstein, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409, 363–366.
- 87.- Hammond, S.M. et al. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science* 2001; 293, 1146–1150.
- 88.- Khvorova, A. et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115, 209–216.
- 89.- Hwang, H.W. and Mendell, J.T. MicroRNAs cell proliferation, cell death and tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 2004; 94, 776–780.
- 90.- Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 23, 281–297.
- 91.- He, L. and Hannon, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5, 522–531.
- 92.- Wu, L. et al. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103, 4034–4039.
- 93.- Griffiths–Jones, S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32, D109–D111.

- 94.- Berezikov, E. et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNAs. *Cell* 2005; 120, 21–24.
- 95.- Rajewsky, N. and Socci, N. Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* 2003; 267, 529–535.
- 96.- Michael, M.Z. et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003; 1, 882–891.
- 97.- Yanaihara, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9, 189–198.
- 98.- Iorio, M.V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65, 7065–7070.
- 99.- Ciafre, S.A. et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 334, 1351–1358.
- 100.- Volinia, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 103, 2257–2261.
- 101.- Murakami, Y. et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2005, 1–9.
- 102.- Calin, G.A. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101, 11755–11760.
- 103.- Calin, G.A. et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353, 1793–1801.

- 104.- Metzler, M. et al. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39, 167–169.
- 105.- Kluiver, J. et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* 2005; 207, 243–249.
- 106.- Kluiver, J. et al. Lack of BIC and micro-RNA miR-155 expression in cases of primary Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45, 147–153.
- 107.- Lu, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435, 834–838.
- 108.- Cimmino, A. et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102, 13944–13949.
- 109.- Sanchez-Beato, M. et al. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101, 1220–1235.
- 110.- Johnson, S.M. et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120, 635–647.
- 111.- Takamizawa, J. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004; 64, 3753–3756.
- 112.- He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435, 828–833.
- 113.- O'Donnell, K.A. et al. C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435, 839–843.
- 114.- Costinean, S. et al. Pre B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high grade lymphoma in Em miR155 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103, 7024–7029.

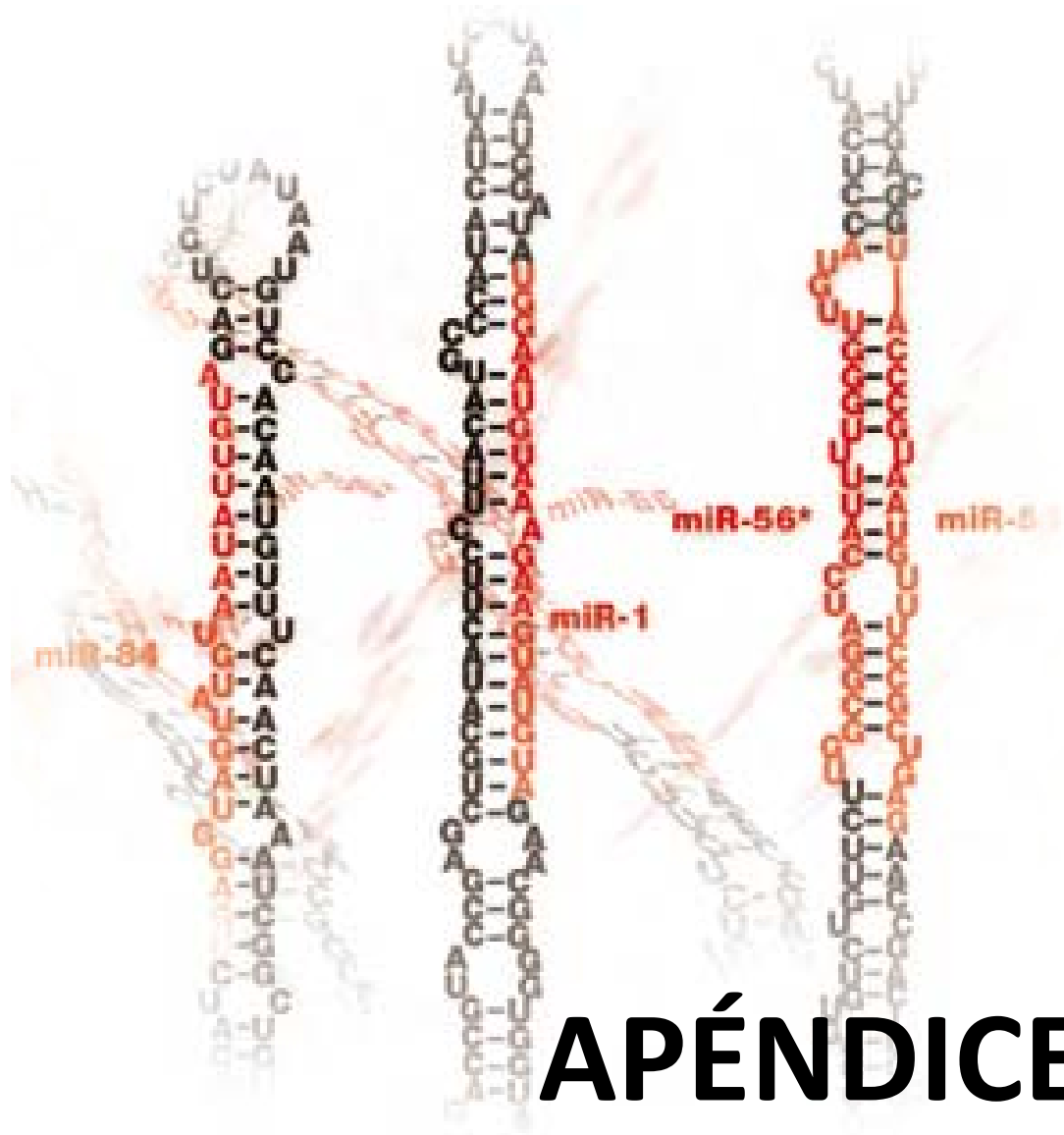
- 115.- Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3, 11–20.
- 116.- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews* 2006; 6, 259–268.
- 117.- Hayashita, Y. et al. A polycistronic microRNA cluster miR-17-92, is over-expressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65, 9628–9632.
- 118.- Calin, G. Oncogenes and tumor suppressor genes – two different looks of the same gene? *Oncol. Rep.* 1994; 1, 987–992.
- 119.- Voorhoeve, P.M. et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124, 1169–1181.
- 120.- Chan, J.A. et al. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65, 6029–6033.
- 121.- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8:286-98.
- 122.- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of *miRNA-127* with downregulation of the proto-oncogene *BCL6* by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9:435-43.
- 123.- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human *miRNA* genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2999-3004.

- 124.- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Gitt A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteler M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced miRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67:1424-9.
- 125.- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. *DNMT1* and *DNMT3b* cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416:552-6.
- 126.- Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, Sultmann H, Lyko F. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated *miRNA* gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007; 67:1419-23.
- 127.- Weber B, Streseman C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human *microRNA* genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007; 6:1001-5.
- 128.- Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor *microRNAs* in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006; 5:2220-2.
- 129.- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:37-50.
- 130.- Lujambio A et al. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* 2007; 6:1455-1459.
- 131.- Smith M, Arthur D, Camitta B, et al: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996; 14:18-24.
- 132.- Ortega JJ: Spanish acute lymphoblastic leukemia trials. *Int J Pediat Hemat Oncol* 1998; 5:163-176.

- 133.- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 2002; 87:154-166.
- 134.- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Late intensification chemotherapy has not improved the results of intensive chemotherapy in adult acute lymphoblastic leukemia: Results of a prospective multicenter randomized trial (PETHEMA ALL-89). *Haematologica* 1998; 83:222-230.
- 135.- Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, et al: Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 trial. *Haematologica* 2001; 86:586-595.
- 136.- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stemcell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 trial. *J Clin Oncol* 2007; 25:16-24.
- 137.- Sancho JM, Ribera JM, Xicoy B, et al: Results of the PETHEMA ALL-96 trial in elderly patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2007; 78:102-110.
- 138.- Fournier C, Goto Y, Ballestar E, et al: *EMBO J* 2002; 21:6560-6570.
- 139.- José-Enériz ES, Román-Gómez J, Cordeu L, et al: *Br J Haematol*, en prensa.
- 140.- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al: *Cell* 2006; 125:301-313.
- 141.- Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, et al: *Hum Mol Genet* 2001; 10:1413-1419.
- 142.- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-9826.

- 143.- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Epigenetic regulation of human cancer/testis antigen gene, HAGE, in chronic myeloid leukemia. *Hematologica* 2007; 92:153-162.
- 144.- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2007; 31:1521-1528.
- 145.- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008; 32:487-490.
- 146.- Megraw M, Sethupathy P, Corda B, et al: MiRGen: A database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:D149-155.
- 147.- Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411:342-348.
- 148.- Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 2001; 264:56-66.
- 149.- He L, He X, Lim LP, et al: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447:1130-1134.
- 150.- Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jimenez-Velasco A, Martin-Subero JI, Cordeu L, et al: Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 2009; 69:4443-4453.
- 151.- Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008; 68:2094-2105.

- 152.- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al: Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68:4123-4132.
- 153.- Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, et al: Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2008; 68:3142-3151.
- 154.- Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al: MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2690-2695.
- 155.- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299:425-436.
- 156.- Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al: Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14:419-427.
- 157.- Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111:3183-3189.
- 158.- Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al: Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68:26-33.
- 159.- Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al: MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13:48-57.



APÉNDICE

Epigenetic Regulation of MicroRNAs in Acute Lymphoblastic Leukemia

Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre, Antonio Jiménez-Velasco, Victor Arqueros, Amaia Vilas-Zornoza, Paula Rodriguez-Otero, Iñaki Martín-Subero, Leire Garate, Lucia Cordeu, Edurne San José-Eneriz, Vanesa Martín, Juan Antonio Castillejo, Eva Bandrés, María José Calasanz, Reiner Siebert, Anabel Heiniger, Antonio Torres, and Felipe Prosper

A B S T R A C T

Purpose

To identify microRNAs (miRNAs) epigenetically regulated in acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Methods

We first examined ALL-derived cell lines for the presence of abnormal levels of two different histone modifications (trimethylation of H3 lysine 4 [K4H3me3] and dimethylation of H3 lysine 9 [K9H3me2]) in the 5'UTR regions around CpG islands of 78 miRNAs by chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-ChIP analysis. Methylation status (methylation-specific polymerase chain reaction [PCR]) and expression (quantitative PCR) of miRNAs showing a pattern of histone modifications linked to a closed chromatin structure were analyzed in a panel of six ALL cell lines and in 353 ALL patients.

Results

CpG islands around 13 miRNAs disclosed high levels of K9H3me2 and/or low levels of K4H3me3, a pattern of histone modifications underlying a closed chromatin structure associated with repressive gene expression. Complete consistency in the correlation between both histone marks, the presence of DNA methylation around these miRNAs, and their expression patterns was confirmed in the six ALL cell lines. Treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine upregulated the expression levels of these genes, suggesting that epigenetic mechanisms deregulate the expression of these miRNAs. A total of 65% of the ALL samples had at least one miRNA methylated (methylated group). Estimated disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) at 14 years were 78% and 71% for nonmethylated patients and 24% and 28% for methylated patients ($P = .00001$ for both). Multivariate analysis demonstrated that methylation profile was an independent prognostic factor for predicting DFS ($P = .0001$) and OS ($P = .0001$).

Conclusion

Aberrant miRNA methylation is a common phenomenon in ALL that affects the clinical outcome of these patients.

J Clin Oncol 27:1316-1322. © 2009 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are noncoding RNAs of 19 to 25 nucleotides in length that regulate gene expression by inducing cleavage or translational inhibition of their targets mRNA through base pairing to partially complementary sites.¹ MiRNAs are involved in controlling cell development, differentiation, apoptosis, and proliferation.¹ In human cancer, recent studies have shown the deregulation of miRNA expression and the contribution of miRNAs to the multistep processes of carcinogenesis either as oncogenes or tumor suppressor genes (TSGs).²⁻³ Tumor-specific downregulation of subsets of miRNAs has generally been observed in various types of human cancer,⁴ suggesting that some of these miRNAs act as

TSGs in specific tumors. Because the downregulation of many known TSGs has been tightly linked to epigenetic mechanisms like histone modifications and also hypermethylation of CpG islands with promoter activity, the same mechanisms could play an important role in the silencing of tumor-suppressive miRNAs in tumors. In fact, examples of DNA methylation-based regulation of microRNAs have been recently described.⁵⁻¹⁴

We have extensively demonstrated in acute lymphoblastic leukemia (ALL) that hypermethylation of promoters is a frequent mechanism of gene silencing and a finding associated with the prognosis and the response to therapy.¹⁵⁻¹⁸ Methylation in ALL participates in the inactivation of three key cellular pathways: growth-deregulating events

From the Hematology Department, Reina Sofia Hospital, Cordoba; Hematology Department, Cellular Therapy Area, Clinica Universitaria/School of Medicine, Foundation for Applied Medical Research; Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona; Hematology Department, Carlos Haya Hospital, Malaga, Spain; and the Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel/Christian-Abrechts University Kiel, Germany.

Submitted August 4, 2008; accepted October 3, 2008; published online ahead of print at www.jco.org on January 21, 2009.

Supported by grants from Beca Ortiz de Landázuri 2006, Departamento de Salud-Gobierno de Navarra; Grants No. PI070602, PI070608, PI060003, CP07/00215, and RD06/0020 from the Fondo de Investigación Sanitaria (Spain); Grants No. 0386/2006 and 0004/2007 from Junta de Andalucía; Kinder-Krebs-Initiative Buchholz, Holm-Seppensen (K.K.I.) and funds from AMI and "UTE project CIMA".

J.R.-G. and X.A. contributed equally to this work.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Jose Roman-Gomez, MD, Hematology Department, Reina Sofia Hospital. Avda. Menéndez Pidal s/n. 14004 Cordoba. Spain; e-mail: peperosa@teleline.es.

The Appendix is included in the full-text version of this article, available online at www.jco.org. It is not included in the PDF version (via Adobe® Reader®).

© 2009 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/09/2708-1316/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2008.19.3441

comprising those that target the principal late G1 cell-cycle checkpoint and those that regulate the G2-M transition; the apoptotic program; and the cell-cell adhesion. Moreover, patient-specific methylation profile provides important prognostic information in ALL patients. The presence in individual tumors of multiple epigenetic events that affect each of the pathways discussed above is a factor of poor prognosis in ALL.¹⁵⁻¹⁸

All these data suggest the putative presence of DNA methylation-associated silencing of miRNAs in ALL cells. To explore this hypothesis, we used an approach with a series of sequential analyses. We first examined ALL-derived cell lines for the presence of abnormal levels of two different histone modifications around CpG islands of 78 miRNAs and then focused on 13 of them that showed a pattern of histone modifications linked to a closed chromatin structure. All these miRNAs disclosed downregulated expression related to their DNA methylation status. Methylation and expression analyses using 353 primary ALL cases showed that aberrant methylation affecting a wide range of miRNA genes is a common phenomenon in ALL and has prognostic impact in this group of patients.

PATIENTS AND METHODS

Cell Lines and Patients

We studied six ALL-derived cell lines (TOM-1, NALM-20, MY, LOUCY, MOLT-4, and TANOUE) and 353 consecutive patients (210 male; 143 female) with de novo ALL who were enrolled in successive multicenter studies of the Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas (PETHEMA) group. Patients were referred to the Reina Sofia Hospital of Cordoba, Spain, from January 1989 to December 2006. The median age in the study population was 15 years (range, 0.3 to 82 years). Of these, 179 were children (median age, 5 years; range, 0.3 to 14 years) and 174 adults (median age, 29 years; range, 15 to 82 years). The study was approved by the institutional review board at the Reina Sofia Hospital. Informed consent was obtained from the patient or the patient's guardians. Diagnosis was established according to standard criteria. Patients were risk stratified according to the therapeutic protocol used and were entered in ALL protocols of the PETHEMA group. For statistical analyses, children were also grouped according to the National Cancer Institute (NCI) risk classification criteria.¹⁹ The specific PETHEMA ALL treatment protocols in which these patients entered included ALL-89 (n = 51), ALL-93 (n = 256), and ALL-96 (n = 46). The design and results of these studies have been previously reported.²⁰⁻²⁵ One hundred twenty-seven patients relapsed. Sixty patients received stem cell transplantation (13 autologous, 47 allogeneic) in the first (n = 35) or second complete remission (CR; n = 25). There are 175 patients currently alive. Clinical characteristics of the patients are listed in Table 1. Some of these patients (n = 272) were typed previously for methylation of 27 cancer-related genes to determine the CpG island methylator phenotype (CIMP).¹⁵⁻¹⁶

Chromatin Immunoprecipitation and Chromatin Immunoprecipitation-on-Chip

Peripheral blood lymphocytes from healthy donors, TOM-1 and NALM-20 cell lines were subjected to chromatin immunoprecipitation (ChIP) in order to assess the trimethylation of H3 lysine 4 (K4H3me3) and dimethylation of H3 lysine 9 (K9H3me2). The immunoprecipitated fractions from ChIP experiments were labeled and used to probe the Agilent Human CpG Island microarray. A detailed description of these experiments is supplied in the Appendix (online only).

MiRNA Methylation and Expression Analyses

Methylation status was analyzed by methylation-specific PCR (MSP) using primers specific for either the methylated or bisulfite modified unmethylated DNA (Appendix Table A1, online only). Expression of the different miRNAs was analyzed using specific primers and TaqMan probe according

Table 1. Clinical Characteristics and Outcome of ALL Patients According to MicroRNA Methylation Status (N = 353)

Feature	No.		P
	Non-Methylated (n = 123)	Methylated (n = 230)	
Age, years			.003
< 15	76	103	
> 15	47	127	
Sex (male/female)	67/56	143/87	NS
WBC, ×10 ⁹ /L			.007
< 50	101	141	
> 50	22	89	
FAB classification			NS
L1	55	80	
L2	63	140	
L3	5	10	
Blast lineage			NS
B cell	104	183	
T cell	19	47	
NCI risk groups			NS
Standard	60	68	
Poor	16	35	
PETHEMA risk groups			NS
Standard	50	78	
Poor	73	152	
Treatment			NS
PETHEMA 89	17	34	
PETHEMA 93	87	169	
PETHEMA 96	19	27	
SCT	20	40	NS
Best response			NS
CR	112	202	NS
Cytogenetic/molecular abnormalities			
BCR-ABL	20	61	.03
t(1;19)	4	2	NS
11q23	1	1	NS
MYC	2	3	NS
7q35-14q11	2	3	NS
TEL-AML1	16	40	NS
Normal	70	113	NS
Other	3	1	NS
Nontested	5	6	NS
Relapse	22	105	< .001
Death	37	141	< .001

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; FAB, French-American-British; NCI, National Cancer Institute; PETHEMA, Programa para el estudio y tratamiento de las hemopatías malignas; SCT, stem cell transplantation; CR, complete remission; NT, nontested.

to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA). A detailed description of these techniques is supplied in the Appendix.

Statistical Analysis

For statistical purposes, ALL patients were classified into two different methylation groups: nonmethylated (no methylated genes) and methylated group (at least, one methylated gene). The rationale for grouping patients with any methylated gene (regardless of the number of methylated genes) in the same methylation group was derived after statistical analyses (relapse rate, mortality rate, disease-free survival [DFS], and overall survival [OS]) according with the number of gene methylated (from 0 to 10). Results of these analyses showed that prognosis for nonmethylated patients was better than patients with methylated genes (including those with only one methylated gene). Moreover, prognosis of patients from 1 to 10 methylated genes was similar with no statistical differences. *P* values for comparisons of continuous variables were two tailed and based on the Wilcoxon rank sum test. *P* values for

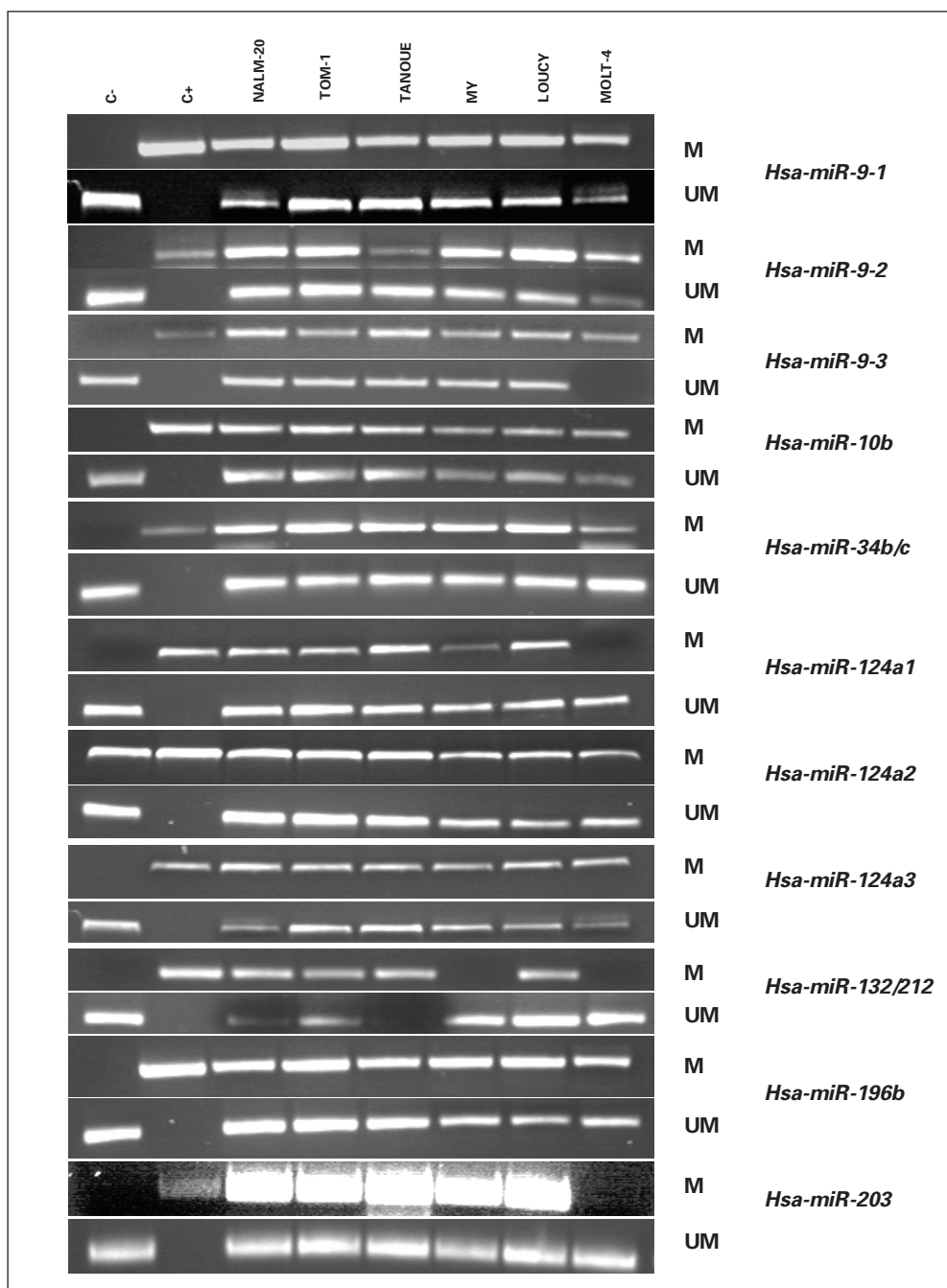


Fig 1. Methylation analysis of microRNA genes in acute lymphoblastic leukemia (ALL)-derived cell lines. MSP, analysis of the methylated and unmethylated sequences in different ALL cell lines; C-, unmethylated control (peripheral blood lymphocytes from healthy donors); C+, methylated control.

dichotomous variables were based on the Fisher's exact test. The remaining P values were based on the Pearson χ^2 test. OS was measured from the day of diagnosis until death from any cause and was censored only for patients known to be alive at last contact. DFS was measured from the day that CR was established until either relapse or death without relapse, and it was censored only for patients who were alive without evidence of relapse at the last follow-up. Distributions of OS and DFS curves were estimated by the method of Kaplan and Meier, with 95% CIs calculated by means of Greenwood's formula. Patients who underwent stem cell transplantation were included but censored at the date transplant. Univariate and multivariate analyses (logistic regression model) were used to determine the factors associated with DFS and OS. Stepwise modeling was performed to screen potential variables for inclusion in the final model. Entry criteria for the multivariable Cox regression

analysis was a P value lower than .1 in univariate analysis. P values of no more than .05 were taken as the threshold for statistical significance in the final model. All relapse and survival data were updated on December, 2007, and all follow-up data were censored at that point.

RESULTS

K9H3me2 and K4H3me3 Modifications Overlap miRNA Genes

We observed that 78 CpG islands of the Agilent Human CpG Island microarray used for the ChIP-on-Chip analysis embedded or

were close to one miRNA. Analysis revealed that 13 of this 78 CpG islands (*hsa-miR-9-1*, *-9-2*, *9-3*, *-10b*, *-34b*, *-34c*, *-124a1*, *-124a2*, *-124a3*, *-132*, *-196b*, *-203* and *-212*) showed a decrease of K4H3me3 and/or increase of K9H3me2 marks in ALL cell lines respect to healthy lymphocytes (Appendix Fig A1, online only). These results were further confirmed by quantitative ChIP PCR assay (Appendix Fig A2, online only). All these miRNAs linked to a closed chromatin structure were chosen for further methylation analyses. As control for methylation analysis we also studied the *hsa-miR-320* which is not associated with closed chromatin marks (Fig A1).

Expression of miRNAs in ALL Cell Lines Is Regulated by CpG Island Hypermethylation

We analyzed the expression of nine miRNAs (all the *hsa-miR-124a* genes produce an unique *hsa-miR-124a* transcript and the same occurs with the *hsa-miR-9* genes) and the methylation status of 11 CpG island associated with these miRNAs (*hsa-miR-34b* and *-34c* are controlled by the same CpG island and the same occurs with *hsa-miR-132* and *-212* genes) in ALL-derived cell lines and lymphoblasts from ALL patients. Methylation of miRNAs was observed in every cell line but not in healthy lymphocytes (Fig 1). However, healthy lymphocytes displayed *hsa-miR-124a2* methylation (Fig 1). Therefore, a quantitative real-time MSP was performed to quantify *hsa-miR-124a2* methylation (Appendix). By quantitative real-time MSP, CpG island of the *hsa-miR-124a2* was hypermethylated in all ALL-derived cell lines studied (mean normalized ratio, 180% \pm 38%). As expected, *hsa-miR-320* (no linked to a closed chromatin structure) was unmethylated in cell lines (Appendix Fig A3, online only).

Methylation was associated with downregulation of miRNA expression which was further demonstrated by restored gene expression after treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine in TOM-1 and NALM-20 cell lines (Appendix Fig A4, online only). Among 353 ALL patients (Table 1), the methylation frequencies (in descending order)

were as follows: 49% for *hsa-miR-124a1*, 46% for *hsa-miR-124a2*, 42% for *hsa-miR-124a3*, 34% for *hsa-miR-34b/c*, 34% for *hsa-miR-9-1*, 33% for *hsa-miR-9-3*, 25% for *hsa-miR-10b*, 27% for *hsa-miR-203*, 25% for *hsa-miR-196b*, 21% for *hsa-miR-9-2*, and 7% for *hsa-miR-132/212*. No methylated miRNAs were found in 123 of 353 patients (nonmethylated group, 35%) whereas most ALLs (230 [65%] of 353) had methylation of at least one miRNA (methylated group), ranging from one to 10 methylated genes. As expected, methylated patients showed significant downregulation of the representative miRNA expressions compared with nonmethylated patients (Appendix Fig A5, online only). The presence of methylation in 27 cancer-related genes was determined previously for 272 of these cases.¹⁵⁻¹⁶ There was a significant concordance between miRNA methylation and the presence of a methylator phenotype (CIMP); miRNA methylation was present in 146 of 186 (78%) CIMP-positive tumors (> two methylated genes) versus 40 of 86 (49%) CIMP-negative (0 to 2 methylated genes) tumors ($P = .001$).

Clinical Outcome and Methylation Profile

As presented in Table 1, adult ALL (127 of 174 [73%] v 103 of 179 [57%]; $P = .003$), high WBC counts at diagnosis (89 of 111 [80%] v 141 of 242, [58%]; $P = .007$) and *BCR-ABL* positivity (61 of 81 [75%] v 164 of 272 [60%]; $P = .03$), were significantly associated with the methylated group. However, other features were similarly distributed among both methylation groups.

Table 1 details the relapse history, CR rates, and mortality for patients included in the different methylation groups. CR rates of patients in the nonmethylated and methylated groups were 91% and 88%, respectively, accounting for 90% of the overall CR rate. This suggests that methylation profile did not correlate with response to remission induction therapy. However, patients in the nonmethylated group had a lower relapse rate than patients in the methylated group (22 of 111 [20%] v 105 of 184 [57%]; $P < .001$). Mortality rate was also

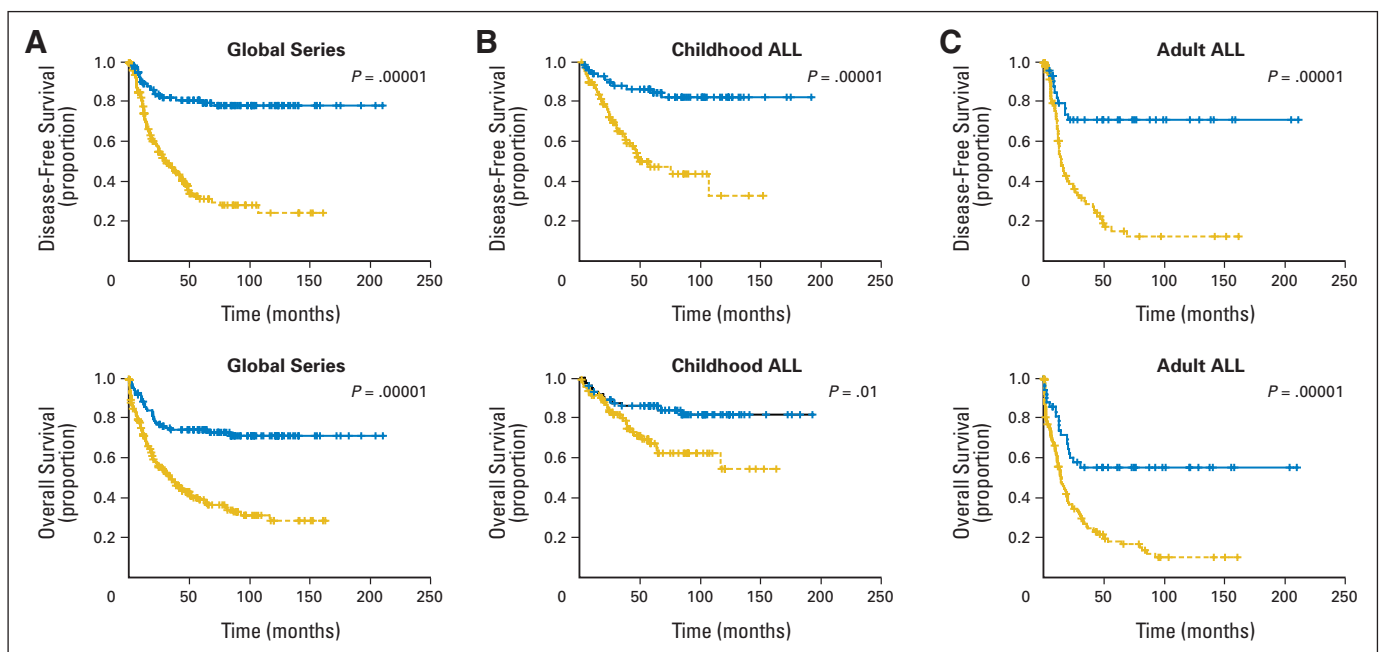


Fig 2. Kaplan-Meier survivor function for acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) curves for (A) all the patients enrolled in this study, (B) childhood ALL, and (C) adult ALL according to the methylation profile. Blue lines, nonmethylated patients; yellow lines, methylated patients.

lower for nonmethylated group compared with methylated group (37 of 123 [30%] v 141 of 230 [61%]; $P < .001$). Similar results were obtained in the separate analyses of children (relapse rate, 15% for nonmethylated group v 45% for methylated group; $P = .0001$; mortality rate, 17% for nonmethylated group v 30% for methylated group; $P = .046$) and adults (relapse rate, 27% for nonmethylated group v 68% for methylated group; $P = .0001$; mortality rate, 43% for nonmethylated group v 79% for methylated group; $P = .0001$).

We analyzed DFS among patients who achieved CR according to the methylation profile. Estimated DFS rates at 14 years were 78% and 24% for nonmethylated and methylated group ($P = .00001$; Fig 2A). Among children, the 14-year DFS was 82% for nonmethylated group and 33% for methylated group ($P = .00001$; Fig 2B). Among adult patients, the 14-year DFS was 70% for nonmethylated group and 12% for methylated group ($P = .00001$; Fig 2C). The actuarial OS at 14 years calculated for all leukemic patients was 71% for nonmethylated patients and 28% for methylated patients ($P = .00001$; Fig 2A). Significant differences were observed in the actuarial OS among nonmethylated and methylated groups in the separate analyses of children (81% v 54%; $P = .01$; Fig 2B) and adults (55% v 10%; $P = .00001$; Fig 2C).

A multivariate analysis of potential prognostic factors demonstrated that hypermethylation profile was an independent prognostic factor in predicting DFS in the global series ($P = .0001$) as well as in childhood ALL ($P = .0001$) and adult ALL ($P = .0001$; Table 2). Methylation status was also independently associated with OS in the global series ($P = .0001$), childhood ALL ($P = .019$), and adult ALL ($P = .001$; Table 2).

Prognostic Impact of the Methylation Profile in Selected Risk Groups

In order to determine the prognostic impact of the methylation profile in ALL groups with well-established prognostic factors, we analyzed DFS and OS in *TEL-AML1*- and *BCR-ABL*-positive patients and also in patients with high WBC count ($> 50,000 \text{ mm}^3$) at diagnosis. Among *TEL-AML1*-positive children ($n = 56$), the 10-year DFS was 93% for nonmethylated group and 53% for methylated group ($P = .01$; Fig 3A). The actuarial OS at 12 years for the same patients was 100% for nonmethylated patients and 77% for methylated patients ($P = .05$; Fig 3A). Among *BCR-ABL*-positive patients ($n = 81$), the 9-year DFS was 58% for nonmethylated patients and 4% for methylated patients ($P = .0009$; Fig 3B). Estimated 9-year OS was 53% for nonmethylated *BCR-ABL* patients and 3% for methylated patients ($P = .0002$; Fig 3B). Among ALL patients with high WBC count at diagnosis ($n = 111$), DFS at 11 years was 72% for nonmethylated patients and 25% for methylated patients ($P = .009$; Fig 3C). Estimated 11-year OS for these patients was 56% for nonmethylated patients and 22% for methylated patients ($P = .02$; Fig 3C).

DISCUSSION

This study clearly shows that an integrated and sequential approach using ChIP-on-chip for histone modifications, methylation, and expression analyses makes it possible to efficiently identify putative tumor suppressor miRNAs silenced by tumor-specific DNA methylation in cancer cells. Our data show marked differences in the levels of K4H3me3 and K9H3me2 between healthy lymphocytes and ALL-

Feature	P for Analysis	
	Univariate	Multivariate
DFS		
Global series		
MicroRNA methylation	< .001	< .001
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	.004	NS
BCR-ABL positivity	< .0001	< .001
T-phenotype	.1	NS
Age > 15 years	< .001	< .001
PETHEMA poor risk	.05	NS
Childhood ALL		
MicroRNA methylation	< .001	< .001
NCI poor risk	.04	NS
T-phenotype	.05	NS
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	.04	NS
Adult ALL		
MicroRNA methylation	< .001	< .001
T-phenotype	.1	NS
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	.01	NS
BCR-ABL positivity	< .001	< .001
OS		
Global series		
MicroRNA methylation	< .001	< .001
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	< .001	.07
BCR-ABL positivity	< .001	< .001
T-phenotype	.1	NS
Age > 15 years	< .001	< .001
PETHEMA poor risk	.08	NS
Childhood ALL		
MicroRNA methylation	.015	.019
NCI poor risk	.09	NS
T-phenotype	.001	.001
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	.063	NS
Adult ALL		
MicroRNA methylation	< .001	< .001
WBC > 50 × 10 ⁹ /L	.011	NS
BCR-ABL positivity	< .001	< .001
T-phenotype	.1	NS

Abbreviations: DFS, disease-free survival; OS, overall survival; NS, not significant; PETHEMA, Programa para el estudio y tratamiento de las hemopatías malignas; NCI, National Cancer Institute; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

derived cells. In fact, CpG islands near to 13 miRNAs disclosed high levels of K9H3me2 and/or low levels of K4H3me3. This pattern of histone modifications is known to mark a closed chromatin structure associated with repressive gene expression. Moreover, complete consistency in the correlation between both histone marks, the presence of DNA methylation around these miRNAs, and their expression patterns was confirmed in a panel of six ALL cell lines. In addition, treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine upregulated the expression levels of these genes, strongly suggesting that epigenetic mechanisms around CpG islands seemed to deregulate the expression of these miRNAs in ALL cell lines. Importantly, miRNAs methylation was also observed in primary tumor samples from a large series of ALL patients. At least, one methylated miRNA was observed in 65% of our patients at diagnosis, supporting for a role of the miRNA methylation in the early phases of lymphoid leukemogenesis.

MiRGen webserver was used to determine lists of putative gene targets of methylated miRNAs in ALL.²⁶ The target list was

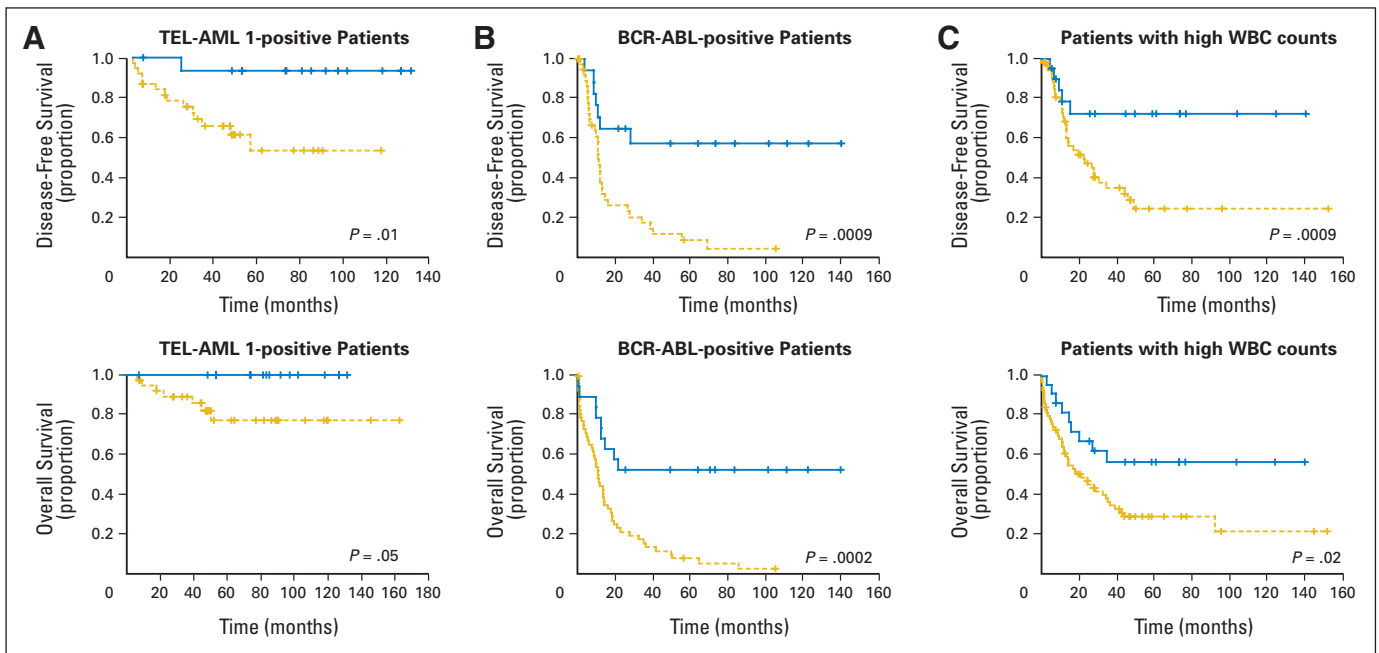


Fig 3. Kaplan-Meier survivor function for selected prognostic groups of acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) curves for (A) *TEL-AML1*-positive ALL patients, (B) *BCR-ABL*-positive ALL patients, and (C) patients with high WBC at diagnosis according to the methylation profile. Blue lines, nonmethylated patients; yellow lines, methylated patients.

interestingly enriched for genes involved in cell proliferation/apoptosis (Appendix Table A2, online only). These abnormalities are not surprising. Beneath the complexity of every cancer lies a limited number of mission-critical events that have propelled the tumor cell and its progeny into uncontrolled expansion and invasion. One of these is deregulated cell proliferation, which, together with the compensatory suppression of apoptosis needed to support it, provides a minimal platform necessary to support further neoplastic progression.²⁷ Our previously reported data¹⁵⁻¹⁸ and these results show that in ALL this common platform can be achieved by a methylation mechanism affecting not only classical TSG but also miRNAs.

Although genetic abnormalities of key TSGs, such as *RB* and *p53*, are the most common molecular lesions in human cancer,²⁸ they are less frequent in ALL.²⁹ We have previously demonstrated that methylation in ALL cells can help to inactivate tumor-suppressive apoptotic or growth-arresting responses by deregulation of the cyclin-dependent kinases that phosphorylate and functionally inactive RB protein and either upstream or downstream of *p53* and also inactivating *p73* which encodes for a protein that is homologous to the *p53* protein.¹⁵⁻¹⁸ Our present results suggest that methylation of *hsa-miR-34* and *miR-124a* may cooperate with above mentioned pathways inactivating these classical TSGs. Recently, *miR-34* family was shown to be direct transcriptional target of *p53*,³⁰ indicating that *miR-34* play a pivotal role in the *p53* tumor suppressor network. Interestingly, miRNAs of the *miR-124a* family were the most frequently methylated genes in ALL samples and the majority of patients included in the methylated group showed, at least, methylation of one member of this family. It has been previously demonstrated that *CDK6* (which is involved in cell cycle progression and differentiation) is a direct target of *miR-124a*.⁶ Our group has recently demonstrated that the

epigenetic loss of *miR-124a* increases *CDK6* activation and phosphorylation of retinoblastoma and contributes to the abnormal proliferation of ALL cells both in vitro and in vivo (unpublished results). Taken together, these data imply that in ALL too there is a strong selection for tumor cells to lose critical TSG functions, but in this case, indirectly through an alternative epigenetic way. Interestingly, this indirect mechanism is not only restricted to ALL, because methylation of *hsa-miR-124a* and *miR-34b/c* has been also observed in other malignancies.^{6,12,31-32}

Recent studies have reported the relevance of miRNA expression profiles to the progression of particular tumors.³³⁻³⁸ However, there are not reports concerning the prognostic impact of miRNA methylation profile. In this study, we show that methylation of miRNAs is different in individual tumors within the same tumor type, and this patient-specific methylation profile provides important prognostic information in ALL. The presence in individual tumors of miRNA epigenetic events is a factor of poor prognosis in both childhood and adult ALL. Patients with miRNA methylation had a poorer DFS and OS than unmethylated patients. Multivariate analysis confirmed that methylation profile was associated with a shorter DFS and OS. Moreover, methylation status was able to redefine the prognosis of selected ALL groups with well-established prognostic features. Lack of miRNA methylation improved the general poor outcome of patients presenting Philadelphia chromosome or high WBC counts, whereas presence of methylation worsened the general good outcome of *TEL-AML1*-positive patients. Therefore, miRNA methylation profiling in ALL could have important clinical implications complementing standard immunophenotypic, cytogenetic, and molecular studies for guiding the selection of therapy and providing a basis for developing novel therapies.

In summary, our results indicate that aberrant methylation affecting miRNA genes is a common phenomenon in ALL. The methylation profile seems to be an important factor in predicting the clinical outcome of ALL patients.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre

Provision of study materials or patients: Jose Roman-Gomez, Antonio Jiménez-Velasco, Victor Arqueros, Vanesa Martin, Juan Antonio Castillejo
Collection and assembly of data: Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre, Antonio Jiménez-Velasco, Amaia Vilas-Zornoza, Paula Rodriguez-Otero, Iñaki Martin-Subero, Leire Garate, Lucia Cordeu, Edurne San José-Eneriz, Eva Bandrés, Maria Jose Calasanz
Data analysis and interpretation: Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre, Amaia Vilas-Zornoza, Paula Rodriguez-Otero, Iñaki Martin-Subero, Leire Garate, Lucia Cordeu, Edurne San José-Eneriz, Eva Bandrés, Maria Jose Calasanz
Manuscript writing: Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre
Final approval of manuscript: Jose Roman-Gomez, Xabier Agirre, Antonio Jiménez-Velasco, Victor Arqueros, Amaia Vilas-Zornoza, Paula Rodriguez-Otero, Iñaki Martin-Subero, Leire Garate, Lucia Cordeu, Edurne San José-Eneriz, Vanesa Martin, Juan Antonio Castillejo, Eva Bandrés, Maria Jose Calasanz, Reiner Siebert, Anabel Heiniger, Antonio Torres, Felipe Prosper

REFERENCES

- Bartel D: MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297, 2004
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269, 2006
- Osada H, Takahashi T: MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 28:2-12, 2007
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838, 2005
- Saito Y, Liang G, Egger G, et al: Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435-443, 2006
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al: Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67:1424-1429, 2007
- Fazi F, Racanich S, Zardo G, et al: Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* 12:457-466, 2007
- Lu L, Katsaros D, Rigault de la Longrais IA, et al: Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 67:10117-10122, 2007
- Han L, Witmer PD, Casey E, et al: DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol Ther* 6:e1-e5, 2007
- Lehmann U, Hasemeier B, Chistgen M, et al: Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 214:17-24, 2008
- Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al: The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 67:1419-1423, 2007
- Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 68:2094-2105, 2008
- Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, et al: Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-mir-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 27:3880-3888, 2008
- Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al: Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 13:496-506, 2008
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, et al: Promoter hypermethylation of cancer-related genes: A strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 104:2492-2498, 2004
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, et al: Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* 23:7043-7049, 2005
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, et al: CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 12:4845-4850, 2006
- Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, et al: Epigenetic regulation of WNT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109:3462-3469, 2007
- Smith M, Arthur D, Camitta B, et al: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14:18-24, 1996
- Ortega JJ: Spanish acute lymphoblastic leukemia trials. *Int J Pediatr Hematol Oncol* 5:163-176, 1998
- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 87:154-166, 2002
- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Late intensification chemotherapy has not improved the results of intensive chemotherapy in adult acute lymphoblastic leukemia: Results of a prospective multicenter randomized trial (PETHEMA ALL-89). *Haematologica* 83:222-230, 1998
- Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, et al: Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 trial. *Haematologica* 86:586-595, 2001
- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, et al: Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic, or autologous stem-cell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 trial. *J Clin Oncol* 25:16-24, 2007
- Sancho JM, Ribera JM, Xicoy B, et al: Results of the PETHEMA ALL-96 trial in elderly patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 78:102-110, 2007
- Megraw M, Sethupathy P, Corda B, et al: MiRGen: A database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* 35:D149-155, 2007
- Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348, 2001
- Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264:56-66, 2001
- Wada M, Bartram CR, Nakamura H, et al: Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 82:3163-3169, 1993
- He L, He X, Lim LP, et al: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447:1130-1134, 2007
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al: Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 68:4123-4132, 2008
- Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, et al: Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 68:3142-3151, 2008
- Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al: MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:2690-2695, 2008
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 299:425-436, 2008
- Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al: Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 14:419-427, 2008
- Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111:3183-3189, 2008
- Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al: Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 68:26-33, 2008
- Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al: MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 13:48-57, 2008