

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**ANALISIS DEL GRADO DE METILACION
DEL GEN DE LA CALCITONINA
EN PACIENTES CON LEUCEMIAS AGUDAS**

Juan Antonio Castillejo Enríquez

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Córdoba.**

Córdoba, 2001

D. ANTONIO TORRES GOMEZ, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Córdoba,

D. JOSE ROMAN GOMEZ, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Córdoba

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “*ANÁLISIS DEL GRADO DE METILACIÓN DEL GEN DE LA CALCITONINA EN PACIENTES CON LEUCEMIAS AGUDAS*” ha sido realizada por el Licenciado en Medicina y Cirugía **Juan Antonio Castillejo Enríquez** bajo nuestra dirección, y reúne, a nuestro juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Fdo:
Antonio Torres Gómez

Fdo:
José Román Gómez

Córdoba, 22 de Febrero de 2001

INDICE

<u>I. INTRODUCCION</u>	1
<u>I-A. METILACION DEL ADN</u>	2
I-A. 1. Distribución de citosinas metiladas e islas CpG	3
I-A. 2. Metiltransferasas de ADN	5
I-A. 3. Técnicas para estudiar la metilación del ADN	6
I-A. 4. Metilación del ADN y represión transcripcional	9
I-A. 5. Metilación del ADN y cáncer	14
I-A. 5. 1. Mutaciones C-T en células cancerígenas	14
I-A. 5. 2. Hipometilación del ADN y cáncer	15
I-A. 5. 3. Hipermetilación de genes supresores de tumores	15
I-A. 5. 4. Inducción de inestabilidad cromosómica	17
I-A. 6. Alteración en la actividad de la ADN-Mtasa en el cáncer	20
I-A. 7. Implicaciones clínicas y terapéuticas de la metilación del ADN	22
<u>I-B. LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA</u>	24
I-B. 1. Caracterización biológica de las células leucémicas	24
I-B. 2. Valoración del riesgo	28
<u>I-C. GEN DE LA CALCITONINA Y METILACION</u>	34
I-C. 1. Ciclo celular y p57KIP2	35
I-C. 1. 1. Cinasas dependientes de Ciclinas (CdKs)	36
I-C. 1. 2. Ciclinas	37
I-C. 1. 3. Complejos CdK/Ciclinas	38
I-C. 1. 4. Inhibidores de CdKs	40
<u>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</u>	42
<u>III. HIPOTESIS</u>	44
<u>IV. MATERIAL Y METODOS</u>	46
<u>IV-A. PACIENTES</u>	47
<u>IV-B. METODOS</u>	53
IV-B. 1. Detección del fenotipo inmunológico	53
IV-B. 2. Citogenética	54

IV-B. 3. Aislamiento de Acidos Nucleicos	54
IV-B. 3. 1. Extracción del ADN	54
IV-B. 3. 2. Extracción del ARN	55
IV-B. 4. Digestión de restricción y técnica PCR para detectar metilación en el gen CALC1	55
IV-B. 5. Análisis RT-PCR para la expresión de p57KIP2	59
IV-B. 6. Otros análisis moleculares	61
IV-B. 7. Análisis estadístico	62
<u>V. RESULTADOS</u>	63
<u>V-A. ESTADO DE METILACIÓN DEL GEN CALC1 EN POBLACION NORMAL</u>	64
<u>V-B. ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1 EN LA SERIE GLOBAL</u>	64
<u>V-C. ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1 EN LAL DEL ADULTO E INFANTIL</u>	66
<u>V-D. EXPRESION p57KIP2 EN PACIENTES HIPERMETILADOS E HIPOMETILADOS</u>	67
<u>VI. DISCUSION</u>	71
<u>VII. CONCLUSIONES</u>	79
<u>VIII. BIBLIOGRAFIA</u>	81

I. INTRODUCCION

I-A. METILACIÓN DEL ADN

Desde su primera descripción en 1948, la quinta base del ADN humano, la 5-metilcitosina (5-mC) ha generado mucho interés y considerable controversia en los intentos de comprender su significado. La metilación del ADN en las células eucariotas implica la adición de un grupo metilo al carbono de la posición 5 del anillo de la citosina (**Figura 1**). Esta reacción está catalizada por una metiltransferasa de ADN en el contexto de la secuencia 5'-CG-3'. A dicha secuencia también se le llama dinucleótido CpG. Es la más común de las modificaciones del ADN eucariota y uno de los muchos fenómenos epigenéticos (alteración en la composición génica sin cambio en la secuencia de nucleótidos) que ocurren en éste. Aunque extensivo a plantas y mamíferos, la ausencia de metilación del ADN detectable en algunos eucariotas tales como *Drosophila*¹ y *Saccharomyces cerevisiae*² han aumentado las dudas sobre su significado en el desarrollo normal y en la expresión génica específica de tejidos. Sin embargo, estudios recientes muestran un desarrollo anormal y letalidad embriónica en ratones transgénicos que muestran una disminución aunque no una actividad metiltransferasa de ADN completamente ausente después del bloqueo del gen DNA-Mtasa³, prestándole apoyo a un papel crítico de la metilación del ADN en el desarrollo de la expresión génica. Otros autores han propuesto que el control de parásitos intragenómicos es la función primaria de la metilación del ADN en células de mamíferos⁴.

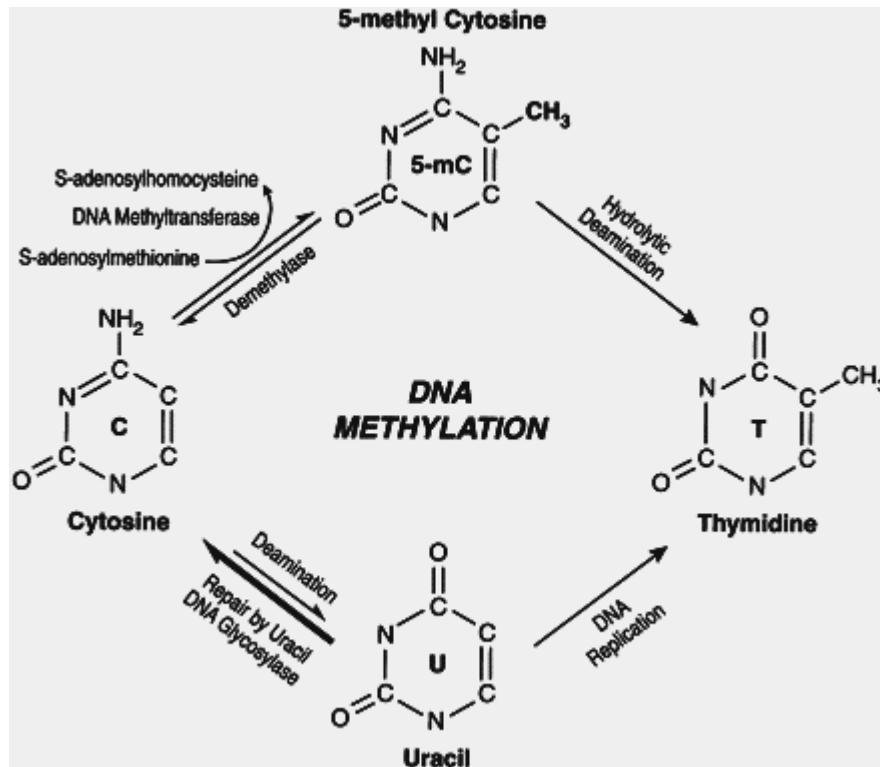


Figura 1. Representación esquemática de las rutas bioquímicas para la metilación, desmetilación y mutagénesis de la citosina y 5-mC. (Tomado de Singal R et al. *Blood* 1999; 93: 4059-4070).

I-A. 1. DISTRIBUCION DE CITOSINAS METILADAS E ISLAS CpG.

Los genomas eucariotas no están metilados uniformemente sino que contienen regiones metiladas interpuestas con dominios no metilados⁵. Durante la evolución, los dinucleótidos CpG han sido progresivamente eliminados del genoma de eucariotas superiores y están presentes solamente en un 5% a 10%⁶⁻⁸. La metilación de la citosina parece haber jugado un papel importante en este proceso, porque la mayoría de los sitios CpG perdidos representan la conversión a través de desaminación de metilcitosinas a timinas. Aproximadamente el 70%-80% de los sitios CpG que quedan

contienen citosinas metiladas en la mayoría de los vertebrados, incluyendo los humanos^{6, 8}. Estas regiones metiladas son típicas de la cromatina densa, la cual representa el ADN replicante tardío con su composición de histonas correspondientes y relativamente inaccesible a los factores de transcripción⁹. Al contrario del resto del genoma, regiones más pequeñas de ADN, llamadas islas CpG, con tamaños que varían entre 0.5 a 5 kb y presentándose cada 100 kb como media, tienen propiedades distintas. Estas regiones no están metiladas, son ricas en GC (60%-70%), tienen un ratio de CpG a GpC de al menos 0.6 y por tanto no muestran ninguna supresión de la frecuencia de dinucleótidos CpG^{6, 10}. La cromatina que contienen las islas CpG está generalmente fuertemente acetilada, falta la histona H1 e incluye una región libre de nucleosoma⁹. Esta también llamada configuración abierta de la cromatina puede permitir, o ser una consecuencia, de la interacción de los factores de transcripción con los promotores del gen¹⁰.

Los patrones de metilación del ADN reflejan dos tipos de regiones reguladoras 5' en el genoma. Aproximadamente la mitad de todos los genes en ratones y humanos (v. g. 40.000 a 50.000) contienen islas CpG⁶. Estos son principalmente genes domésticos que tienen un amplio patrón tisular de expresión, pero aproximadamente el 40% de los genes con patrón restrictivo tisular de expresión están también representados¹⁰. Las islas CpG de la región promotora están normalmente no metiladas en todos los tejidos normales, independientemente de la actividad transcripcional del gen. Las excepciones principales incluyen los genes no transcritos del cromosoma X inactivado y genes autosómicos "imprinted" donde uno de los alelos paternos puede estar metilado¹¹. Los genes específicos de tejidos sin islas CpG están metilados de forma variable, frecuentemente en un patrón específico de tejido, y en general la

metilación está inversamente correlacionada con el estado de transcripción de los genes^{12, 13}.

I-A. 2. METILTRANSFERASAS DE ADN.

Las enzimas que transfieren grupos metilos a la cadena de citosina, metiltransferasa 5'-citosina, o metiltransferasa de ADN (ADN-MTasa) han sido descritas en un número amplio de organismos eucariotas¹⁴. El sitio diana para la ADN-MTasa en el ADN es el dinucleótido palindrómico CG (frecuentemente llamado como CpG, donde la p hace referencia al grupo fosfato). El primer gen ADN-MTasa eucariota clonado de ratón hace casi una década¹⁵ es hoy día referido como *Dnmt1*. Este gen está altamente conservado entre los eucariotas. *Dnmt1* ortólogos se han identificados en varias especies, incluyendo humanos (*DNMT1*)¹⁶. De forma interesante, *Dnmt1* ortólogos no se hallan en organismos sin metilación del ADN, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, y *Drosophila melanogaster*.

La *Dnmt1* metiltransferasa mamífera tiene una alta afinidad por los substratos hemimetilados aunque también es capaz de llevar a cabo metilación *de novo* en substratos no metilados *in vitro*. La actividad ADN-MTasa parece estar estrechamente controlada, aunque los mecanismos no están claros. Las células proliferantes exhiben niveles mucho más altos de enzima que lo hacen las células quiescentes^{17, 18-20} y estos niveles se incrementan bruscamente durante toda la fase S, como lo hacen los niveles de ARNm de ADN-Mtasa^{18, 21}. Este control estrecho de la expresión de la ADN-MTasa, y la preferencia de la enzima por el ADN hemimetilado, están bien adecuadas al papel de la enzima en preservar los patrones de metilación normal del ADN en células adultas. Dicha regulación

puede también proporcionar un balance crítico entre la compartimentalización del ADN y el momento oportuno de la replicación del mismo²². Diferentes estudios^{22, 23, 24} han mostrado que el ADN metilado e inactivo para la transcripción replica más tarde que el ADN no metilado y activo transcripcionalmente. Los patrones de metilación normal en células adultas pueden de esta manera promover la replicación de ADN proximal a islas CpG no metiladas en un momento anterior con relación a la cromatina densa fuertemente metilada. La conservación del estado de metilación normal del ADN puede asegurar que la compartimentalización del ADN no cambie sin que exista alguna señal que anule los requerimientos de energía²².

I-A. 3. TÉCNICAS PARA ESTUDIAR LA METILACIÓN DEL ADN.

Las técnicas iniciales para estudiar los sitios específicos de metilación del ADN contaban primariamente con la incapacidad de las enzimas de restricción de tipo II sensibles a la metilación para cortar secuencias que contenían uno o más sitios CpG metilados, combinado con la hibridación Southern²⁵⁻²⁷. Este método requiere grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, detecta la metilación solamente si más de un pequeño porcentaje de alelos está metilados, y únicamente aporta información sobre aquellos sitios CpG hallados dentro de la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción sensibles a la metilación. Singer-Sam et al²⁸ mejoraron la sensibilidad de la detección de la metilación combinando el uso de las enzimas de restricción con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Después de la escisión del ADN con las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, v. g. *Hpa II*, la amplificación por PCR con cebadores específicos que flanquean

el sitio de restricción solamente ocurrirá si el corte del ADN ha sido prevenido por la metilación. Sin embargo, este método, al igual que las aproximaciones basadas en el Southern, pueden monitorizar solamente la metilación CpG en los sitios de restricción sensibles a la misma. Además, se pueden obtener resultados falsos positivos debidos a la digestión incompleta del ADN celular por parte de la enzima de restricción.

Frommer et al²⁹ introdujeron un procedimiento basado en la desaminación oxidativa inducida por el bisulfito del ADN genómico bajo condiciones en las cuales la citosina se convierte en Uracilo y la 5-mC permanece sin cambios. La secuencia diana es luego amplificada por PCR usando cebadores específicos. Sobre la secuenciación del ADN amplificado, todos los uracilos y timinas llegan a ser detectables como timinas y solamente 5-mC amplifica como citosinas (**Figura 2**).

Un número de métodos rápidos para detectar 5-mC se han desarrollado basados en la reacción de desaminación de bisulfito en combinación con la amplificación por PCR. Estos métodos son apropiados para el examen de un número limitado de dinucleótidos CpG que están o bien dentro o inmediatamente adyacentes a la secuencia de cebadores de la PCR^{30, 31}, o bien dentro de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción³².

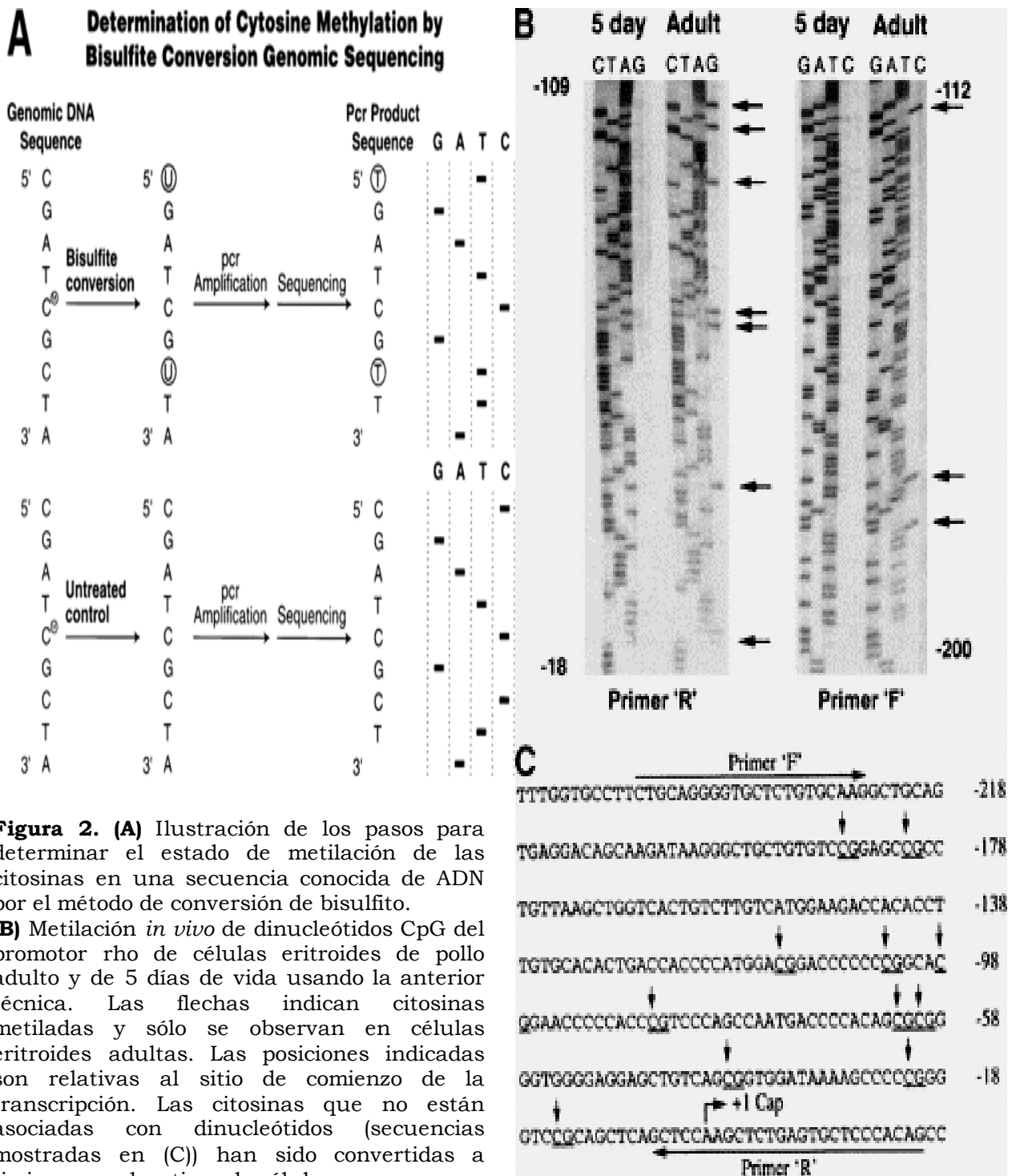


Figura 2. (A) Ilustración de los pasos para determinar el estado de metilación de las citosinas en una secuencia conocida de ADN por el método de conversión de bisulfito.

(B) Metilación *in vivo* de dinucleótidos CpG del promotor rho de células eritroides de pollo adulto y de 5 días de vida usando la anterior técnica. Las flechas indican citosinas metiladas y sólo se observan en células eritroides adultas. Las posiciones indicadas son relativas al sitio de comienzo de la transcripción. Las citosinas que no están asociadas con dinucleótidos (secuencias mostradas en (C)) han sido convertidas a timina en ambos tipos de células.

(C) Representación gráfica de la metilación *in vivo* de dinucleótidos CpG del promotor rho en células eritroides de pollo adulto y de 5 días de vida usando la técnica de conversión de bisulfito. Las flechas indican las citosinas metiladas y se ven en (A) (dato no mostrado para dinucleótidos CpG en la posición -15). Los cebadores R y F indican la secuencia del promotor de la globina rho para diseñar los cebadores internos y para la secuenciación. (Tomado de Singal R et al. Blood 1999; 93: 4059-4070).

I-A. 4. METILACION DEL ADN Y REPRESION TRANSCRIPCIONAL.

El papel de la metilación del ADN en la regulación diferencial de la expresión génica fue hipotetizado hace muchos años^{33, 34}, sugiriéndose que la metilación sitio-específica de la citosina dentro o en la vecindad de los genes estaba en relación con la represión transcripcional^{27, 35-38}. Con posterioridad, esta relación inversa entre metilación de la citosina y transcripción ha sido observada en un gran número de genes, aunque no universalmente.

Aunque parece establecido que la metilación del ADN puede actuar como un regulador negativo de la transcripción, el mecanismo preciso implicado en dicho proceso es motivo de controversia. Numerosos estudios han mostrado la capacidad de la metilación del promotor del ADN para inhibir la transcripción de una amplia variedad de genes en ensayos de transfección *in vitro*, y en algunos casos, tal metilación corresponde al estado inactivo del gen bajo estudio *in vivo*^{12, 39}.

Tres mecanismos posibles han sido propuestos para explicar la represión transcripcional a través de la metilación del ADN, cada uno de los cuales se muestra en la **Figura 3**. El PRIMER MECANISMO implica una interferencia directa en la unión de los factores de transcripción específicos a sus lugares de reconocimiento en los promotores respectivos. Varios factores de transcripción, incluyendo AP-2, c-Myc/Myn, el activador dependiente de AMP cíclico CREB, E2F y NF-κB, reconocen secuencias que contienen residuos CpG, y la unión de cada uno se ha mostrado que está inhibida por la metilación. Por el contrario, otros factores de transcripción (v. g. Sp1 y CTF) no son sensibles a la metilación de su sitio de unión⁴⁰, y

muchos otros factores no tienen dinucleótidos CpG en dichas regiones.

Un SEGUNDO MECANISMO potencial para el silencio inducido por la metilación es a través de la unión directa de represores específicos de la transcripción al ADN metilado. Tales factores, MeCP-1 y MeCP-2 (“methyl cytosine binding proteins” 1 y 2), han sido identificados y mostrada su unión a residuos CpG metilados en cualquier secuencia genómica. Aunque en el ADN de los vertebrados la metilación ha sido postulada como inhibitoria de la iniciación de la transcripción, la metilación también bloquea la elongación de la transcripción en la *Neurospora* a través de un mecanismo que puede ser mediado por MeCP-1 y/o MeCP-2⁴¹.

MeCP-1 se une al ADN que contiene múltiples sitios CpG metilados simétricamente, más que a CpG hemimetilados, y se manifiesta como un gran complejo en los ensayos de electroforesis⁴². La represión de la transcripción de genes densamente metilados puede ser mediada por MeCP-1, y las células deficientes en MeCP-1 muestran represión de genes metilados muy reducida⁴³. En estudios posteriores, se demostró que la escasa metilación podía reprimir los genes transfectados completamente, pero que la inhibición era completamente superada por la presencia en posición *cis* del potenciador (enhancer) SV40. Sin embargo, los genes densamente metilados no podían ser reactivados por el potenciador. Se propuso que los genes escasamente metilados forman un complejo inestable con MeCP-1 que previene la transcripción cuando el promotor es débil. Este complejo puede ser roto por un promotor fuerte permitiendo por tanto al gen metilado ser transcrito⁴⁴.

MeCP-2 es más abundante que MeCP-1 en las células y es capaz de unirse a ADN que contienen pares CpG metilados de forma simple⁴⁵. MeCP-2, como la metiltransferasa de ADN, es dispensable para la viabilidad de las células progenitoras embrionarias, pero es

esencial para el desarrollo embriológico⁴⁶. MeCP-2 tiene dos dominios: un dominio de unión metil-CpG que es esencial para la localización cromosómica y un dominio represor de la transcripción (DRT) que puede inhibir la transcripción de un promotor a distancia, sugiriendo que MeCP-2 interactúa con la maquinaria transcripcional o el complejo de iniciación⁴⁷. Recientemente, una región del MeCP-2 localizada con el DRT se demostró estar asociada con un complejo correpresor conteniendo el represor de la transcripción mSin3A y desacetilasas de histonas. La represión de la transcripción *in vivo* era suprimida por el inhibidor de la desacetilasa tricostatín A, sugiriendo que dos mecanismos globales de regulación génica, la metilación del ADN y la desacetilación de histonas, pueden estar ligadas por el MeCP-2^{48, 49}. Sin embargo, en algunos casos la metilación del ADN juega un papel importante sobre la desacetilación de histonas en la represión transcripcional^{50, 51}. Se ha propuesto que el MeCP-2 pudiera contribuir al montaje de una estructura cromatínica más estable⁵². Sin embargo, el MeCP-2 puede reprimir la transcripción de ADN desnudo en células libres en ensayos *in vitro*⁴⁷, sugiriendo que la formación de cromatina no es necesaria para su acción represiva.

El TERCER MECANISMO por el cual la metilación puede mediar la represión transcripcional es a través de alterar la estructura cromatínica. Keshet et al⁵³ transfectó células L de ratón con plásmidos contruidos M13 que contenían el gen β -globina humano, así como otros genes, después de una metilación enzimática. Las secuencias de ADN no metiladas fueron todas detectadas en cromatinas con formas activas, al contrario de las secuencias de ADN que estaban metiladas *in vitro* antes de la transfección que fueron detectadas en cromatinas con formas inactivas a la transcripción. Experimentos que usan microinyecciones de ciertos moldes de genes metilados y no metilados dentro del núcleo han mostrado que la metilación inhibe la transcripción solamente después de que la

cromatina está ensamblada⁵⁴. Incluso un fuerte activador de la transcripción, GAL4-VP16, no puede contrarrestar el efecto de la cromatina una vez que ha asumido el estado inactivo inducido por la metilación del ADN⁵⁴. Por tanto, además de estabilizar el estado inactivo, la metilación también previene la activación mediante el bloqueo del acceso de los factores de transcripción^{52, 55}. Si este efecto de la metilación sobre la cromatina está mediado únicamente por desacetilasas de histonas asociadas a MeCP-2 queda por determinarse.

Un aspecto importante en relación con la metilación del ADN y el silencio transcripcional ha sido si la metilación es un mecanismo de control primario o un efecto secundario de la actividad de los genes. En el caso de varios genes con escasos nucleótidos CpG, la adquisición de la metilación ocurre después del silencio de la transcripción⁵⁶; en otros casos, la pérdida de la metilación ocurre después de la activación de la transcripción⁵⁷. Al mismo tiempo, en otros sistemas se ha demostrado que a pesar de condiciones nucleares óptimas para la transcripción, incluyendo cromatina sensible a ADNasa-I, la transcripción puede ser fuertemente reprimida por la metilación CpG^{58, 50}. Parece que la metilación, especialmente de genes ricos en CpG, puede servir como un mecanismo de cerrojo que puede seguir o preceder otros eventos que silencian un gen, pero una vez establecido puede prevenir la activación a pesar de un entorno nuclear óptimo para la transcripción.

DNA Methylation and Transcriptional Repression

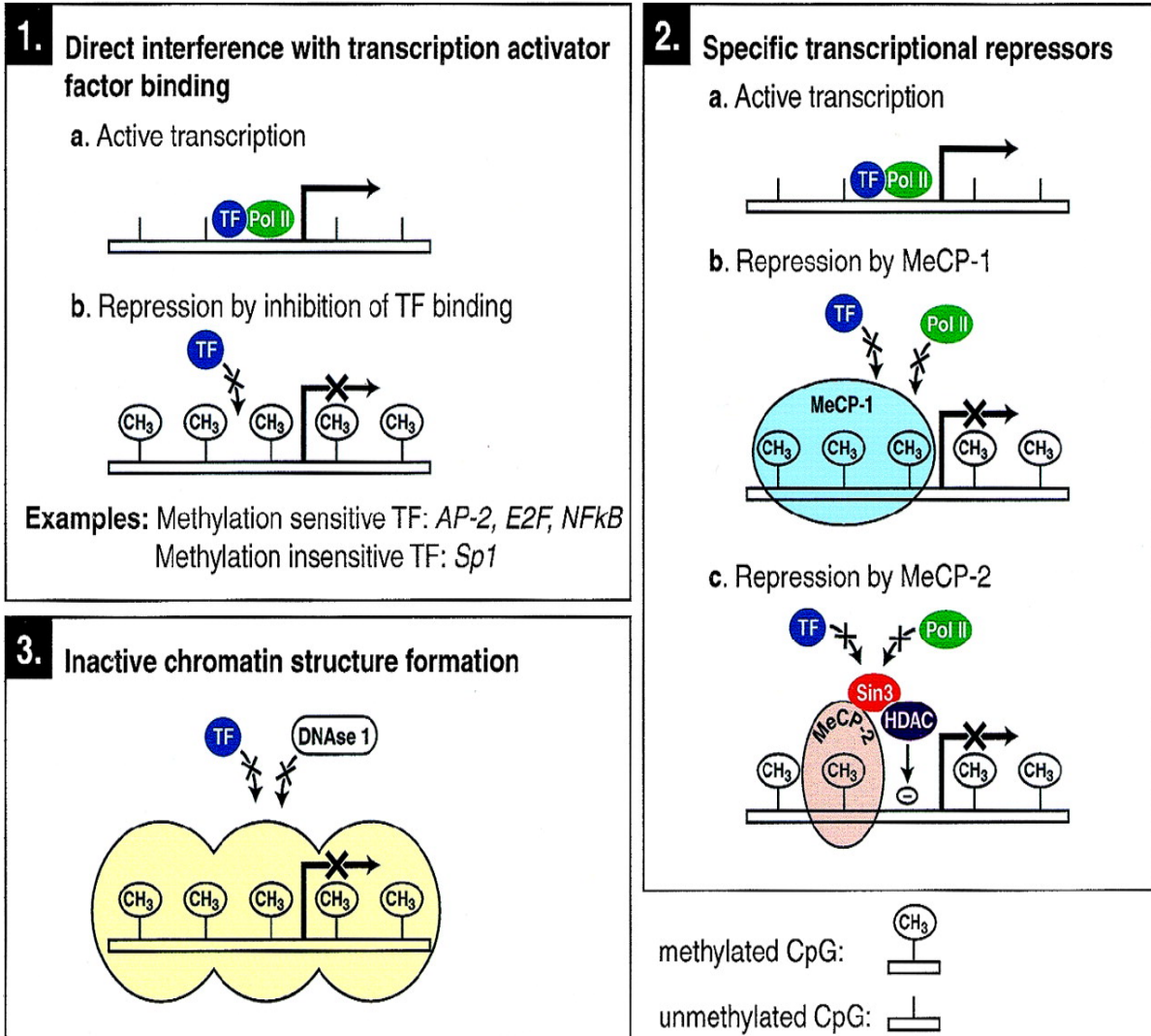


Figura 3. Mecanismo propuesto para la represión transcripcional mediado por la metilación de la citosina. (Tomado de Singal R et al. *Blood* 1999; 93: 4059-4070).

I-A. 5. METILACION DEL ADN Y CANCER

El papel de la metilación del ADN en la oncogénesis ha sido hipotetizado durante muchos años. Numerosos estudios han sugerido aberraciones en la actividad de la metiltransferasa de ADN en células tumorales⁵⁹⁻⁶¹. Las células transformadas frecuentemente tienen aumentada la actividad total de la ADN-MTasa, pérdida extensa de la metilación de sitios normalmente metilados y más regiones de ADN hipermetilado⁶². La contribución potencial de la metilación del ADN a la oncogénesis parece estar mediada por uno o más de los siguientes mecanismos que se muestran en la **Figura 4**.

I-A. 5. 1. MUTACIONES C—T EN CÉLULAS CANCERÍGENAS

El alto índice de mutaciones de residuos de citosinas dentro de los nucleótidos CpG, el sitio diana de la ADN-MTasa, puede ser justificado por una alta tasa de transiciones de citosinas a timinas, las cuales son, a su vez, una consecuencia de la desaminación hidrolítica de la 5-mC⁶³ (**Figura 1**). Este mecanismo de mutación fue primariamente reconocido en sistemas procariotas⁶⁴.

Las citosinas no metiladas también pueden sufrir desaminación para producir uracilo, pero la ADN-glicosilasa de uracilo repara eficientemente el “mismatch” G:U pero no el G:T⁶⁵. Sin embargo, la ADN-MTasa puede bloquear esta reparación, contribuyendo la transición C—U—T. La ADN-MTasa también puede mediar la transición 5-mC—T en los dinucleótidos CpG bajo condiciones que conducen a un incremento de la expresión de ADN-MTasa o una disminución de los niveles celulares de S-adenosilmetionina⁶⁶.

Un ejemplo notable de cómo este proceso puede conducir a la oncogénesis es demostrado por el gen supresor de tumores *p53*. Las mutaciones en este gen ocurren en más del 50% de los tumores sólidos humanos⁶⁷. Se estima que el 24% de estas mutaciones son transiciones C—T en los dinucleótidos CpG, sugiriendo que la metilación del ADN puede contribuir a estas mutaciones⁶⁸.

I-A. 5. 2. HIPOMETILACIÓN DEL ADN EN EL CÁNCER

Los niveles disminuidos de metilación del genoma general son hallazgos frecuentes en la tumorigénesis⁶⁹. Esta disminución en la metilación global parece comenzar precozmente y antes del desarrollo franco de la formación tumoral^{70, 71}. Además de la hipometilación genómica general, se han observado oncogenes específicos hipometilados en tumores humanos. Una buena correlación inversa entre metilación y expresión génica se observó en el gen antiapoptótico *bcl-2* en la leucemia linfóide crónica de células B⁷² y en el proto-oncogen *k-ras* en carcinomas de pulmón y de colon⁷³.

I-A. 5. 3. HIPERMETILACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMORES

Además de mutaciones puntuales o deleciones de genes, la represión transcripcional por la hipermetilación de secuencias promotoras sugiere un medio alternativo para la inactivación de genes supresores de tumores en el cáncer. Este hecho puede resultar de unos niveles incrementados de ADN-MTasa lo cual ha sido demostrado en diversos cánceres⁵⁹ o podría ocurrir como resultado de otros eventos transitorios que silencian la transcripción de genes supresores de tumores. El gen del retinoblastoma (Rb) fue el primer gen supresor de tumores en el cual se detectaron las islas CpG hipermetiladas. Tres de 21 casos esporádicos en un estudio⁷⁴ y 5 de

32 en otro⁷⁵ presentaban las islas CpG hipermetiladas en el extremo 5' del gen Rb. Posteriormente, también se demostró que la metilación *in vitro* de la región promotora de Rb bloqueaba directamente la activación del promotor⁷⁶.

La inactivación del gen de von Hippel-Lindau (VHL) por mutaciones somáticas adquiridas en una copia con pérdida del segundo alelo se ha implicado como el evento inicial en casos espontáneos de carcinomas renales de células claras⁷⁷. Herman et al⁷⁸ observaron hipermetilación en las islas CpG del gen VHL y falta de expresión concomitante en 5 de 26 casos de formas esporádicas de carcinoma renal de células claras sin mutaciones intragenómicas VHL. El tratamiento de las células del carcinoma renal de células claras con 5-deoxiazacitidina, un potente inhibidor de la ADN-MTasa, resultó en la desmetilación y expresión del gen VHL previamente silente.

Una de las proteínas más importantes reguladoras del ciclo celular es la p16 (también conocida como MTS-1 por “major tumor suppressor 1”; INK4a por “Inhibitor of cyclin-dependent Kinase 4a”; y CDKN 2a por “Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2a”). El efecto bioquímico principal de la p16 es detener la progresión del ciclo celular en el límite G1/S, y por tanto, la pérdida de la función de la p16 pudiera estar involucrada en la progresión neoplásica por permitir una proliferación celular no regulada⁷⁹. Una alteración genética frecuente en líneas celulares de tumores y menos extendida en tumores primarios es la pérdida de heterocigosidad en la región cromosómica 9p21, la cual contiene los genes p16 y p15. En la mayoría de los tumores sólidos estudiados, el gen p16 presenta con frecuencia metilación de una isla CpG en su región 5', y el tratamiento de las líneas celulares portadoras de un alelo p16 hipermetilado con 5-azacitidina resulta en una activación transcripcional del gen^{80, 81}. La presencia de deleciones en regiones

codificantes o de hipermetilación del promotor de la p16 se correlaciona inversamente con la presencia de mutaciones en el gen Rb en múltiples tipos de tumores⁶². De forma interesante, en algunos casos, la hipermetilación del promotor de la p16 puede ser el único evento inactivante para ambos alelos del gen y puede ser la única lesión asociada con pérdida de la ruta ciclín D-Rb⁶². El 30%-40% de las neoplasias de colon presentan alelos p16 hipermetilados⁸¹, aun en ausencia de pérdida alélica en la región 9p, de deleciones homocigotas del gen p16 o de mutaciones en el gen Rb⁸². La inactivación del gen p16 mediada por la hipermetilación se observa en neoplasias de cerebro, mama, colon, cabeza y cuello, en cánceres de pulmón de células no pequeñas y en linfomas no hodgkinianos de alto grado de malignidad⁶².

El gen p15 (INK4b) es un inhibidor de la cinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 y parece jugar un papel importante en las respuestas a la inhibición del crecimiento mediada por el TGF- β (“transforming growth factor- β)⁸³. La inactivación del gen p15 mediada por la metilación ocurre fundamentalmente en neoplasias hematológicas como leucemias mieloblásticas agudas, leucemias linfoblásticas agudas y linfomas de Burkitt⁶². Recientemente, la hipermetilación del gen p15 se ha demostrado en síndromes mielodisplásicos⁸⁴ y la metilación tanto de p15 como de p16 en mielomas múltiples⁸⁵.

I-A. 5. 4. INDUCCIÓN DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

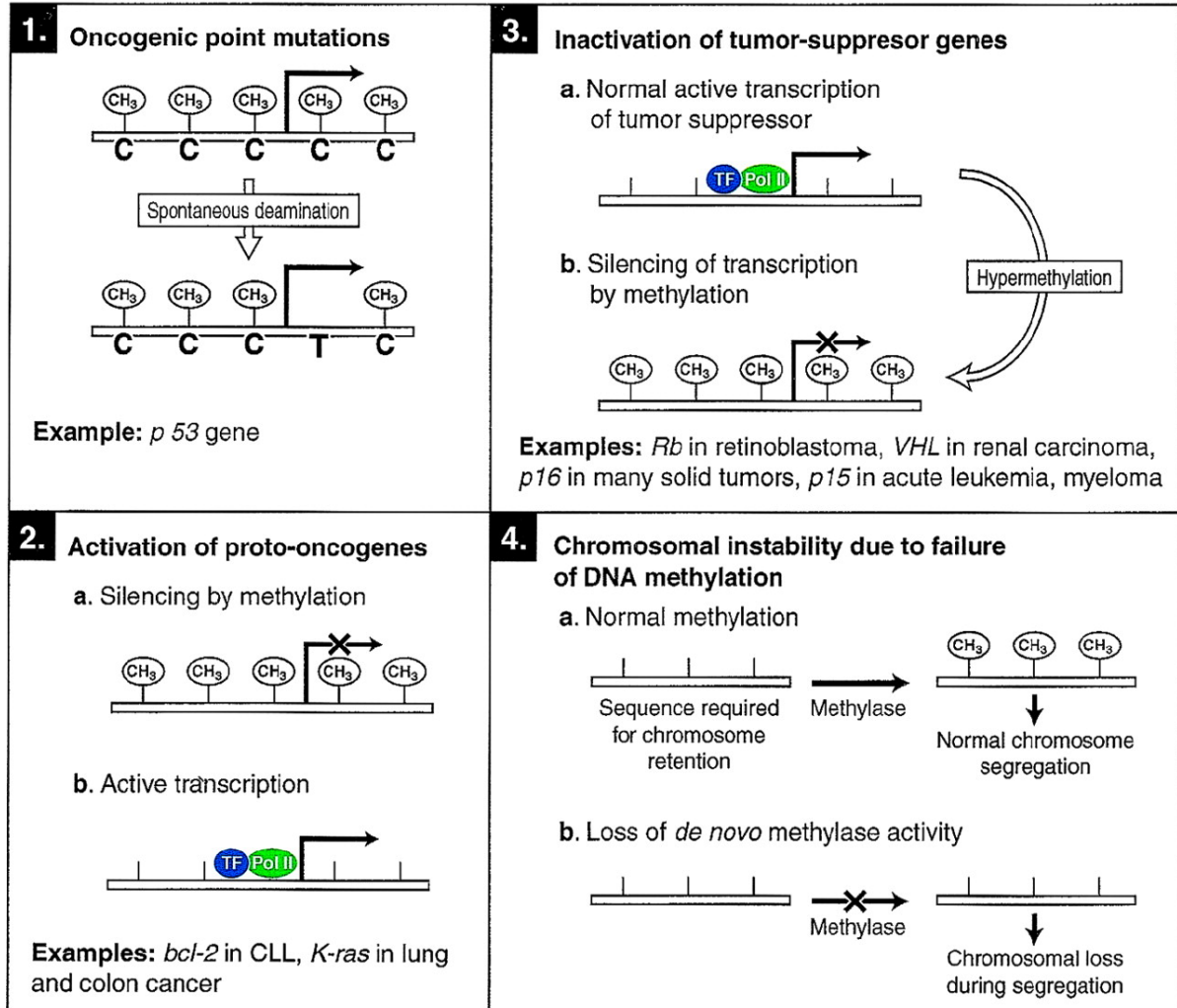
Leengauer et al⁸⁶ introdujeron secuencias ricas en CpG exógenas en forma de un gen retroviral que contenía β -galactosidasa en 10 líneas celulares de cáncer de colon. 5 de estas líneas celulares no expresaron el gen β -gal, y estas líneas eran deficientes en reparar la actividad “mismatch” (MMR-), mientras que las otras líneas

celulares competentes para reparar el “mismatch” (MMR+) expresaron el gen. Las líneas celulares MMR- eran competentes para la metilación (MET+), mientras que las líneas celulares MMR+ fueron deficientes para la misma (MET-) según los análisis del Southern blot y de la reactivación del gen inducida por 5-azacitidina. Se propuso que en las células de colon competentes para reparar el mismatch un defecto de metilación facilita directamente la ganancia y pérdida de cromosomas completos, dando lugar a la inestabilidad genómica necesaria para el desarrollo y progresión del cáncer. Por el contrario, las células MMR- tienen una capacidad de metilación normal y desarrollan la inestabilidad genómica requerida por la ruta alternativa para la deficiente reparación del mismatch⁸⁷. De acuerdo con el papel para la metilación en la inestabilidad cromosómica estuvieron los hallazgos de Chen et al⁸⁸ en el análisis de células progenitoras embriológicas (ES) nulicigotas para el gen ADN-MTasa, *Dnmt1*. Deleciones de genes marcadores seleccionados debido a recombinaciones mitóticas o pérdida cromosómica fueron detectadas en una frecuencia mucho más alta en células ES deficientes en *Dnmt1* comparadas con células control.

Experimentos adicionales que apoyaron la hipótesis que liga la metilación del ADN a la integridad cromosómica fueron los estudios de Feinberg et al⁸⁹, quien demostró una media del 8% y 10% de reducción de 5-mC genómica en adenomas y carcinomas de colon, respectivamente, sin diferencias significativas entre tumores benignos y malignos. De forma llamativa, tres pacientes con el contenido más alto de 5-mC en sus células de colon normal tuvieron Síndrome de Lynch, el cual se demostró posteriormente que tenía fenotipo MMR-

⁸⁹.

DNA Methylation and Cancer





methylated CpG:  unmethylated CpG: 

Figura 4. Modelos que explican los diferentes mecanismos a través de los cuales la metilación de la citosina puede promover la oncogénesis. (Tomado de Singal R et al. *Blood* 1999; 93: 4059-4070).

I-A. 6. ALTERACION EN LA ACTIVIDAD DE LA ADN-MTasa EN EL CANCER

Varios estudios en los últimos años han demostrado un incremento en la actividad de la ADN-MTasa en células neoplásicas. Kautiainen y Jones⁵⁹ examinaron los niveles de ADN metiltransferasa en el núcleo de 9 líneas celulares tumorígenas y en 9 no tumorígenas. En todas excepto en 2 casos, la actividad metiltransferasa fue de 4 a 3000 veces más alta en las células tumorígenas que en las no tumorígenas⁵⁹. El incremento de la actividad ADN-MTasa ha sido descrito en cánceres de colon versus mucosa normal del mismo paciente⁶⁰. Laird et al⁶¹ criaron ratones normales heterocigotos para la delección del gen ADN-MTasa (y teniendo el 50% de la actividad ADN-MTasa comparada con el tipo nativo) con ratones que tenían un alelo mutado del gen APC⁶¹. Cuando se combinó con pérdida de otro alelo APC, esta mutación dio como resultado la formación progresiva de adenomas a lo largo del tracto digestivo de animales recién nacidos. Los adenomas intestinales fueron reducidos en un 50% en la descendencia con ambas mutaciones de los genes APC y ADN-MTasa y fueron eliminados cuando el tratamiento con 5-deoxyazacitidina se combinó con delección alélica de ADN-MTasa.

El mecanismo de base en la actividad incrementada de la ADN-MTasa en las células neoplásicas no ha sido aclarado. MacLeod et al⁹⁰ propusieron que la activación de la vía de la señal de transducción *ras* causa actividad incrementada por interacción con los sitios AP-1 en la presumible región promotora ADN-MTasa en líneas celulares de tumor adrenocortical murino. Sin embargo, esta aparente región promotora del gen ADN-MTasa se halló posteriormente que estaba mucho más abajo en la cadena de ADN que el sitio de comienzo de la transcripción^{91, 92}. También se

demostró que la sobreexpresión del gen *c-fos* conduce a la transformación celular a través de una actividad ADN-MTasa incrementada⁹³. Se necesitan más estudios para comprender la regulación del gen ADN-MTasa tanto en células normales como en neoplásicas.

Los mecanismos responsables que mantienen los patrones de metilación en células normales y neoplásicas no están aclarados. Un estudio reciente demostró la unión de ADN-MTasa al antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA, -"proliferating cell nuclear antigen"-), un factor auxiliar para la replicación y reparación del ADN. Esta unión ocurrió en células intactas en loci de ADN recién replicado y no alteró la actividad ADN-MTasa. Un péptido derivado del regulador del ciclo celular p21 rompe la unión ADN-MTasa con PCNA, sugiriendo que p21 puede regular la metilación por bloqueo de acceso de la ADN-MTasa al PCNA. Basado en estos hallazgos, se propuso que, en células normales la proteína p21 regula negativamente la interacción ADN-MTasa-PCNA en el inicio de la fase S y protege las islas CpG de la metilación, mientras que los efectos de p21 al final de la fase S dan como resultado la señal para que la ADN-MTasa metile el ADN. En células cancerígenas, la pérdida de la función que lleva a cabo la p21 permite la interacción ADN-MTasa-PCNA en el inicio de la fase S, facilitando la metilación aberrante de las islas CpG, mientras que la señal disminuída no modificada de la ADN-MTasa al final de la fase S da como resultado la pérdida de metilación normal¹¹. Este tipo de mecanismo podría explicar la paradoja planteada por la observación tanto de excesiva como de deficiente metilación del ADN durante la tumorigénesis.

I-A. 7. IMPLICACIONES CLINICAS Y TERAPEUTICAS DE LA METILACION DEL ADN

Así como los genes de las globinas de los vertebrados fueron los primeros ejemplos de asociación entre metilación de ADN y silencio transcripcional^{27, 36, 37, 94}, también fueron las primeras dianas para la intervención clínica basada en drogas que afectan la metilación⁹⁵⁻⁹⁷. El tratamiento es 5-azacitidina, un inhibidor irreversible de la ADN-MTasa, se demostró que aumentaba la expresión del gen fetal de las γ -globinas en primates y posteriormente en pacientes con β -talasemia y anemia de células falciformes. Debido a su mutagenicidad y a la observación de que otros agentes citotóxicos activos en la fase S que no inhiben la metilación del ADN podrían inducir incrementos similares en la expresión del gen de la γ -globinas⁹⁸⁻¹⁰⁰, la 5-azacitidina no ha sido usada ampliamente para esta aplicación. Estas experiencias apuntan las limitaciones de intentar alterar la expresión de los genes a través del uso de inhibidores de la metilación global del ADN que también poseen otros efectos celulares potentes y enfatizan la necesidad de una comprensión más completa de la especificidad de los controles de metilación y desmetilación del ADN.

Los avances recientes en la comprensión de la metilación alterada del ADN en el cáncer plantearon también sus implicaciones clínicas potenciales. Debido a que la metilación de muchos genes implicados pueden representar un proceso específico a las células neoplásicas, este cambio puede ser un índice sensible de micrometástasis⁶². Puede también ser de algún valor pronóstico en determinadas situaciones. Por ejemplo, la metilación del promotor *abl* en la leucemia mieloide crónica se ha asociado a enfermedad de larga duración, más que probablemente asociada con una mayor probabilidad de transformación blástica inminente¹⁰¹.

El aumento de la actividad ADN-MTasa observada en numerosos cánceres ha llevado a pensar en la inhibición de esta enzima como una estrategia antitumoral. Los inhibidores de la ADN-MTasa, 5-azacitidina y 5-azadeoxicitidina, se han usado clínicamente para el tratamiento de pacientes con síndromes mielodisplásicos o leucemias^{102, 103}. Debido, como se ha dicho, a que estos agentes tienen otros efectos aparte de la desmetilación, presentan muchos efectos secundarios, y necesitan ser administrados por infusión continúa, el desarrollo de nuevos inhibidores de la ADN-MTasa debe intentarse. En este sentido, Ramchandani et al¹⁰⁴ demostró que la inyección intraperitoneal de oligonucleótidos antisentido de ADN-MTasa reducían el nivel de la misma e inhibían el crecimiento del carcinoma adrenocortical Y1 en ratones LAF singénicos.

I-B. LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) tiene una incidencia que se mueve en torno a 3-6 casos nuevos por 100.000 habitantes/año en España, siendo las 2/3 partes niños^{105, 106}. La tasa actual de curación de cerca del 80% en niños atestigua el importante progreso en el desarrollo de tratamientos efectivos para los subtipos resistentes de la enfermedad. Dicho progreso ha evolucionado, desde la introducción de la poliquimioterapia y el tratamiento del sistema nervioso central (SNC) en la leucemia presintomática hasta los más actuales regímenes de tratamiento intensivo para los pacientes de alto riesgo (**FIGURA 5**). Por el contrario, solamente el 30-40% de adultos con LAL logran la curación¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Esta discrepancia puede ser atribuida en parte a la alta frecuencia de anomalías genéticas adversas en las células leucémicas de los adultos¹⁰⁸⁻¹¹².

I-B. 1. CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE LAS CELULAS LEUCEMICAS

La LAL puede originarse de cualquier célula linfoide bloqueada en un estadio concreto de su desarrollo, incluyendo las células primitivas con capacidad multilineal^{112, 113}. A diferencia de la leucemia mieloide aguda, que puede ser rápidamente identificada en la mayoría de los casos por la presencia de bastones de Auer, mieloperoxidasa, o esterasas asociadas a monocitos, los linfobláastos leucémicos carecen de aspectos citoquímicos o morfológicos específicos, por lo que el diagnóstico de LAL depende del fenotipo inmunológico. Aunque están disponibles anticuerpos monoclonales frente a 166 moléculas antigénicas de diferenciación (CD) de

leucocitos humanos¹¹⁴, solamente unas pocas de esas moléculas son verdaderamente específicas de línea. Por esta razón, se necesita un panel de anticuerpos para establecer el diagnóstico y distinguir las subclases inmunológicas.

El panel que debería emplearse para una correcta caracterización inmunológica de las células responsables de la LA debería incluir por lo menos un marcador que fuera altamente sensible (CD19 y CD7 para las células de línea B y línea T, respectivamente, y CD13 o CD33 para células mieloides) y un marcador que fuera altamente específico (CD79a citoplasmático y CD3 citoplasmático para células de línea B y células de línea T, respectivamente, y mieloperoxidasa citoplasmática para células mieloides). Sobre la base de estos análisis inmunofenotípicos, se puede hacer un diagnóstico firme en el 99% de los casos. Aunque las LAL que afectan a células de línea B y células de línea T pueden ser subclasificadas posteriormente de acuerdo con los pasos de la maduración normal B y T¹¹², la única distinción con importancia terapéutica es aquella entre el inmunofenotipo del precursor de célula B y el inmunofenotipo de célula B madura o célula T.

Dependiendo del criterio usado y del número de antígenos empleados, la expresión de antígenos asociados a células mieloides puede ser detectada en $\frac{1}{4}$ de LAL de los niños y en $\frac{1}{3}$ de LAL de adultos^{111, 112, 115}. Este aspecto no tiene implicaciones pronósticas o terapéuticas¹¹⁵⁻¹¹⁷, pero puede ser útil en la monitorización inmunológica de la leucemia mínima residual¹¹⁸. Los pocos pacientes con células leucémicas que expresan tanto moléculas linfoides (normalmente CD2 y CD7) y moléculas mieloides (mieloperoxidasa) precisan tratamiento dirigido frente a ambas líneas celulares¹¹⁵.

Las anormalidades genéticas específicas (p. ej. Pérdida o ganancia de cromosomas, dando hipodiploidía o hiperdiploidía, respectivamente; traslocaciones cromosómicas, dando lugar a la

formación de genes de fusión o a la disregulación en la expresión génica; y delección o inactivación funcional de genes supresores de tumores) se encuentran en las células blásticas del 60 al 75% de los pacientes con LAL (**Figura 6**). El reconocimiento de estas anomalías ha contribuido en gran medida a nuestra comprensión de la patogénesis y pronóstico de la enfermedad^{108, 119}.

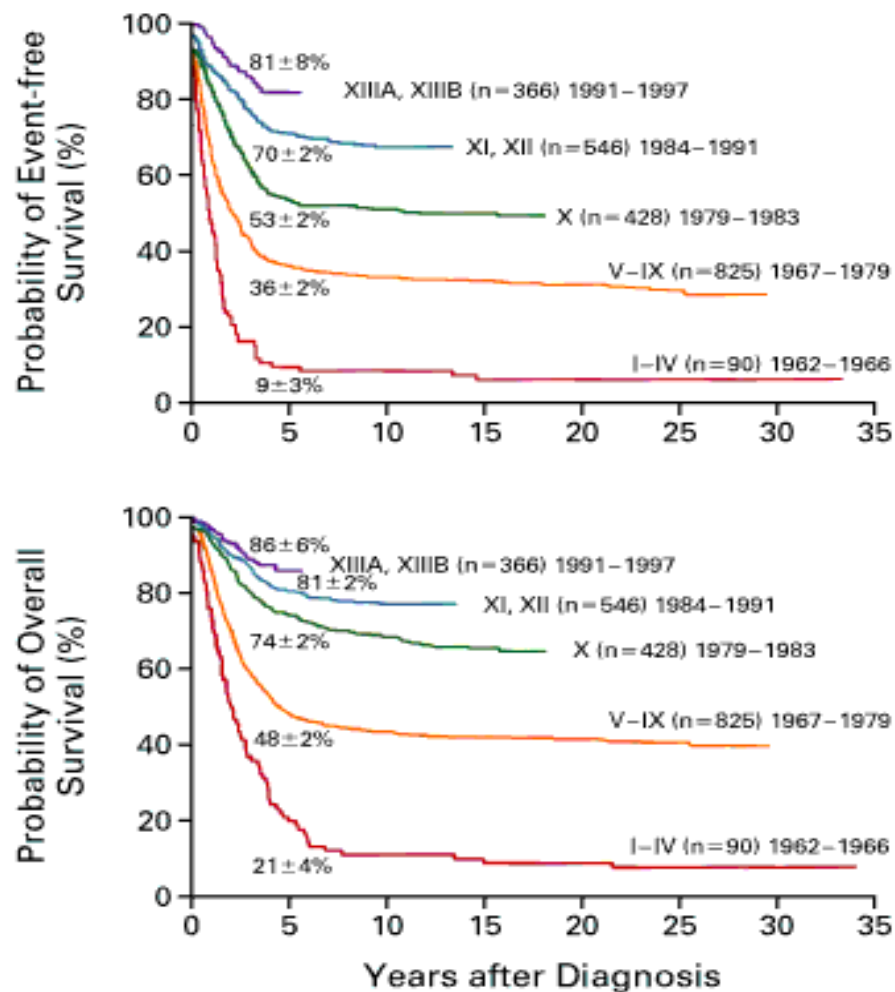


FIGURA 5: Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia libre de eventos (gráfica superior) y supervivencia general (gráfica inferior) en 2255 niños con LAL en 13 estudios consecutivos realizados en el Hospital de Investigación Infantil de St Jude de 1962 a 1997. Los resultados demuestran la mejora en la supervivencia con la introducción de terapia para la enfermedad subclínica del SNC (estudios V-IX, 1967 a 1979); con la intensificación temprana con quimioterapia sistémica, incluyendo metotrexate a altas dosis (estudio X, 1979 a 1983, y estudios XI y XII, 1984 a 1991); y con el tratamiento de reinducción, intensificación con quimioterapia intratecal y terapia intermitente con dexametasona y vincristina (estudios XIII A y XIII B, 1991 a 1997). Se muestra la mediana (\pm DE) de la probabilidad de supervivencia a los 5 años. (Tomado de Pui C-H et al. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-615).

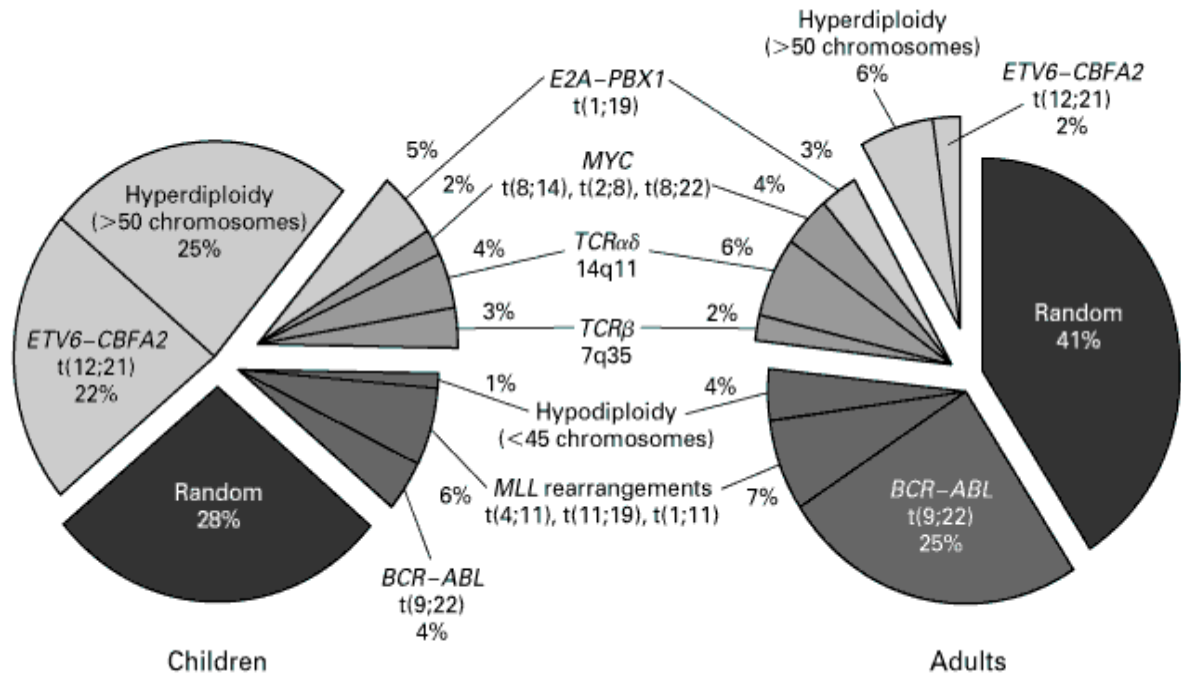


FIGURA 6: Frecuencias estimadas de genotipos específicos en LAL infantil y LAL del adulto. Los datos provienen de estudios del Hospital de Investigación Infantil de St Jude y del Grupo Francés de Citogenética Hematológica. (Tomado de Pui C-H et al. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-615).

I-B. 2. VALORACION DEL RIESGO

Aunque los investigadores están de acuerdo que la valoración rigurosa del riesgo de recaída es necesaria en el momento del diagnóstico para evitar el sobretreatmento o el infratreatmento, hay un considerable desacuerdo sobre los criterios del mismo y sobre la terminología para definir subgrupos de éste. Normalmente se consideran tres categorías de riesgo: bajo, estándar y alto. Muchas variables biológicas y clínicas que inicialmente se pensaban que eran útiles para predecir la evolución de la enfermedad, han resultado ser de poco valor cuando se ha mejorado el tratamiento¹²⁰. Por ejemplo, pacientes con LAL-B o LAL-T que se pensaba que tenían un pronóstico muy pobre, presentan ahora un pronóstico tan favorable como los pacientes con LAL pre-B de riesgo estándar^{106, 107, 116, 121-126}. Asimismo, en dos ensayos independientes de terapia intensiva^{127, 128}, el pobre pronóstico asociado anteriormente con la edad adolescente y la raza negra no se ha corroborado.

Los participantes en un reciente grupo de trabajo¹²⁹ estuvieron de acuerdo sobre los criterios para definir la LAL de precursores de células B en niños de BAJO RIESGO: (i) una edad comprendida entre 1 y 9 años y (ii) recuento de leucocitos de menos de 50.000/mm³. Los pacientes con otras edades o aquellos con recuento de leucocitos mayores fueron considerados como de ALTO RIESGO¹²⁹. Estas relaciones pronósticas pueden ser explicadas en un gran número de casos por la presencia de anormalidades genéticas específicas.

Por ejemplo, en los niños menores de 1 año, en los que el pronóstico es pobre, el 70-80% tienen reordenamientos del gen MLL^{130, 131}. En los adolescentes y adultos, las frecuencias de reordenamientos MLL y el gen de fusión BCR-ABL, otra anormalidad genética asociada con un mal pronóstico también son altas^{109, 110, 132}.

Por el contrario, dos anormalidades genéticas asociadas a un curso favorable de la enfermedad —la hiperdiploidía (>50 cromosomas por célula) y el gen de fusión TEL-AML1— ocurren principalmente en niños de 1 a 9 años de edad; la hiperdiploidía además se asocia a recuentos de leucocitos bajos^{113, 133, 134}.

Un sistema de asignación de riesgo basado en las anormalidades genéticas iniciales podría tener un gran interés pronóstico; sin embargo, como se muestra en la **Figura 7**, el valor predictivo de estas anormalidades no es alto. Por ejemplo, hasta un 20% de niños con LAL que presentan hiperdiploidía o el gen de fusión TEL-AML1 eventualmente tienen una recaída^{108, 133, 134}. Una medida útil en el análisis del riesgo es el grado de eliminación de las células leucémicas de la sangre o de la médula ósea durante la fase inicial de la terapia. En los pacientes con LAL-T o LAL-B, la desaparición lenta de las células ha resultado ser un indicador de pobre pronóstico^{122, 135, 136}.

Otro método es usar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o métodos inmunológicos para medir la enfermedad mínima residual inmediatamente después de la inducción de la remisión clínica, cuando algunos pacientes pueden aún tener hasta 10 millones de células leucémicas^{118, 137, 138}. Los pacientes que presentan una remisión “inmunológica” o “molecular”, definida como afectación leucémica de menos de 0,01% de las células nucleadas de médula ósea, tienen mejor evolución clínica que aquellos en los que la remisión es identificada únicamente con criterios morfológicos. Por otro lado, los resultados de análisis cualitativos de algunos transcritos de fusión específicos de algunas leucemias en pacientes en remisión no predicen fiablemente la recaída posterior¹³⁹.

Se ha propuesto un sistema de clasificación del riesgo (**Figura 8**) que considera el inmunofenotipo de los blastos y el genotipo junto con las características clínicas al diagnóstico y el grado de respuesta

inicial al tratamiento. Aunque la presencia de la fusión BCR-ABL en las células leucémicas generalmente indica una leucemia de alto riesgo justificando el trasplante de células madres hematopoyéticas, los pacientes con esta anomalía genética que tienen un recuento de leucocitos bajo al diagnóstico o una buena respuesta inicial al tratamiento con prednisona pueden ser curados solamente con quimioterapia intensiva^{140, 141}. Los pacientes con células leucémicas marcadamente hipodiploides o casi haploides tienden a presentar un pobre pronóstico e, independientemente de su edad o de su recuento de leucocitos inicial, deberían someterse a tratamiento por lo menos tan agresivo como el aplicado a pacientes con leucemias de riesgo estandar¹⁴².

Los pacientes con LAL de precursores de células B con reordenamientos del gen MLL, especialmente niños con la traslocación t(4;11) y fusión MLL-AF4, generalmente tienen pobre respuesta a la quimioterapia^{132, 143}. Sin embargo, hay un subgrupo de pacientes con reordenamientos MLL que tienen una buena respuesta¹⁴³ (**Figura 7**): aquellos con leucemia de células T con la traslocación t(11;19) y la fusión MLL-ENL. Aunque la LAL-T es tratada como una leucemia de riesgo estandar en prácticamente todos los centros, los pacientes con recuento de leucocitos alto (>100.000/mm³) o respuesta inicial al tratamiento tardía precisan terapia específica del SNC incluso más intensiva que otros pacientes con este fenotipo¹⁴⁴. La presencia de cualquier célula leucémica en el líquido cefalorraquídeo en el momento del diagnóstico puede indicar que la terapia intratecal intensiva es necesaria para prevenir la recaída de la enfermedad en el SNC¹⁴⁵.

En los adultos, la frecuencia del gen de fusión BCR-ABL es más alta y la frecuencia de cambios genéticos favorables es más baja que en los niños (**Figura 6**)^{106, 107, 109-111}. Incluso para los mismos subtipos genéticos de LAL, las tasas de supervivencia son más bajas

en adultos que en niños. Por lo tanto, aunque distintos modelos de riesgo se han propuesto para adultos con LAL¹⁰⁶, el punto de vista prevalente es que la mayoría de adultos afectados deberían ser considerados como de alto riesgo de recaída y deberían ser tratados adecuadamente. Los adultos menores de 30 años de edad tienen mejor pronóstico que aquellos entre 30 y 59 años, que a su vez tienen mejor pronóstico que los pacientes con 60 años o más^{106, 107, 110}. Los adultos con determinados tipos de LAL requieren modificaciones en el tratamiento: aquellos con enfermedad de células B debido a su excepcional sensibilidad a la terapia^{123, 124}; aquellos con enfermedad cromosoma Filadelfia positivo, debido a su resistencia a la quimioterapia sola^{109, 110}; aquellos con leucemia pre-T (CD7 +, CD2 -, CD5 -), porque la respuesta a la quimioterapia no es tan buena como en los pacientes con leucemia de fenotipo T más maduro¹¹¹; y pacientes ancianos, quienes toleran mal el tratamiento¹⁰⁷.

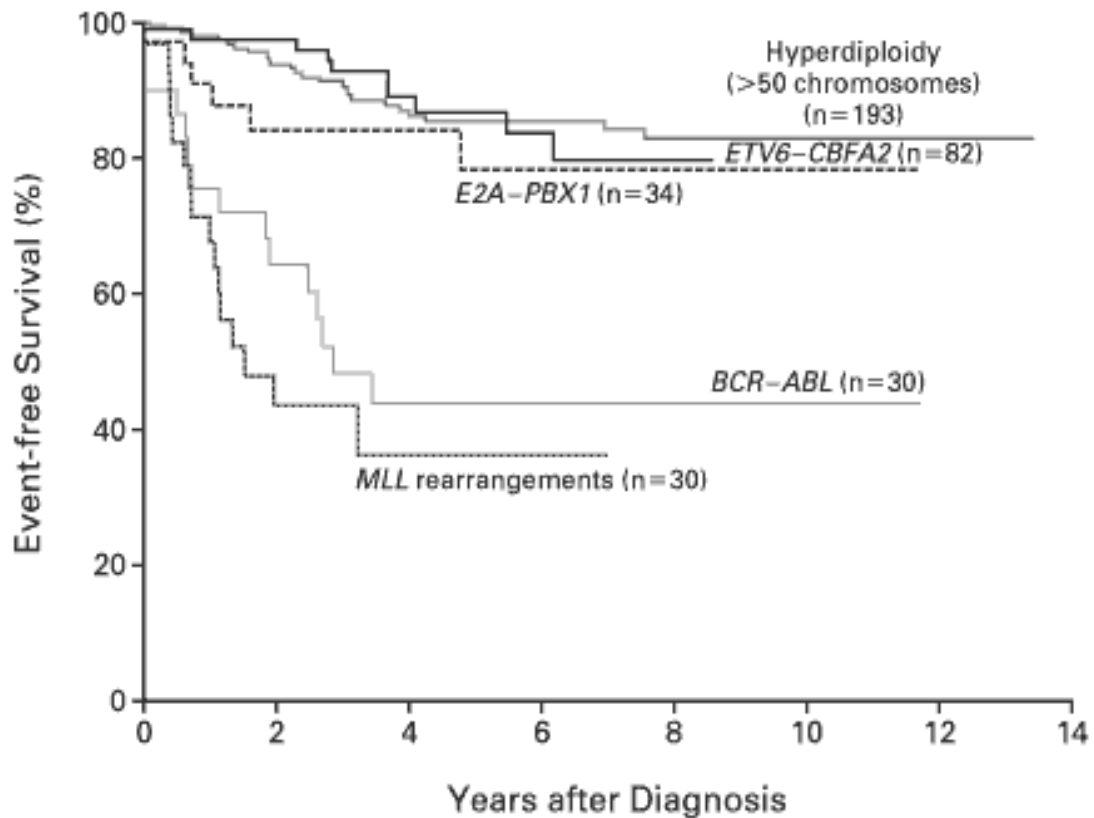


FIGURA 7: Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia libre de evento de acuerdo con los aspectos genéticos de las células blásticas en 369 niños con LAL tratados en el Hospital de Investigación Infantil St Jude de 1984 a 1997.

La relativa buena supervivencia de los pacientes con BCR-ABL refleja el éxito de tratamiento de un subgrupo de pacientes con bajo número de leucocitos al diagnóstico. La anomalía E2A-PBX1 (t(1;19)), antaño asociada con pobre supervivencia, ahora está asociada con el mismo pronóstico favorable que tiene la anomalía ETV6-CBFA2 (TEL-AML1; t(12;21)). (Tomado de Pui C-H et al. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-615).

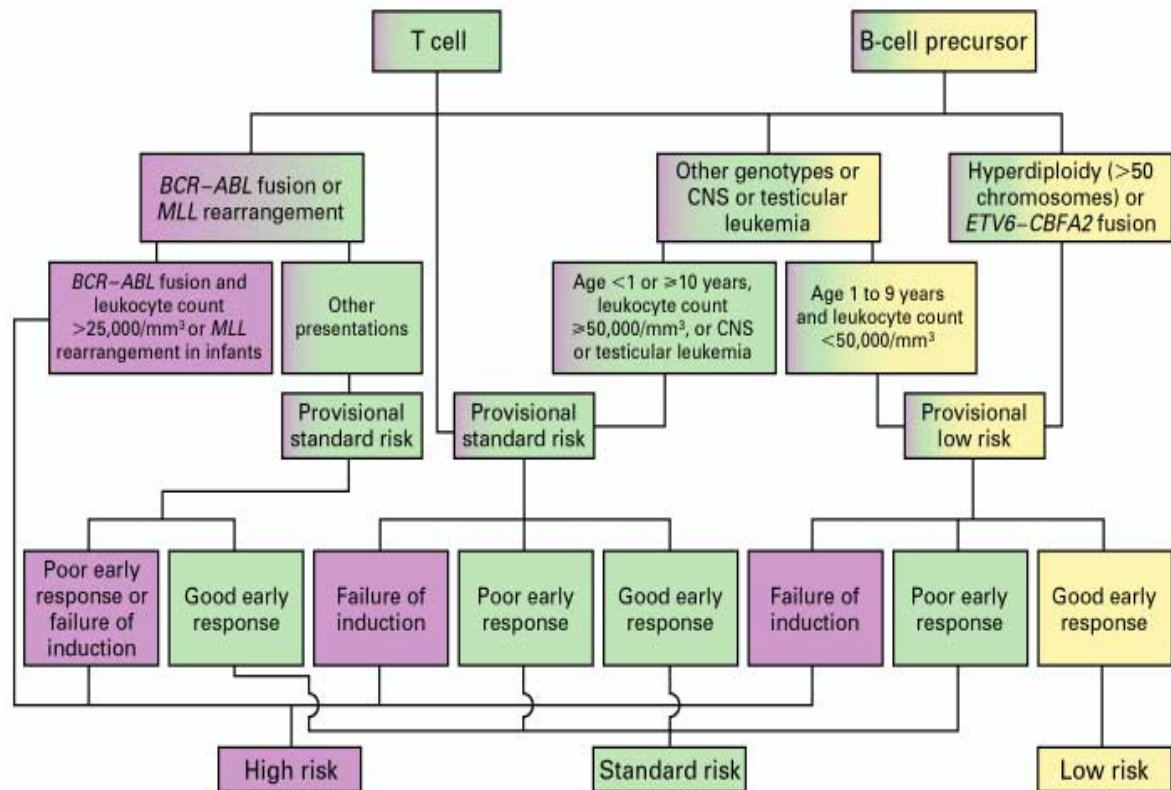


FIGURA 8: Sistema de clasificación de riesgo propuesto de acuerdo con el inmunofenotipo y genotipo, edad, recuento de leucocitos, respuesta inicial al tratamiento y presencia /ausencia de enfermedad extramedular (en enfermedad de precursores de células B). Todos los pacientes con LAL de células T se consideran de riesgo estándar para la recaída, excepto aquellos con buena respuesta a la terapia de inducción. Entre los pacientes con LAL de células B, el grupo de alto riesgo se define por la presencia del gen de fusión BCR-ABL y alto número de leucocitos o pobre respuesta inicial a la terapia de inducción, reordenamientos MLL (en niños), o falta de respuesta a la terapia de inducción. Los pacientes con LAL de bajo riesgo tienen un inmunofenotipo de células de precursores B con hiperdiploidía (>50 cromosomas), el gen de fusión ETV6-CBFA2 (TEL-AML1), o una edad de 1 a 9 años y menos de 50000 leucocitos /mm³, con respuesta inicial favorable a la quimioterapia. Los demás pacientes con LAL de células de precursores B se consideran de riesgo estándar. La terapia con antimetabolitos y pulsos de vincristina y dexametasona es suficiente para el tratamiento de la LAL de bajo riesgo, mientras que la LAL de riesgo estándar requiere terapia con multidrogas más intensiva. Los pacientes con LAL de alto riesgo son candidatos a trasplante de stem-cell. CNS=Sistema Nervioso Central. Los pacientes con LAL de células maduras B no están incluidos en esta clasificación debido a que requieren terapias especializadas. (Tomado de Pui C-H et al. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-615).

I-C. GEN DE LA CALCITONINA Y METILACION

Como ya hemos comentado, la alteración en la metilación del ADN es una, entre otras, de las anormalidades observadas en distintos tipos de neoplasias, entre ellas también las hematológicas. Las modificaciones en los patrones de metilación del ADN se han postulado recientemente como uno de los posibles orígenes de la carcinogénesis. La metilación de los residuos de citosina en las islas CpG en la región promotora de varios genes supresores de tumores se ha observado específicamente en células neoplásicas y dicha hipermetilación se correlaciona con la supresión de la expresión de dichos genes^{146, 147}.

El brazo corto del cromosoma 11 ha centrado la atención de forma especial en relación con las alteraciones de la metilación en el cáncer¹⁴⁸. Este hecho se debe, sobre todo, a su alto contenido en genes relacionados con la regulación del crecimiento celular, especialmente un gen supresor de tumores: el CDKN1C, el cual codifica el inhibidor cinasa ciclín-dependiente (CDK) p57KIP2¹⁴⁹, localizado exactamente en la banda 11p15.5. El gen de la calcitonina (CALC1) está también localizado en esta área, concretamente en la banda 11p15.4, y debido a los numerosos sitios potenciales para la metilación de islas CpG en su región 5', este gen ha servido de marcador del estado de metilación en la región 11p15¹⁵⁰. En este sentido, la hipermetilación del gen CALC1 se ha descrito en leucemias agudas, síndromes mielodisplásicos, linfomas y tumores sólidos¹⁵¹⁻¹⁵³. Además, un hallazgo interesante ha sido comprobar que el gen CALC1 está normalmente metilado en la Leucemia Mieloide Crónica en su fase crónica, pero se observa hipermetilado cuando la enfermedad progresa, sugiriendo que el cambio en el

estado de metilación de dicho gen se correlaciona con la progresión de la enfermedad^{154, 155}.

En lo que se refiere a la metilación del gen CALC1 en la LAL, se ha descrito en un trabajo que estudiaba 14 pacientes pediátricos que 13 de dichos enfermos mostraban un número incrementado de sitios CpG metilados en el momento del diagnóstico cuando se comparaban con ADN control procedente de individuos sanos¹⁵⁶. Además este estudio ponía de manifiesto que la región 5' del gen CALC1 está metilada significativamente en un grado mayor en las LAL-T comparadas con las LAL-B¹⁵⁶. De igual manera se analizaron los 6 pacientes que recayeron y se observó un incremento en la metilación del ADN en el momento de la recaída con respecto al diagnóstico inicial, sugiriendo que la metilación aberrante del ADN puede jugar un papel importante en la progresión tumoral¹⁵⁶.

I-C. 1. CICLO CELULAR Y p57KIP2

La capacidad de proliferación de una célula viene determinada por la maquinaria molecular implicada en su ciclo celular que ejecuta de forma ordenada una serie de procesos que culminaran con la división de la célula.

El ciclo celular se ha dividido clásicamente en 2 fases: MITOSIS e INTERFASE. En la interfase la célula crece y duplica su material genético; a su vez tiene tres subfases: G1, S y G2.

En G1 se sintetizan una serie de proteínas necesarias para la progresión a la fase S (de Síntesis), en la que se produce la replicación del material genético. La fase G2 es el intervalo que precede a la fase M (de Mitosis), en la que tiene lugar la división nuclear y citoplasmática. En la transición G1/S y en G2/M existen

puntos de control¹⁵⁷ que aseguran que células con lesiones en el ADN no progresen en el ciclo celular. Así, en la fase G1 se encuentran puntos de control que actúan frenando el ciclo celular si se detectan alteraciones en el ADN, para permitir la reparación del mismo antes de la progresión del ciclo celular. En esta fase se ha definido un período de tiempo denominado punto R o de restricción¹⁵⁸, cuya superación lleva a las células a progresar a lo largo del ciclo celular independientemente de la presencia de estímulos mitóticos. Pasado este punto, la célula se vuelve refractaria a la acción de señales extracelulares. Por lo tanto, es en la fase G1 cuando se decide si la célula continúa progresando a lo largo del ciclo celular o, por el contrario, lo abandona y entra en un estado de quiescencia (G0).

Las principales proteínas del ciclo celular son las *ciclinas* y las *quinasas dependientes de ciclinas* (CdKs). Estas dos proteínas se asocian formando complejos, en los que la quinasa corresponde a la subunidad catalítica y la ciclina es la subunidad reguladora. Estos complejos están sometidos a un importante sistema de regulación ya que serán los encargados de activar el ciclo celular al fosforilar a diversos sustratos entre los que se encuentran principalmente la proteína del gen Retinoblastoma (*pRb*). Una vez en su forma hiperfosforilada, pRb liberará toda una serie de factores de transcripción importantes para la progresión del ciclo celular^{159, 160}.

I-C. 1. 1. CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CdKs)

Las CdKs se caracterizan por necesitar la unión de la ciclina para ser activas, por eso han recibido este nombre. Todas las CdKs son serina/treonina cinasas cuyas secuencias tienen una homología superior al 50%. Presentan una región altamente conservada llamada PSTAIRE, que está implicada en la unión a la ciclina y posiblemente sea en parte responsable de que esta unión sea específica a las

distintas ciclinas. Hasta la fecha actual, se han descrito 8 miembros de esta familia en células humanas¹⁶¹. Cada CdK se asocia de manera específica a una o varias ciclinas y realiza su función en un punto concreto del ciclo celular (**Figura 9**).

I-C. 1. 2. CICLINAS

Destacan cuatro clases que claramente están implicadas en el control del ciclo celular. Se clasifican en dos grupos según su patrón de expresión y actividad: ciclinas de fase G1, formadas por ciclina D y E, y ciclinas mitóticas, formadas por ciclina A y B (B1 y B2). Cuando la célula entra en ciclo desde G0, las ciclinas de tipo D y la ciclina E se sintetizan secuencialmente durante la fase G1¹⁶². Existen tres tipos de ciclinas D: D1, D2 y D3¹⁶³, cuya expresión depende de factores de crecimiento. Su sobreexpresión lleva a un acortamiento moderado de la fase G1, una disminución del tamaño celular y a una independencia a la acción de agentes mitógenos^{164, 165}. La ciclina D podría estar implicada en el control del punto de restricción actuando como un sensor de la célula para detectar la presencia de factores de crecimiento y permitir integrar la información del medio externo con la maquinaria de control de la división celular^{164, 166, 167}. La ciclina E parece estar implicada en el inicio de la replicación del ADN siendo crucial en la transición G1/S¹⁶⁸. Tiene un patrón cíclico de expresión y su sobreexpresión implica un acortamiento de la fase G1 y un tamaño celular menor¹⁶⁵. La expresión de esta ciclina parece estar inducida por la proteína p53, lo que sugiere que podría participar en la respuesta de la célula a situaciones de “estrés”¹⁶⁹. La ciclina A es una ciclina mitótica que participa en el control de la replicación del ADN y en la entrada en mitosis¹⁷⁰. La ciclina B participa en la mitosis y se considera la ciclina por antonomasia¹⁷¹.

I-C. 1. 3. COMPLEJOS CdK/CICLINAS

Durante la fase G1 y la transición G1/S están activos los complejos CdK asociados a ciclinas de fase G1. La ciclina D se asocia sobre todo a CdK4 y CdK6. La actividad de estas quinasas se detecta a partir de la mitad de G1 y se incrementa a medida que se acercan a la transición G1/S¹⁷². La ciclina E se une con la CdK2 y recientes datos sugieren que también puede ensamblarse con CdK3. Este complejo está activo hacia el final de G1 y en la fase S, en la cual también permanece activo CdK2/ciclina A. Ambos complejos parecen ser importantes en el proceso de replicación del ADN^{168, 170}. En la transición G2/M y en la mitosis se encuentran activos principalmente CdK2/ciclina A y CdK2/ciclina B¹⁷⁰ (**Figura 9**).

Los complejos CdK/ciclina fosforilarán diferentes sustratos en las diferentes fases del ciclo celular. El sustrato principal de los complejos constituidos por ciclinas de fase G1 es la pRb¹⁷³. pRb inhibe la progresión del ciclo celular cuando se encuentra hipofosforilada porque en esta forma secuestra factores que son necesarios para la transcripción de genes implicados en la progresión hacia la fase S, entre ellos el E2F. pRb será fosforilado por diferentes complejos CdK/ciclina hasta el final de la mitosis, de esta forma los factores de transcripción permanecerán libres y permitirán la progresión a lo largo del ciclo. CdK4/ciclina D será el primer complejo que fosforilará a pRb durante la fase G1 (en el denominado punto R), permitiendo la progresión de la célula a través de G1/S¹⁷² (**Figura 9**).

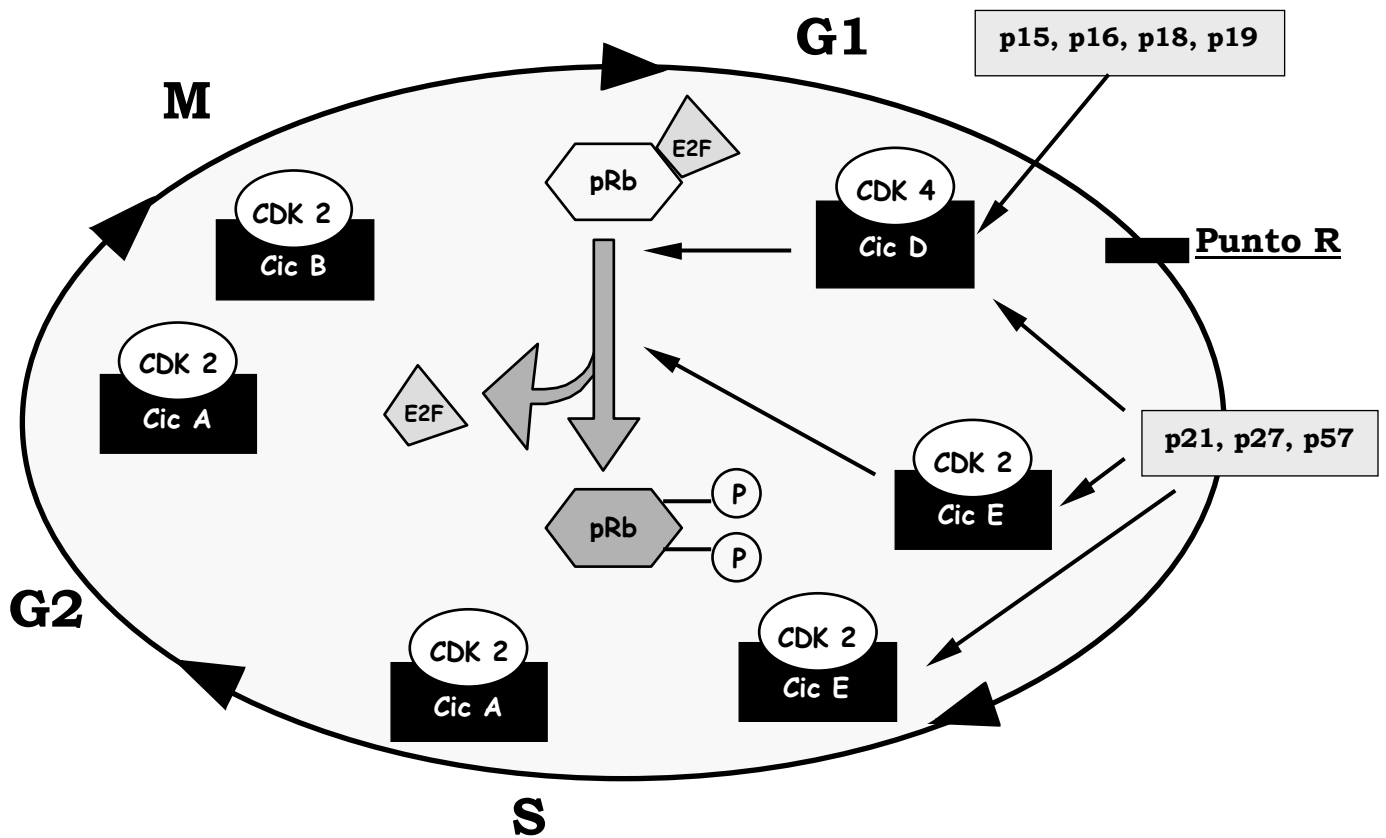


Figura 9: Cada complejo CDK/ciclina realiza su función en un punto concreto del ciclo celular. CDK 4/ciclina D será el primer complejo que fosforilará a pRb durante la fase G1 (en el denominado punto R), permitiendo la progresión de la célula a través de G1/S. pRb en su forma hiperfosforilada liberará una serie de factores de transcripción importantes para la progresión a lo largo del ciclo celular.

I-C. 1. 4. INHIBIDORES DE CdKs

Los inhibidores de CdKs se agrupan en dos familias sobre la base de la similitud de sus secuencias, su modo de acción y su especificidad de sustrato. Una de ellas es la familia **KIP** y la otra la denominada **INK4**. Dentro de la primera encontramos p21/Cip1/Waf1¹⁷⁴, p27/KIP1^{175, 176} y p57/KIP2¹⁷⁷. Los componentes de esta familia son capaces de inhibir todos los complejos CdK/ciclina de fase G1 y S, y en menor medida CdC2¹⁷⁵⁻¹⁷⁸.

p21^{waf1} fue una de las primeras proteínas inhibidoras de CdKs identificada¹⁷⁴. Se une e inhibe las CdKs necesarias para la iniciación de la fase S, también se une al antígeno de proliferación nuclear (PCNA) pudiendo inhibir su actividad replicativa sin inhibir su capacidad reparatoria. p21 puede ser activada por p53 normal¹⁷⁴. Inhibidores del ciclo celular como TNF α , TGF β y el interferón gamma pueden inducir p21 de una forma independiente de p53¹⁷⁹.

p27 también interactúa con diferentes complejos CdK/ciclina y es capaz de responder a diferentes señales mitógenas y antimitógenas.

p57 es uno de los últimos miembros de la familia KIP descrito¹⁷⁷. También puede interactuar con diferentes complejos CdK/ciclina y podría estar implicado en la salida de las células del ciclo celular durante el desarrollo y en la diferenciación de algunos tipos celulares.

La familia INK4 esta formada por cuatro miembros: p16/INK4a¹⁸⁰, p15/INK4b¹⁸¹, p18/INK4c y p19/INK4d¹⁸². Son inhibidores específicos de CdK4 y CdK6 y su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas D por la unión a las CdKs. También pueden disociar los complejos CdK/ciclina desplazando a la ciclina y uniéndose a la CdK.

P16 determina la inhibición de la actividad catalítica del complejo CdK/ciclina D, lo que impedirá la fosforilación de pRb y la progresión a través de G1/S. Parece ser que la regulación de p16 y pRb viene determinada por un mecanismo de “feed-back”¹⁸³.

La supresión del crecimiento celular por parte de **p18**, al igual que p16, parece ser dependiente de la existencia de una proteína pRb normal endógena¹⁸⁴. Por su parte, **p19** es capaz de unirse e inhibir tanto a CdK4 como a CdK6.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Aunque, como hemos comentado previamente, las anormalidades genéticas, especialmente las traslocaciones cromosómicas, están bien establecidas como marcadores pronósticos entre los pacientes afectos de LAL y que además los transcritos de fusión de dichas traslocaciones pueden ser de utilidad no sólo en el momento del diagnóstico sino también en la monitorización de la enfermedad mínima residual, en la recaída precoz y en la respuesta al tratamiento; dichas anormalidades se detectan solamente en una baja proporción de pacientes y en subtipos morfológicos específicos de LAL. Es por ello, que se hace necesario identificar otros factores que puedan ayudarnos en la valoración pronóstica de estos pacientes.

Muy recientemente, varios investigadores han descrito anormalidades (como por ejemplo la metilación) de genes supresores de tumores o de genes reguladores del ciclo celular en pacientes con LAL. También, como hemos visto, se ha observado hipermetilación del gen *CALC1* en el momento del diagnóstico y en el momento de la recaída en enfermos con LAL, apuntando el papel de la metilación en la progresión de la LAL. Sin embargo, hasta el momento son muy pocos los estudios que han analizado la repercusión de esta anormalidad sobre la evolución clínica en pacientes afectos de LAL.

Por todo ello, nos proponemos como objetivos de esta tesis:

1. Examinar si hay relación entre la metilación del gen *CALC1* y la presentación clínica de pacientes con LAL.
2. Analizar si hay correlación entre este hecho molecular y la evolución de la enfermedad.
3. Investigar si la metilación del gen *CALC1* se relaciona con una alteración en la expresión del gen *p57KIP2*.

III. HIPOTESIS

Con los anteriores objetivos pretendemos demostrar nuestra hipótesis de trabajo:

La hipermetilación del gen de la calcitonina en pacientes afectos de LAL es un marcador de mal pronóstico en dichos pacientes y se relaciona con una disregulación de la expresión del gen supresor de tumores p57KIP2.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV-A. PACIENTES

De los pacientes diagnosticados de LAL en el período comprendido entre Octubre de 1984 y Enero del 2000, incluimos en nuestro estudio 105 pacientes que provenían de 3 hospitales diferentes: Hospital Reina Sofía (n= 72); Hospital Carlos Haya de Málaga (n=23); y Hospital Doce de Octubre de Madrid (n=10).

La mediana de edad de dichos pacientes en el momento del diagnóstico se situó en los 14 años (rango de 0,5 a 82 años); 56 pacientes fueron niños, con una mediana de edad de 5 años (rango 0,5-14); y 49 fueron adultos: mediana de edad de 34 años (rango 15 a 82). 76 pacientes eran varones (38 varones adultos y 38 niños) y el resto (n=29) fueron mujeres (11 mujeres adultas y 18 niñas).

Sesenta pacientes fueron casos diagnosticados consecutivamente (desde Enero de 1996) y se estudiaron prospectivamente. Los 45 casos restantes se seleccionaron en base solamente a la disponibilidad de muestras del diagnóstico criopreservadas y fueron estudiados retrospectivamente. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o de sus tutores.

No se encontraron diferencias significativas en relación con las características demográficas de los pacientes entre nuestro grupo de estudio y otras series estudiadas con anterioridad de pacientes con LAL¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

La media de leucocitos al diagnóstico fue de $45,7 \times 10^9/L$ (intervalo de 0,7 a $475 \times 10^9/L$), la de hemoglobina era de 10,25 gr/dL (intervalo de 3,70 a 16,50) y la de plaquetas fue de $90,6 \times 10^9/L$ (intervalo de $6 \times 10^9/L$ a $408 \times 10^9/L$). Según la clasificación FAB para las leucemias agudas linfoblásticas en el grupo de estudio se observaron 39 L1, 58 L2 y 8 L3. De las 105 LAL diagnosticadas, 82

fueron de estirpe celular B y las restantes (n=23) fueron de línea T. Cinco pacientes presentaron afectación del SNC al diagnóstico (definida como presencia de > 5 células blásticas / mL en el estudio de LCR en el momento del diagnóstico); 59 pacientes tenían organomegalias inicialmente (esplenomegalia, hepatomegalia o ambas) y en 34 se observaba masa mediastínica en las radiografías de tórax realizadas en el diagnóstico.

En cuanto a las alteraciones moleculares y/o citogenéticas detectadas comentaremos que 16 pacientes presentaban transcritos BCR-ABL, en 3 pacientes se observaba la traslocación t(1;19), cuatro pacientes tenían alteraciones de la región cromosómica 11q23, en 8 se constataba anormalidades del cromosoma 8 (t(8;14), t(2;8) y t(8;22)), seis sujetos presentaban alteraciones de los cromosomas 7 y/o 14. Cuarenta y seis pacientes tenían un cariotipo normal y 21 presentaban otras alteraciones no descritas con efecto pronóstico.

Los pacientes fueron estratificados en grupos de riesgo de acuerdo con los protocolos terapéuticos empleados, dicha estratificación está basada en todos los casos en aspectos pronósticos (incluyendo la citogenética). Además, para el ulterior análisis estadístico, los niños también fueron agrupados de acuerdo con los criterios de clasificación de riesgo del Instituto Nacional del Cáncer (INC) de EE.UU¹²⁹.

Clasificación del riesgo según el INC.

CARACTERÍSTICAS CLINICAS	RIESGO ESTANDAR	RIESGO ALTO
EDAD	1-9 años	<1 año >/= 10 años
LEUCOCITOS AL DIAGNOSTICO (x 10⁹/L)	< 50	>/=50
FENOTIPO B vs. T	LAL línea B	LAL línea T

La terapia se administró según los protocolos vigentes en cada momento del diagnóstico del grupo PETHEMA¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

Cuarenta y tres pacientes recayeron. Veintitrés pacientes fueron sometidos a trasplante de células madres hematopoyéticas (10 autólogos y 13 alogénicos) en primera remisión completa (n=7) o en segunda remisión completa (n=16). Cincuenta y ocho pacientes se encuentran actualmente vivos.

Las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se detallan en las **Tablas 1, 2 y 3**.

TABLA 1. CARACTERISTICAS CLINICAS Y EVOLUCION DE LOS 105 PACIENTES DE ACUERDO CON EL ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1.

	HIPOMETILADOS (n=58)	HIPERMETILADOS (n=47)	p
-EDAD (mediana)	19,7+/-20,5	20,7+/-17,8	NS
{<15 Años			
{>15 Años	{ 34	{ 22	
	{ 24	{ 25	
-SEXO (H/M):	41/17	35/12	NS
-LEUCOCITOS(10 ⁹ /L):	51,2+/-81,2	39,0+/-44,2	NS
{<50·10 ⁹ /L			
{>50·10 ⁹ /L	{ 41	{ 37	
	{ 17	{ 10	
-BLASTOS PERIFERICOS (%):	58,8+/-27,0	53,3+/-32,0	NS
-HEMOGLOBINA (g/dL):	9,7+/-2,8	10,8+/-3,2	NS
-PLAQUETAS (10 ⁹ /L):	78,0+/-70,6	103,2+/-87,0	NS
-CLASIFICACION FAB (n):			NS
{L1			
{L2	{ 23	{ 16	
{L3	{ 29	{ 29	
	{ 6	{ 2	
-LINEA CELULAR (n):			0,025
{B			
{T	{ 50	{ 32	
	{ 8	{ 15	
-ENFERMEDAD SNC al DIAGNOSTICO (n):	4	1	NS
-ORGANOMEGALIAS (n):	34	25	NS
-MASA MEDIASTINICA (n):	18	16	NS
-ANTIGENOS MIELOIDES + (n):	13	5	NS
-CD34 + (n):	29	19	NS
-TMO (n):	9	14	NS
-MEJOR RESPUESTA (n):			NS
{RC			
{NO CR	{ 49	{ 43	
	{ 7	{ 6	
-ANORMALIDADES CITOGENETICAS/MOLECULARES (n):			NS
{BCR-ABL			
{t(1;19)	{ 6	{ 10	
{11q23	{ 2	{ 1	
{c-Myc	{ 3	{ 1	
{7q35 - 14q11	{ 4	{ 4	
{NORMAL	{ 2	{ 4	
{OTROS	{ 26	{ 20	
{NO DETERMINADOS	{ 12	{ 9	
	{ 1	{ 0	
-RECAIDA (n):	11	32	<0,00001
-EXITUS (n):	21	26	0.06

TABLA 2. CARACTERISTICAS CLINICAS Y EVOLUCION DE LOS 49 PACIENTES CON LAL DEL ADULTO DE ACUERDO CON EL ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1.

	HIPOMETILADOS (n=24)		HIPERMETILADOS (n=25)		p					
-EDAD (mediana):	39,2+/-18,4		32,8+/-16,3		NS					
-SEXO (H/M):	18/6		20/5		NS					
-LEUCOCITOS (10 ⁹ /L):	56,2+/-98,2		49,7+/-54,3		NS					
{ <50·10 ⁹ /L	{ 16		{ 18							
{ >50·10 ⁹ /L						{ 8				
-BLASTOS PERIFERICOS (%):	57,7+/-28,6		59,53+/-31,9		NS					
-HEMOGLOBINA (g/dL):	10,9+/-3,0		11,9+/-3,2		NS					
-PLAQUETAS (10 ⁹ /L):	82,1+/-63,7		88,2+/-89,3		NS					
-CLASIFICACION FAB (n):					NS					
{ L1	{ 5		{ 6							
{ L2						{ 18				
{ L3								{ 4		
-LINEA CELULAR (n):					0,01					
{ B	{ 21		{ 14							
{ T						{ 3				
-ENFERMEDAD SNC al DIAGNOSTICO (n):	2		0		NS					
-ORGANOMEGALIAS (n):	12		13		NS					
-MASA MEDIASTINICA (n):	9		8		NS					
-ANTIGENOS MIELOIDES + (n):	5		5		NS					
-CD34 + (n):	10		13		NS					
-TMO (n):	7		10		NS					
-MEJOR RESPUESTA (n):					NS					
RC	16		22		NS					
-GRUPO RIESGO PETHEMA (n):										
{ ESTANDAR	{ 4		{ 6							
{ ALTO					{ 20					
-ANORMALIDADES CITOGENETICAS/MOLECULARES (n):							NS			
{ BCR-ABL	{ 5		{ 8							
{ t(1;19)						{ 0				
{ 11q23								{ 1		
{ c-Myc						{ 3				
{ 7q35 - 14q11								{ 0		
{ NORMAL						{ 14				
{ OTROS								{ 8		
{ NO DETERMINADOS						{ 0				
-RECAIDA (n):								7		17
-EXITUS (n):						14		16		NS

TABLA 3. CARACTERISTICAS CLINICAS Y EVOLUCION DE LOS 56 PACIENTES CON LAL INFANTIL DE ACUERDO CON EL ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1.

	HIPOMETILADOS (N=34)	HIPERMETILADOS (N=22)	p
-EDAD (mediana):	5,3+/-4,1	6,1+/-4,8	NS
-SEXO (H/M):	23/11	15/7	NS
-LEUCOCITOS (10 ⁹ /L):	47,8+/-68,1	26,8+/-24,9	0,01
{<50·10 ⁹ /L	{25	{19	
{>50·10 ⁹ /L	{9	{3	
-BLASTOS PERIFERICOS (%):	59,6+/-26,2	46,6+/-31,4	NS
-HEMOGLOBINA (g/dL):	8,9+/- 2,5	9,5+/- 2,8	NS
-PLAQUETAS (10 ⁹ /L):	75,3+/-70,4	89,1+/-73,2	NS
-CLASIFICACION FAB (n):			NS
{L1	{18	{10	
{L2	{14	{11	
{L3	{2	{1	
-LINEA CELULAR (n):			NS
{B	{29	{18	
{T	{5	{4	
-ENFERMEDAD SNC al DIAGNOSTICO (n):	2	1	NS
-ORGANOMEGALIAS (n):	22	12	NS
-MASA MEDIASTINICA (n):	9	8	NS
-ANTIGENOS MIELOIDES + (n):	8	0	0,01
-CD34 + (n):	19	6	0,03
-TMO (n):	2	4	NS
-MEJOR RESPUESTA (n):			NS
RC	33	21	
-GRUPO RIESGO PETHEMA (n):			NS
{ESTANDAR	{11	{5	
{ALTO	{23	{17	
-GRUPO RIESGO NCI (n):			NS
{ESTANDAR	{19	{13	
{ALTO	{15	{9	
-ANORMALIDADES CITOGENETICAS/MOLECULARES (n):			NS
{BCR-ABL	{1	{2	
{t(1;19)	{2	{1	
{11q23	{2	{1	
{c-Myc	{1	{1	
{7q35 - 14q11	{2	{2	
{NORMAL	{12	{12	
{OTRAS	{4	{5	
{NO DETERMINADAS	{1	{0	
-RECAIDA (n):	4	15	0,00002
-EXITUS (n):	7	10	0,02

IV-B. METODOS

IV-B. 1. DETECCION DEL FENOTIPO INMUNOLOGICO

Los antígenos de la superficie celular se detectaron por técnicas de inmunofluorescencia directa en análisis realizados con citometría de flujo usando un panel de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina reactiva con antígenos linfoides y mieloides (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD22, CD13, CD14, CD33, CD34 y HLA-Dr) (Becton-Dickinson, San José, CA, USA). Cuando se expresaban antígenos mieloides en, al menos, el 20% de las células, se empleó un análisis de fluorescencia dual usando ficoeritrina conjugada con Ac monoclonales dirigidos contra antígenos mieloides con la finalidad de confirmar la coexpresión de ambos antígenos en la misma célula. El análisis y la obtención de los datos se llevó a cabo a través de un Coulter Profile II (Hialeah, FL, USA). El análisis se restringió a la población leucémica por medio del tamaño y complejidad celular según parámetros de dispersión frontal y lateral de luz. Para la detección intracitoplasmática de la mieloperoxidasa, la detección de CD22, CD3 y TdT se realizó una tinción inmunocitoquímica usando la técnica fosfatasa alcalina/antifosfatasa alcalina (FAFAA) y el empleo de anticuerpos monoclonales específicos MPO-7 (Dako, Glostrup, Denmark), CD22 y CD3 (Becton-Dickinson, San José, CA, USA) y TdT (Inmunotech, Marseille, France).

IV-B. 2. CITOGENÉTICA

Para los análisis citogenéticos, se cultivaron células procedentes de la médula ósea en medio de McCoy suplementado con un 20% de suero "fetal calf" y antibióticos durante 48 horas.

Las preparaciones cromosómicas fueron teñidas con solución de Giemsa al 5% siguiendo los procedimientos habituales. Se analizaron un mínimo de 25 metafases por muestra. Esto permitió la detección de un clon celular menor con un 5% de sensibilidad.

IV-B. 3. AISLAMIENTO DE ACIDOS NUCLEICOS

IV-B. 3. 1. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN procedente de muestras de médula ósea de pacientes con un porcentaje en blastos superior a un 90% fue aislado siguiendo un método de extracción salina carente de solventes orgánicos^{189, 190}. El botón leucocitario fue disuelto en 3 ml de tampón de lisis de leucocitos (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl y 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2). El lisado celular se digirió durante una noche a 37°C con 0.2 ml de SDS al 10% y 0.5 ml de solución de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en 1% de SDS y 2 mM de Na₂EDTA). Tras la digestión, se añadió 1 ml de una solución de NaCl 5.5 M y se centrifugó. El sobrenadante fue transferido a otro tubo donde se añadió dos volúmenes de etanol absoluto. El precipitado de ADN fue recuperado y disuelto en tampón Tris-EDTA (10mM-0.2mM). La concentración del ADN se midió con un espectrofotómetro a 260 nm de longitud de onda. La pureza del ADN fue determinada mediante la ratio de lecturas 260nm/280nm. Se consideró que un ADN era válido para el estudio si dicha pureza oscilaba entre 1.6 y 2.0. El ADN fue conservado a 4°C hasta su uso.

IV-B. 3. 2. EXTRACCIÓN DEL ARN

El ARN se extrajo de la capa leucocitaria de médula ósea de pacientes que contenían >90% de blastos en todos los casos y de donantes de médula ósea como controles negativos. Se empleó el método de la guanidina ácida/fenol/cloroformo¹⁹¹, con modificaciones que incluyeron la utilización de un producto comercial (Ultraspec, Biotecx, USA) con el fin de simplificar el procedimiento. Todas las muestras se dividieron en tres alícuotas que se trataron por separado.

La capa de leucocitos se homogeneizó en 1 ml de Ultraspec y congeladas a -70°C hasta la extracción del ARN. Una vez descongeladas, se añadió 0.2 ml de cloroformo absoluto y se centrifugaron. El sobrenadante, libre de contaminación por ADN genómico, se transfirió a otro tubo al que se añadió un volumen de isopropanol. Tras su centrifugación, el precipitado de ARN fue lavado dos veces con etanol al 75% y disuelto en 50-75 µl de agua bidestilada tratada con dietilpirocarbamato al 1% como inhibidor de ARNasas. Todo el proceso se realizó a 4°C y la concentración final de ARN fue cuantificada por espectrofotometría a 260 nm.

IV-B. 4. DIGESTION DE RESTRICCIÓN Y TECNICA PCR PARA DETECTAR METILACION EN EL GEN CALC 1

Se empleó una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diferencial semicuantitativa que es capaz de detectar cambios sutiles en los patrones de metilación del gen humano CALC1¹⁹².

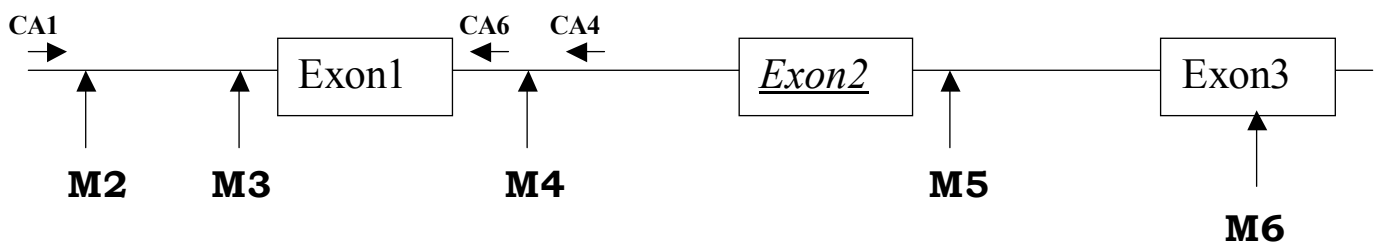
Esta técnica se basa en tres principios:

- a) Digestión del ADN con una enzima de restricción sensible a la metilación.
- b) Amplificación simultánea del gen diana (región 5' del gen *CALC1*) y un gen de referencia para la medida cuantitativa de la metilación.
- c) Amplificación simultánea de un competidor con idénticos sitios de unión a los cebadores que el gen diana como control de una correcta digestión.

Cinco microgramos de ADN genómico se digirieron completamente en 50 μ l de volumen total de digestión con 50 U de *Hpa II* tal como recomienda el fabricante (Promega, Madison, WI, USA) y fueron luego precipitados con acetato amónico y etanol. El pellet así obtenido se lavó 2 veces con una solución de etanol al 70% y se disolvió en 50 μ l de agua destilada. Cinco microlitros (aproximadamente 0,5 μ gr) de esta solución se añadió en una mezcla para PCR de 45 μ l de volumen constituida por: 200 μ M de cada uno de los cuatro dNTP, 10 mM de Tris-HCl a un pH de 8,3, 1,5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 0,001% de gelatina, 2,5 U de Taq polimerasa de ADN (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), 0,5 mM de cada uno de los cebadores —CA1 (5'-CATCTGTACCTTGCAACTCA-3') y CA4 (5'-TGCAGTGCGAGAGAGTAAGA-3')— y 0,25 mM de cada uno de los cebadores —IFN5' (5'-GGCACAACAGGTAGTAGGCG-3') y IFN3' (5'-AAGGCAGGGGCCAGAAAGTA-3'). Los cebadores CA1 y CA4 se unen al gen *CALC1* y amplifican un producto de 1197 pares de bases (pb) de tamaño siempre y cuando la secuencia esté metilada, ya que la *Hpa II* sólo reconoce sitios de restricción no metilados. Como se muestra en la **Figura 10**, los cebadores fueron seleccionados de

manera que tres sitios de restricción se incluyeran en la secuencia de amplificación. Como medida de integridad del ADN, se coamplificó un fragmento de 928 pb del gen humano de β -interferon (IFN) sin sitios de restricción por parte de la enzima *Hpa II* como control interno.

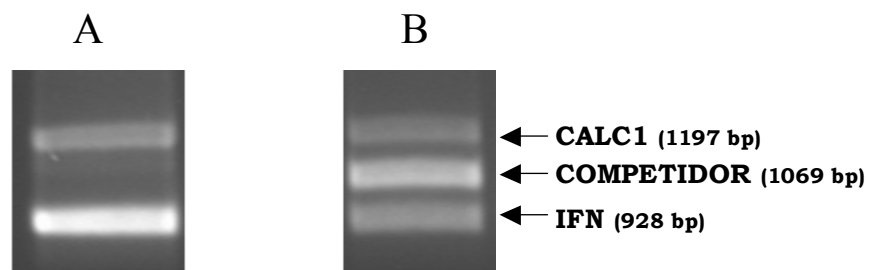
FIGURA 10:



Mapa de restricción de la región 5' del gen CALC1. Las líneas horizontales representan los intrones y los rectángulos representan los exones. Las flechas verticales muestran las posiciones de los sitios de reconocimiento de la enzima HpaII. Las flechas horizontales representan los primers usados en nuestros experimentos de PCR.

Con la finalidad de asegurar una digestión completa por parte de la endonucleasa *Hpa II*, 100 ng de un competidor no metilado se añadió a la digestión. Este competidor fue generado con los cebadores CA1 y CA6 (5'-TGCAGTGCGAGAGAGTAAGAGGGAGAGGAGGAAAGGGA-3') usando una PCR, de forma que el competidor era idéntico en sus lugares de unión al cebador a la región amplificada del gen CALC1. La PCR se llevó a cabo posteriormente con los cebadores CA1 y CA4, los cuales se unían tanto al gen CALC1 y al competidor. En caso de que la restricción enzimática fuera inhibida, los cebadores CA1 y CA4 amplificaban un producto de 1197 pb del gen CALC1 junto con un producto de 1069 pb del competidor (**Figura 11**).

FIGURA 11:



A) Muestra de LAL hipermetilada detectada usando la técnica de PCR. La banda superior representa el producto de amplificación de 1197 bp del gen CALC1 y la banda inferior el producto de 928 bp del gen β -interferon. **B)** ADN normal más un competidor no “cortado” con *HpaII*; por tanto se ven tres bandas: la banda intermedia representa el fragmento de 1069 bp derivado de la amplificación por PCR del competidor.

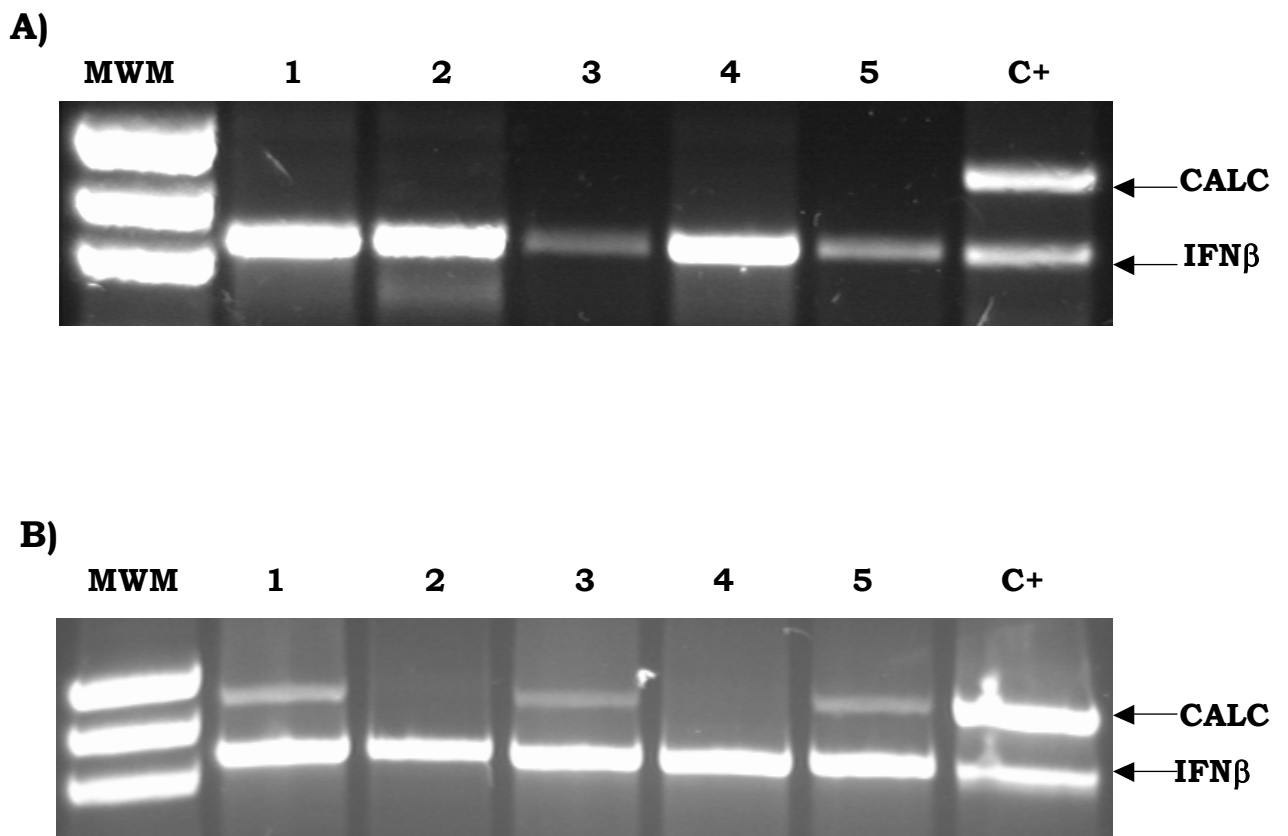
La PCR fue llevada a cabo durante 28 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 1 minuto; 57°C durante 1 minuto; 72°C durante 2 minutos. Veinte microlitros de la reacción de PCR se sometieron a migración en una cubeta de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio y posteriormente fotografiado bajo luz ultravioleta (**Figura 12**). Para el análisis semicuantitativo de geles se empleó un densitómetro BIO-PRINT y el software adecuado para dicho análisis fue proporcionado por el fabricante (Vilber-Lourmat, Marne-La-Vallee, France). La ratio, es decir, el área bajo la curva del producto del gen CALC1 dividida entre el área bajo la curva del producto del gen IFN proporciona un índice del estado de metilación de las respectivas muestras (**Figura 13**).

IV-B. 5. ANALISIS RT-PCR PARA LA EXPRESION DEL GEN p57KIP2

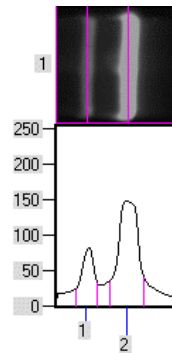
ARN total fue extraído de 2×10^6 células medulares usando Ultraspec (Biotecx laboratories Inc, Houston, TX, USA). La transcripción reversa se desarrolló sobre 1 μ gr de ARN total, después de calentar a 70°C durante 5 minutos, con hexámeros al azar como cebadores de la reacción. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 45 minutos en presencia de 12 U de transcriptasa inversa de virus de la mieloblastosis aviar (Boehringer-Mannheim, Germany). El ADNc fue amplificado usando cebadores específicos para el gen p57 (sentido: 5'-TCCACGATGGAGCGTCTTGT-3'; antisentido: 5'-GTCCACTTCGGTCCACTGCA-3')¹⁹³. La reacción PCR se desarrolló como sigue: 94°C durante 7 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, seguida de una incubación a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se

migraron en geles de agarosa al 1,5%. Así mismo se amplificaron transcritos del gen $RAR\alpha$ para evaluar la integridad del ARN¹⁹⁴.

FIGURA 12:



Estado de metilación del gen $CALC1$ detectado usando PCR de un ADN digerido por $HpaII$. **A)** Las líneas 1 a 5 representa donantes sanos y la línea 6 representa una muestra control metilada. Ningún donante mostraba banda $CALC1$ indicando hipometilación en este gen. **B)** Análisis de 6 pacientes con LAL. Se observó hipermetilación en líneas 1, 3, 5 y 6. Las líneas 2 y 4 estaban hipometiladas. MWM= marcador de peso molecular.

FIGURA 13:

NUMERO DE PICO	VOLUMEN	ALTURA	AREA
1 (CALC1)	72632	116	1260
2 (IFN β)	210623	161	2100

$$\text{RATIO } 1/2 = \mathbf{0.6}$$

Las curvas de densidad óptica de los productos de PCR son usadas para cuantificar el nivel de metilación del gen CALC1. El pico de la izquierda es debido al producto del CALC1 y el pico de la derecha es debido al producto del INF- β .

IV-B. 6. OTROS ANALISIS MOLECULARES

Se empleó el método de Southern blot estándar para detectar reordenamiento en el gen de la cadenas pesadas de la inmunoglobulinas y reordenamiento en el receptor β de las células T (TCR β) utilizando las sondas disponibles comercialmente JH ADN y CT β (Oncogene Science, NY, USA). Las alteraciones del locus 11q23 se estudiaron con la sonda B859 amablemente proporcionada por el Dr. Cimino¹⁹⁵. Los transcritos p210^{BCR-ABL} y p190^{BCR-ABL} se detectaron

usando la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR) de acuerdo con la técnica descrita por Saglio et al¹⁹⁶.

IV-B. 7. ANALISIS ESTADISTICO

Los valores de p para la comparación de variables continuas entre grupos de pacientes se calcularon mediante el test de Wilcoxon de 2 colas. Los valores de p para variables dicotómicas se calcularon mediante el test exacto de Fisher. El resto de los valores de p se estimaron mediante el test de Chi-cuadrado (test de Pearson). La supervivencia global (SG) fue medida desde el día del diagnóstico hasta el día de la muerte por cualquier causa y fue censada solamente para pacientes vivos en el último punto de corte. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue medida desde el día que se produjo la remisión completa (RC) hasta la recaída o muerte sin recaída, y fue censada solamente para pacientes que estaban vivos sin evidencia de recaída en el último seguimiento. La distribución de las curvas de SG y SLE se estimaron por el método de Kaplan y Meier con un intervalo de confianza del 95% calculado según la fórmula de Greenwood. La comparación de la SG y SLE entre grupos se determinó en base al test de log-rank. La comparación ajustada para valores pronósticos significativos se realizó en base a los modelos de regresión de Cox y a los modelos de regresión de riesgo. Todas las fechas de recaída y supervivencia fueron calculadas a 31 de Marzo de 2000 y todas las fechas de seguimiento fueron censadas en este punto.

V. RESULTADOS

V-A. ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC 1 EN POBLACION NORMAL

En primer lugar, se estudió el estado de metilación dentro del gen CALC1 en 30 donantes sanos de M.O. (5 niños y 25 adultos). En estos sujetos sólo se detectaba una débil banda CALC1 ocasionalmente. Esto indicaba que los sitios de metilación (M2, M3, M4) en el gen CALC1 estaban fundamentalmente no metilados, por lo que fueron cortados por la enzima HpaII y no pudieron ser amplificados por la PCR. En el análisis densitométrico, todos ellos mostraban una ratio de metilación inferior a 0.2, con una media de 0.075. Nosotros elegimos arbitrariamente 0.4 como punto de corte para identificar los casos en los cuales las células tumorales podían ser consideradas como hipermetiladas. Por lo tanto, el rango desde 0.01 hasta 0.39 se definió como hipometilado, y todas las ratios iguales o superiores a 0.4 se consideraron hipermetiladas.

V-B. ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1 EN LA SERIE GLOBAL

En este análisis prospectivo-restrospectivo de células de M.O., la hipermetilación del gen CALC1 se detectó en el momento del diagnóstico en el 45% (47/105) de los pacientes con LAL del adulto o infantiles de casi todos los subtipos de la FAB. Como se muestra en la **Tabla 1**, la hipermetilación del gen CALC1 se observó más frecuentemente en adultos (25/49, 51%) que en los niños (22/56, 39%), sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística. Los aspectos clínicos y de laboratorio no diferían

significativamente entre pacientes hipermetilados e hipometilados. Solamente las LAL de línea T se asociaron con hipermetilación del gen CALC1 (14% vs 32%, $p=0,025$). Los eventos moleculares o citogenéticos asociados a un pobre riesgo estaban distribuidos de forma similar entre los dos grupos definidos por la metilación del gen CALC1. De forma interesante, observamos hipermetilación del gen CALC1 en un 43% de pacientes que presentaban un cariotipo normal (20/46).

Así mismo, la **Tabla 1** recoge la historia de la recaída, los porcentajes de remisión completa y mortalidad para los pacientes que mostraban hipermetilado el gen CALC1 así como para los pacientes con dicho gen hipometilado. Los porcentajes de RC de los pacientes con gen CALC1 hipometilado e hipermetilado fueron del 84% (49/58) y 91% (43/47), respectivamente, constituyendo un 87% de RC globales. Este hecho sugiere que la hipermetilación de gen CALC1 no se correlaciona con la respuesta a la terapia de inducción a la remisión. Sin embargo, los pacientes hipermetilados presentaban mayor recaída (68% vs 19%, $p=0,00001$) y mayor mortalidad (55% vs 36%, $p=0,06$) que los pacientes hipometilados. La supervivencia libre de enfermedad estimada a los 6 años fue del $66,1 \pm 9,2\%$ para los pacientes hipometilados y del $5,3 \pm 4,9\%$ para los pacientes hipermetilados ($p=0,00001$) (**Figura 14 A**).

Para evaluar el efecto independiente de la hipermetilación del gen CALC1 sobre la SLE, se realizó un análisis multivariable que incluía los factores siguientes: presencia de transcritos BCR-ABL, número de leucocitos y edad. El número de leucocitos fue incluido tanto como una variable continua como un factor dicotómico ($<50 \times 10^9/L$ y $\geq 50 \times 10^9/L$). La edad fue incluida como una variable dicotómica (<15 años y ≥ 15 años). Con este procedimiento se identificó a la metilación del gen CALC1 ($p=0,0001$) y el número de leucocitos $>50 \times 10^9/L$ ($p=0,0005$) como las dos únicas variables

independientes. Después de ajustar la asociación de la metilación y el número de leucocitos con la SLE, la importancia de los otros factores disminuyó considerablemente (**Tabla 4 A**).

La SG no difería entre los pacientes hipometilados e hipermetilados ($41,2 \pm 16,9\%$ vs 0% , $p=0,39$).

V-C. ESTADO DE METILACION DEL GEN CALC1 EN LAL DEL ADULTO E INFANTIL

El análisis separado de los pacientes con LAL del adulto mostró los mismos resultados que la serie global (**Tabla 2**). La hipermetilación del gen CALC1 se asoció con LAL de línea T ($p=0,01$) y con un mayor porcentaje de recaídas ($p=0,01$). En el grupo de pacientes hipometilados, la SLE a los 6 años fue del $50,8 \pm 13,7\%$, contrastando con el 0% de los pacientes hipermetilados ($p=0,01$) (**Figura 14 B**). El análisis multivariable mostró que el número de leucocitos ($p=0,0001$) y la metilación del gen CALC1 ($p=0,01$) eran las únicas dos variables independientes que influían en la SLE (**Tabla 4 B**).

La LAL infantil mostraba algunas diferencias comparada con la LAL del adulto. La metilación del gen CALC1 no se asociaba con el fenotipo T (**Tabla 3**). Los pacientes hipometilados presentaban mayor número de leucocitos ($p=0,01$), más frecuencia en CD34+ ($p=0,03$) y más frecuencia de positividad para antígenos mieloides ($p=0,01$) que los pacientes hipermetilados. Comparando los niños hipermetilados con los niños hipometilados se observó que los pacientes hipermetilados presentaban índices altos de recaída ($68,1$ vs $11,7\%$, $p=0,00002$) y de mortalidad ($20,5$ vs 50% , $p=0,02$). De forma muy interesante, no se hallaron diferencias en relación con el

estado de metilación del gen CALC1 entre los distintos grupos de riesgo definidos tanto por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, USA), como por el grupo PETHEMA. La SLE estimada a los 6 años fue del $83,2 \pm 7,8\%$ para los pacientes hipometilados y del $7,6 \pm 7,2\%$ para los pacientes hipermetilados ($p=0,0009$ por log-rank test) (**Figura 14 C**). El análisis multivariable de los potenciales factores pronósticos demostró que el estado de metilación del gen CALC1 era un factor pronóstico independiente en relación con la SLE ($p=0,002$) (**Tabla 4 C**). La SG no presentaban diferencias entre los niños hipermetilados con respecto a los hipometilados (0% vs $66,9 \pm 11,9\%$, $p=0,5$).

V-D. EXPRESION P57KIP2 EN PACIENTES HIPERMETILADOS E HIPOMETILADOS

Debido a que el gen CDKI p57KIP2 es un potencial gen supresor de tumores localizado cerca del gen CALC1, hemos estudiado también si la metilación del gen CALC1 ocasiona silencio transcripcional de esta CDKI. Se estudió el ARN de 10 pacientes con LAL hipermetilados (ratio CALC1/INFb $>0,8$), diez pacientes hipometilados (ratio CALC1/INFb $<0,1$) y 5 donantes sanos (ratio $<0,01$) para la expresión de p57KIP2. Los transcritos p57KIP2 fueron indetectables en el 100% de los casos hipermetilados, mientras que por el contrario, se observaba una clara banda en todos los casos de muestras hipometiladas o muestras normales (**Figura 15**).

FIGURA 14: Supervivencia libre de enfermedad para los pacientes con LAL basada en el estado de metilación del gen CALC1. **A)** Serie global (n=105). **B)** LAL del adulto n (n=49). **C)** LAL infantil (n=56).

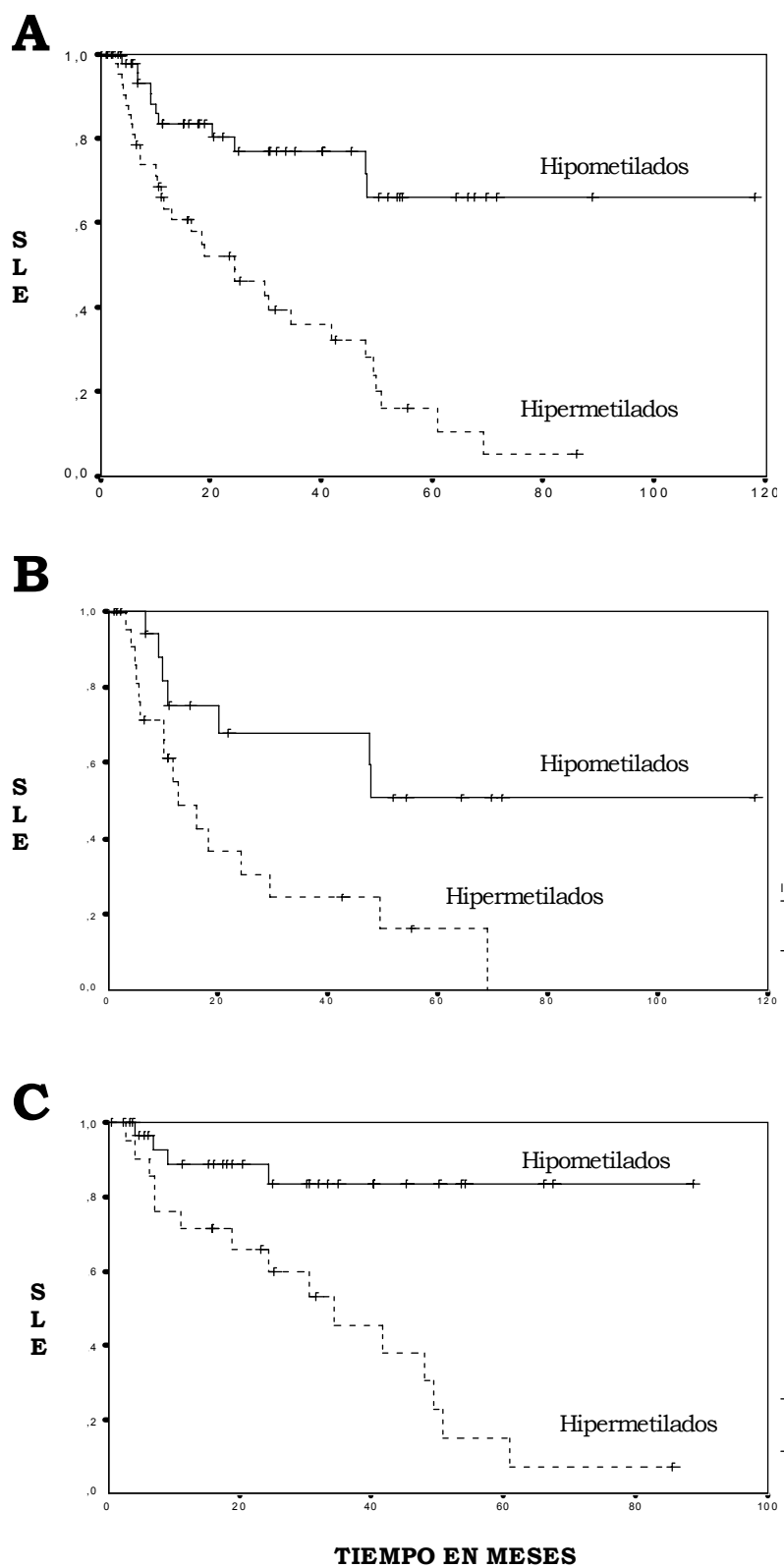


TABLA 4: Modelo multivariable de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en la serie global (A), en la LAL del adulto (B) y en la LAL infantil (C).**A**

<u>VARIABLE</u>	<u>ANÁLISIS MULTIVARIABLE</u>	
	P	p#
BCR-ABL	0,041	0,8
Nº de blastos	0,029	0,1
Fenotipo B o T	0.003	0,1
Leucocitos (dicotómica)	0,0005	—
Edad (dicotómica)	0,07	0,1
Leucocitos (continua)	0,003	0,4
Metilación CALC1	0,0001	—

B

<u>VARIABLE</u>	<u>ANÁLISIS MULTIVARIABLE</u>	
	p	p*
% blastos periféricos	0,01	0.1
Leucocitos (continua)	0,0001	—
Leucocitos (dicotómica)	0,0005	0,4
Metilación CALC1	0,0128	0,01

C

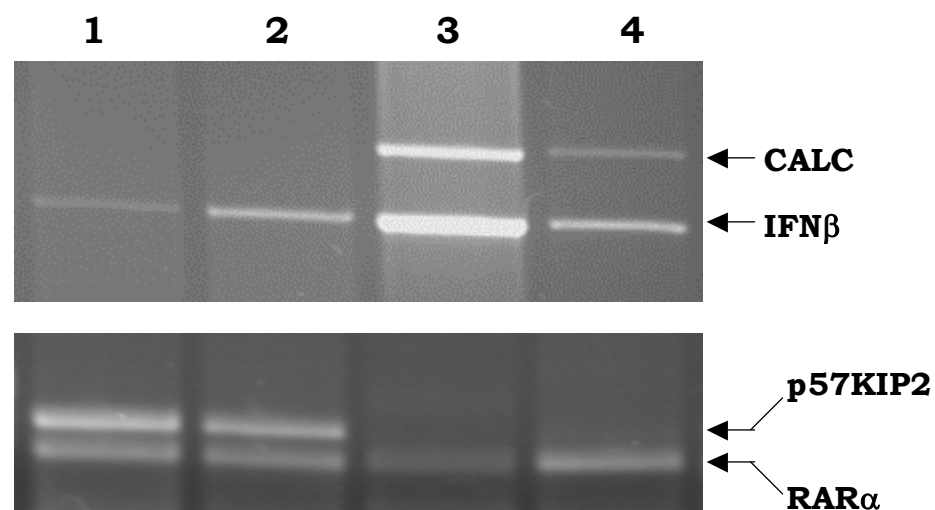
<u>VARIABLE</u>	<u>ANÁLISIS MULTIVARIABLE</u>	
	p	p¶
Metilación CALC1	0,0009	0,0026
Fenotipo	0,0005	—
Grupos riesgo NCI	0,09	0,6
Grupos riesgo PETHEMA	0,03	0,1

Edad dicotómica= <15 años o >/=15 años; **Leucocitos dicotómica**= < 50x10⁹/L o >/= 50x10⁹/L.

p# = significación después de ajustar para Leucocitos y metilación CALC1.

p* = significación después de ajustar para Leucocitos.

p¶ = significación después de ajustar para el fenotipo.

FIGURA 15:

Expresión del ARN del gen p57KIP2 en cuatro pacientes con LAL. Las líneas 1 y 2 representan muestras de LAL hipometiladas. En ellas se observa transcritos p57KIP2. Las líneas 3 y 4 representan muestras de LAL hipermetiladas. No se observa expresión de p57KIP2. Transcritos RAR α se usaron como control de integridad del ARN.

VI. DISCUSSION

En nuestra serie de pacientes, que parece representar un material de estudio no sesgado sobre la base de las características generales de los pacientes y a los índices de supervivencia publicados en la literatura¹⁸⁵⁻¹⁸⁸, hemos demostrado que la hipermetilación del gen CALC1 es frecuente y que podría constituir un hecho crucial en la génesis de las LAL. La hipermetilación aparece en una proporción importante (45%) de los pacientes afectos de LAL tanto infantiles como del adulto. Nuestros hallazgos sugieren que la metilación aberrante del gen CALC1 se presenta de forma universal y “de novo” durante la transformación leucémica en los progenitores hematopoyéticos desarrollándose en la línea linfoide tanto B como T y en todos los subtipos morfológicos de la FAB. La falta de correlación observada entre la hipermetilación del gen CALC1, el número de leucocitos al diagnóstico, el porcentaje de blastos periféricos, anormalidades citogenéticas y moleculares conocidas puede proporcionarnos evidencia para sugerir que la metilación del gen CALC1 es un hecho inicial y temprano en la génesis leucémica de la línea linfoide.

Generalmente se ha aceptado que los aspectos clínicos de los pacientes con LAL, incluyendo edad y contaje de leucocitos, son poderosos marcadores para predecir la evolución ulterior de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la clasificación en grupos de riesgo, más del 20% de niños con LAL de riesgo estándar de nuevo diagnóstico y más del 50% de pacientes con LAL del adulto están destinadas a recaer a pesar de una óptima terapia¹⁹⁷. Más recientemente, marcadores biológicos reconocidos tales como el inmunofenotipo y aspectos genéticos y la respuesta inicial a la terapia empleada se han mostrado como factores independientes de los tradicionales aspectos clínicos y se ofrecen como marcadores adicionales de enfermedad más agresiva^{129, 132-133, 135, 197-199}. En este estudio hemos demostrado que la hipermetilación del gen CALC1 es

un factor de pobre pronóstico tanto en la LAL infantil como en la del adulto. Los pacientes con hipermetilación del extremo 5' del gen CALC1 tenían una supervivencia libre de enfermedad (SLE) peor que los pacientes con patrones de metilación “normales”. El análisis estadístico multivariable confirmó que la hipermetilación del gen CALC1 se asociaba con una SLE más corta.

Un problema de este estudio es que los pacientes no han recibido un tratamiento uniforme, sin embargo, es poco probable que el efecto relacionado con el tratamiento aplicado pudiera haber tenido un efecto principal en la respuesta de los pacientes a la terapia debido a que los tratamientos estaban bien distribuidos entre los pacientes con metilación normal o alta. Es de destacar, además, que el número de pacientes que recibieron terapia de consolidación intensiva con rescate de progenitores hematopoyéticos fue similar en los dos grupos. Todos los pacientes estudiados recibieron tratamiento de acuerdo con los protocolos, que si bien cambiaron a lo largo del período de estudio, siempre estuvieron basados en los regímenes del grupo español PETHEMA. Debido a que la asociación entre el año de diagnóstico de la LAL y la presencia o ausencia de metilación del gen CALC1 es débil, cualquier cambio sutil en los protocolos de tratamiento es poco probable que haya provocado confusión en el efecto estimado de la metilación CALC1. Por tanto, el estado de metilación del gen CALC1 parece ser un nuevo y poderoso parámetro pronóstico en los pacientes afectados de LAL. Sugerimos, no obstante, que un estudio de este tipo debe realizarse en un grupo amplio de pacientes, analizados de forma consecutiva y tratados uniformemente en el seno de un protocolo clínico multicéntrico.

Podemos decir que este nuevo marcador molecular tiene un interés especial en dos grupos de pacientes:

- a) La hipermetilación del gen *CALC1* está asociada estadísticamente con LAL de células T, un tipo de leucemia en la que la mayoría de las anormalidades moleculares no tienen significación pronóstica en el contexto de las terapias intensivas actuales²⁰⁰.
- b) Más del 43% de los pacientes hipermetilados presentaban cariotipos normales, un subtipo considerado generalmente de riesgo estándar¹⁹⁸.

Además, el patrón de metilación del gen *CALC1* mostraba mayor poder estadístico para predecir el desarrollo clínico que los grupos de riesgo del PETHEMA o del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (EE.UU). Todos estos datos juntos, sugieren que la metilación del gen *CALC1*, hipermetilación versus hipometilación, podría ser usada para definir mejor aún el riesgo de estos subgrupos de pacientes.

Aunque el gen *CALC1* se considera generalmente no estar relacionado causalmente con procesos malignos²⁰¹, este gen está localizado en el cromosoma 11p15.4 donde parece haber una correlación positiva entre la metilación del ADN del gen *CALC1* y la metilación de dos regiones en el cromosoma 11p15.5 en células tumorales²⁰². De forma interesante, un gen supresor de tumores, el *p57KIP2*, el cual codifica un inhibidor de cinasa ciclín-dependiente (CDKI) también está localizado en el cromosoma 11, banda p15.5¹⁴⁹. El patrón de metilación del gen *CALC1* en células de la LAL puede corresponderse bien con la metilación del gen *p57KIP2*. En ese caso, el silencio transcripcional del gen *p57KIP2* a través de la metilación del ADN de su promotor puede ser un hecho importante en la patogénesis de la LAL. Para comprobar esta hipótesis estudiamos los

tránscritos p57KIP2 en pacientes seleccionados tanto con gen CALC1 hipermetilado como hipometilado. Nuestros resultados mostraban que la hipermetilación del gen CALC1 se correlaciona con una ausencia en la expresión del gen p57KIP2.

Se han descrito dos vías principales de regulación del ciclo celular²⁰³. Primera, en la “vía del Retinoblastoma” las proteínas inhibitorias CDK4 y CDK6, también llamadas proteínas INK4, p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) y p19 (INK4D), regulan el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. En la segunda vía los puntos de control implican a las proteínas p53, p21 (WAF/CIP1), p27 (KIP1) y p57 (KIP2) y regulan la transición G1/S. El activador de la transcripción, E2F, que se une a pRb, es el punto central de ambas vías de regulación. La hiperfosforilación de pRb por medio de las CDKs libera E2F aumentando por tanto la transcripción de los genes dianas y el ciclo celular.

Hay evidencia de que estos CDKIs son supresores de tumores y que los genes que codifican dichas proteínas pueden ser silenciados a través de deleciones alélicas, mutaciones intragenómicas o por la metilación del ADN en distintos tipos de tumores, incluyendo las LAL²⁰⁴, y por lo tanto pueden ser determinantes importantes del desarrollo de la enfermedad. De los miembros de la familia INK4, p16 y en menor medida p15 son los que se han visto más frecuentemente mutados o delecionados en ciertos tipos de cánceres humanos^{205, 206}. Se han descrito tres mecanismos diferentes que pueden inactivar el gen p16: la deleción de ambos alelos, la deleción de un alelo y una mutación intragénica en el alelo restante, y la deleción de un alelo y el silenciamiento del restante por metilación²⁰⁷.

La deleción homocigota del gen p16 constituye uno de los principales mecanismos de inactivación del mismo. No obstante, este mecanismo de inactivación de p16 podría traer consigo la inactivación de, al menos, otros dos genes supresores cercanos: p15 y

p14/p19, aportando una ventaja selectiva en el crecimiento y proliferación tumoral²⁰⁸. Con la excepción de crisis blásticas linfoides de LMC (>25%), las deleciones homocigotas del gen p16 son muy raras (\approx 5%) en neoplasias mieloides (LAM, LMC y SMD)²⁰⁹⁻²¹². Por el contrario, en neoplasias linfoides la frecuencia de dichas deleciones es superior; en el grupo de LAL, inicialmente se pensó que las deleciones eran características de las LAL de línea T²¹³, donde la incidencia supera el 50%, sin embargo, estudios posteriores en series más amplias demostraron que también en LAL de línea B este mecanismo puede estar implicado en su patogenia, aunque con una frecuencia menor (20-25%) y especialmente, en el tipo LAL de células pre-B^{212, 214, 215-217}.

Junto a las deleciones homocigotas, la metilación en la región promotora del gen p16 constituye un mecanismo importante de inactivación del mismo ya que éste contiene una isla CpG susceptible de ser metilada, bloqueando la expresión del mismo¹⁴⁶. La incidencia de metilación del gen p16 observada en LAM, al igual que en LMC es escasa²¹⁸⁻²²⁰. Sí es, en cambio, frecuente la detección de metilación del gen p16 en síndromes linfoproliferativos B (tanto de bajo como de alto grado de malignidad) y T (afectando sólo a los de alto grado de malignidad)^{218, 221}.

El gen p15, localizado al igual que el gen p16 en 9p21, codifica la proteína p15 que se comporta como un CDKI tipo INK4. La cercana localización del gen p15 al gen p16 (a unas 30 kb de distancia) hace que deleciones que afecten a 9p puedan afectar tanto a p15 como a p16. Los mecanismos de inactivación del gen p15 son los mismos que para el gen p16, incluyendo la metilación de una isla CpG que también presenta este gen en su región promotora. La frecuencia de deleciones del gen p15 es muy baja en neoplasias mieloides con excepción, al igual que p16, de la crisis blástica de LMC. Dentro de las neoplasias linfoides, la entidad que generalmente tiene una mayor

frecuencia de deleciones de p15 es la LAL (23-57%)^{204, 213, 222}. Ahora bien, sí existen diferencias en la frecuencia de metilación del gen p15 con respecto a p16. De esta manera, llama la atención la elevada incidencia observada en LAM (79%) y SMD (57%)^{84, 218, 223}. También en LAL la frecuencia de metilación del gen p15 es alta, relacionándose en general con factores de mal pronóstico²⁰⁴.

En cuanto a los otros dos miembros de genes de la familia INK4, p18 y p19, no parecen haberse encontrado mutaciones o deleciones de estos genes en tumores humanos.

Con relación al papel de la familia de inhibidores KIP en los procesos neoplásicos, el gen p21 localizado en 6p21 ha sido estudiado en una amplia variedad de tumores humanos, donde se ha encontrado traslocado, mutado o delecionado, aunque con una frecuencia muy baja (<5%)^{224, 225}, no se han encontrado, por el contrario, hipermetilado. En neoplasias hematológicas, los estudios de este gen se han realizado principalmente en linfomas no Hodgkin (LNH) observando que mutaciones de p53 bloquean la expresión de p21. Este mecanismo de alteración en la ruta p53-p21 no es un fenómeno muy frecuente en neoplasias linfoides (5-20%). Sin embargo, esta frecuencia se incrementa en LNH de alto grado²²⁶.

La proteína p27, codificada por el gen p27 localizado en 12p13, es otro CDKI cuya implicación en el desarrollo de neoplasias no es del todo conocida. En leucemias humanas, existe una relativamente alta incidencia de deleciones heterocigotas en la región cromosómica 12p12-13 que involucran a p27. Sin embargo, el alelo restante no presenta mutaciones en las regiones codificantes por lo que su papel en el desarrollo de estas neoplasias no está claro²²⁷. Por otro lado, se han realizado estudios de expresión de la proteína p27 apoyándose en la hipótesis de que este tipo de CDKIs pudiesen ser anómalos, no por alteraciones en los genes codificantes, sino por mecanismos post-transcripcionales que afectasen a la función de las proteínas²²⁸.

Finalmente, p57 es el CDKI descubierto en último lugar y codificado por el gen p57 localizado, como ya hemos expuesto, en 11p15.5, adyacente al gen CALC1, una región frecuentemente delecionada o reordenada en una gran variedad de tumores humanos incluyendo casos de LAM, LAL y LNH. No obstante, no se han encontrado mutaciones en dicho gen hasta el momento.

Nuestros resultados describen por vez primera una posible implicación del gen p57KIP2 en la génesis y pronóstico de las LAL y también sugieren que los mecanismos defectuosos en supervivencia celular pueden ser factores importantes que permiten una proliferación incontrolada de las células leucémicas.

En definitiva, la hipermetilación del gen CALC1 se asocia con un aumento en el riesgo de recaída independientemente de otros factores pronósticos conocidos.

VII. CONCLUSIONES

- I.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 ES UN HALLAZGO FRECUENTE AL DIAGNOSTICO DE LOS PACIENTES AFECTOS DE LAL, OBSERVANDOSE EN NUESTRA SERIE EN UN 45% DE LOS MISMOS.
- II.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 SE OBSERVA EN LAL TANTO DE CELULAS B COMO DE CELULAS T, EN TODOS LOS SUBTIPOS DE LA CLASIFICACION FAB Y TANTO EN LAL INFANTILES COMO LAL DEL ADULTO.
- III.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 EN LA LAL DEL ADULTO SE OBSERVA MAS FRECUENTEMENTE EN LEUCEMIAS DE CELULAS DE ORIGEN T.
- IV.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 EN LA LAL INFANTIL SE OBSERVA MAS FRECUENTEMENTE EN PACIENTES CON FORMAS HIPERLEUCOCITOSICAS AL DIAGNOSTICO Y EN PACIENTES CON ANTIGENOS MIELOIDES POSITIVOS Y CD34 POSITIVA EN EL INMNOFENOTIPO DE LAS CELULAS LEUCEMICAS.
- V.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 ES UN FACTOR INDEPENDIENTE DE POBRE PRONOSTICO EN LAL INFANTILES COMO LAL DEL ADULTO, OBSERVANDOSE EN LOS PACIENTES CON GEN CALC1 HIPERMETILADO UNA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD SIGNIFICATIVAMENTE PEOR QUE LOS PACIENTES CON DICHO GEN NO METILADO.
- VI.** LA HIPERMETILACION DE LA REGION 5´ DEL GEN CALC1 SE CORRELACIONA CON UNA AUSENCIA EN LA EXPRESION DEL ONCOGEN SUPRESOR p57KIP2.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedar J, Razin A. **The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA.** FEBS Lett 1982; 146: 148.
- 2.- Proffitt Jh, Davie JR, Swinton D, Hattman S. **5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA.** Mol Cell Biol 1984; 4: 985.
- 3.- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. **Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.** Cell 1992; 69: 915.
- 4.- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. **Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.** Trends Genet 1997; 13: 335.
- 5.- Bird AP. **CpG-rich islands and the function of the DNA methylation.** Nature 1986; 321: 209.
- 6.- Antequera F, Bird A. **Number of CpG islands and genes in human and mouse.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11995
- 7.- Antequera F, Bird A. **CpG islands.** EXS 1993; 64: 169.
- 8.- Bird AP. **Gene number, noise reduction and biological complexity.** Trends Genet 1995; 11: 94.
- 9.- Tazi J, Bird A. **Alternative chromatin structure at CpG islands.** Cell 1990; 60: 909.
- 10.- Cross SH, Bird AP. **CpG islands and genes.** Curr Opin Genet Dev 1995; 5: 309.
- 11.- Baylin SB. **Tying it all together: Epigenetics, genetics, cell cycle and cancer.** Science 1997; 277: 1948.
- 12.- Bird A. **The essentials of DNA methylation.** Cell 1992; 70: 5.
- 13.- Cedar H. **DNA methylation and gene activity.** Cell 1988; 53: 3.
- 14.- Bestor TH, Verdine GL. **DNA methyltransferases.** Curr Opin Cell Biol 1994; 6: 380.
- 15.- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. **Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.** J Mol Biol 1988; 203: 971.
- 16.- Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, Baylin SB. **Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase.** Nucleic Acids Res 1992; 20: 2287.

- 17.- Adams RLP. **DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions.** Biochem J 1990; 265: 309-320.
- 18.- Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G. **Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression.** J. Biol. Chem. 1991; 266: 10027-10030.
- 19.- Szyf M, Kaplan F, Mann V, Giloh H, Kedar E, Razin A. **Cell cycle-dependent regulation of eukaryotic DNA methylase level.** J. Biol. Chem. 1985; 260: 8653-8656.
- 20.- Papadopoulos T, Pfeifer GP, Hoppe F, Drahovsky D, Muller-Hermelink H-K. **Proliferation-associated expression of DNA methyl-transferase in human embryonic lung cells.** Virchows Arch. B. Cell Pathol 1989; 56: 371-375.
- 21.- El-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen R-W C, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB. **High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer.** Proc. Natl. Acad. Sci 1991; 88: 3470-3474.
- 22.- Riggs AD. **DNA methylatin and late replication probably aid cell memory, and type 1 DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 1990; 326: 285-297.
- 23.- Lyon MF. **The quest for the X-inactivation centre.** Trends Genet. 1991; 7: 69-70.
- 24.- Selig S, Ariel M, Goitein R, Marcus M, Cedar H. **Regulation of mouse satellite DNA replication time.** EMBO J 1988; 7: 419-426.
- 25.- Bird AP, Southern EM. **Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from Xenopus laevis.** J Mol Biol 1978; 118: 27.
- 26.- Waalwijk C, Flavell RA. **MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites.** Nucleic Acids Res 1978; 5: 3231.
- 27.- McGhee JD, Ginder GD. **Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes.** Nature 1979; 280: 419.
- 28.- Singer-Sam J, Grant M, LeBOn JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, Riggs AD. **Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG islands of mouse embryos at the time of X-chromosome in activation.** Mol Cell Biol 1990; 10: 4987.

- 29.- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. **A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.** Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 1827.
- 30.- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. **Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9821.
- 31.- Gonzalgo ML, Jones PA. **Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SnuPE).** Nucleic Acids Res 1997; 25: 2529.
- 32.- Xiong Z, Laird PW. **A sensitive and quantitative DNA methylation assay.** Nucleic Acids Res 1997; 25: 2532.
- 33.- Riggs AD. **X inactivation, differentiation and DNA methylation.** Cytogenet Cell Genet 1975; 14: 9.
- 34.- Holliday R, Pugh JE. **DNA modification mechanisms end gene activity during development.** Science 1975; 187: 226.
- 35.- Ginder GD, McGhee JD. **DNA methylation in the Chicken adults β -Globin gene: a relationship with gene expression: Organization and expression of globin genes.** New York, NY, Liss, 1981, p 191.
- 36.- Shen CK, Maniatis T. **Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit beta-like globin genes.** Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 6634.
- 37.- Van der Ploeg LH, Flavell RA. **DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues.** Cell 1980; 19: 947.
- 38.- Razin A, Riggs AD. **DNA methylation and gene function.** Science 1980; 210: 604.
- 39.- Razin A, Cedar H. **DNA methylation and gene expression.** Microbiol Rev 1991; 55: 451.
- 40.- Tate Ph, Bird AP. **Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression.** Curr Opin Genet Dev 1993; 3: 226.
- 41.- Rountree MR, Selker EU. **DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in Neurospora crassa.** Genes Dev 1997; 11: 2383.

- 42.- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. **Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs.** Cell 1989; 58: 499.
- 43.- Boyes J, Bird A. **DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein.** Cell 1991; 64: 1123.
- 44.- Boyes J, Bird A. **Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promotor strength : Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein.** EMBO J 1992; 11: 327.
- 45.- Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan X, Jeppesen P, Bird A. **Transcriptional repression by methylation of CpG.** J Cell Sci Suppl 1992; 16: 9.
- 46.- Tate P, Skarnes W, Bird A. **The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse.** Nat Genet 1996; 12: 205.
- 47.- Nan X, Campoy FJ, Bird A. **MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin.** Cell 1997; 88: 471.
- 48.- Nan XS, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. **Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.** Nature 1998; 393: 386.
- 49.- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** Nat Genet 1998; 19: 187.
- 50.- Ginder GD, Whitters MJ, Pohlman JK. **Activation of a chicken embryonic globin gene in adult erythroid cells by 5-azacytidine and sodium butyrate.** Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3954.
- 51.- Burns LJ, Glauber JG, Ginder GD. **Butyrates induces selective transcriptional activation of a hypomethylated embryonic globin gene in adult erythroid cells.** Blood 1988; 72: 1536.
- 52.- Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. **How does DNA methylation repress transcription?.** Trends Genet 1997; 13: 444.
- 53.- Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H. **DNA methylation affects the formation of active chromatin.** Cell 1986; 44: 535.

- 54.- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. **DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation.** *Curr Biol* 1997; 7: 157.
- 55.- Siegfried Z, Cedar H. **DNA methylation: A molecular lock.** *Curr Biol* 1997; 7: R305.
- 56.- Enver T, Zhang JW, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. **DNA methylation: a secondary event in globin gene switching?** *Genes Dev* 1988; 2: 698.
- 57.- Sullivan CH, Norman JT, Borrás T, Grainger RM. **Developmental regulation of hypomethylation of delta-crystallin genes in chicken embryo lens cells.** *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3132.
- 58.- Singal R, Ferris R, Little JA, Wang SZ, Ginder GD. **Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13724.
- 59.- Kautiainen TL, Jones PA. **DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture.** *J Biol Chem* 1986; 261: 1594.
- 60.- Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, Baylin SB. **Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression.** *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1235.
- 61.- Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, LiE, Weinberg RA, Jaenisch R. **Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation.** *Cell* 1995; 81: 197.
- 62.- Baylin SB, Herman JG, Gtraff JR, Vertino PM, Issa JP. **Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.** *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141.
- 63.- Laird PW, Jaenisch R. **The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics.** *Annu Rev Genet* 1996; 30: 441.
- 64.- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. **Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli.** *Nature* 1978; 274: 775-
- 65.- Gonzalgo ML, Liang G, Spruck CHr, Zingg JM, Rideout WMr, Jones PA. **Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR.** *Cancer Res* 1997; 57: 594.
- 66.- Bender CM, Zingg JM, Jones PA. **DNA methylation as a target for drug design.** *Pharmaceutical Res* 1998; 15: 175.

- 67.- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. **Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.** *Cancer Res* 1994; 54: 4855.
- 68.- Magewu AN, Jones PA. **Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer.** *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4225.
- 69.- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. **The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.** *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 6883.
- 70.- Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. **Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency.** *Carcinogenesis* 1993; 14: 551.
- 71.- Pogribny IP, Miller BJ, James SJ. **Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat.** *Cancer Lett* 1997; 115: 31.
- 72.- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. **Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 1993; 82: 1820.
- 73.- Feinberg AP, Vogelstein B. **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** *Nature* 1983; 301: 89.
- 74.- Greger V, Debus N, Lohman D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. **Frequency and parental origin of hypermethylated RBI alleles in retinoblastoma.** *Hum Genet* 1994; 94: 491.
- 75.- Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. **Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene.** *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880.
- 76.- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. **CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene.** *Oncogene* 1993; 8: 1063.
- 77.- Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, Lobensky I, Duan DR, Florence C, Pozzatti R, Walther MM, Bander NH, Grossman HB, Brauch H, Pomer S, Brooks JD, Isaacs WB, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. **Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma.** *Nat Genet* 1994; 7: 85.

- 78.- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, Baylin SB. **Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma.** Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9700.
- 79.- Liggett WH Jr, Sidransky D. **Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.** J Clin Oncol 1998; 16: 1197.
- 80.- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. **5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDK2/MTS1 in human cancers.** Nat Med 1995; 1: 686.
- 81.- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. **Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant methylation in all common human cancers.** Cancer Res 1995; 55: 4525.
- 82.- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A; Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D. **Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours.** Nat Genet 1995; 11: 210.
- 83.- Hannjon GJ, Beach D. **P15INK4b is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.** Nature 1994; 371: 257.
- 84.- Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T. **Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes.** Blood 1997; 90: 1403-1409.
- 85.- Ng MH, Chung YF, Lo KW, Wickham NW, Lee JC, Huang DP. **Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma.** Blood 1997; 89: 2500.
- 86.- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. **DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 2545.
- 87.- Jones PA, Gonzalzo ML. **Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer?.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 2103.
- 88.- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. **DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.** Nature 1998; 395: 89.
- 89.- Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehlirch M. **Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia.** Cancer Res 1988; 48: 1159.

- 90.- MacLeod AR, Roulleau J, Szyf M. **Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway.** J Biol Chem 1995; 270: 11327.
- 91.- Yoder JA, Yen RWC, Vertino PM, Bestor TH, Baylin SB. New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5)-methyltransferase. J Biol Chem 1996; 271: 31092.
- 92.- Tucker KL, Talbot D, Lee MA, Leonhardt H, Jaenisch R. **Complementation of methylation deficiency in embryonic stem cells by a DNA methyltransferase minigene.** Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12920.
- 93.- Bakin AV, Curran T. **Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos.** Science 1999; 283: 387.
- 94.- Busslinger M, Hurst J, Flavell RA. **DNA methylation and the regulation of globin gene expression.** Cell 1983; 34: 197.
- 95.- DeSimone J, Heller P, Hall L, Zwiers D. **5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons.** Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 4428.
- 96.- Ley TJ, DeSimone J, Anagnou NP, Keller GH, Humphries RK, Turner PH, Young NS, Keller P, Nienhuis AW. **5-azacytidine selectively increases gamma-globin synthesis in a patient with beta+ thalassemia.** N Engl J Med 1982; 307: 1469.
- 97.- Charache S, Dover G, Smith K, Talbot CC Jr, Moyer M, Boyer S. **Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal hemoglobin production and is associated with nonrandom hypomethylation of DNA around the gamma-delta-beta-globin gene complex.** Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 4842.
- 98.- Letvin NL, Linch DC, Beardsley GP, McIntyre KW, Nathan DG. **Augmentation of fetal-hemoglobin production in anemic monkeys by hydroxyurea.** N Engl J Med 1984; 310: 869.
- 99.- Papayannopoulou T, Torrealba de Ron A, Veith R, Knitter G, Stamatoyannopoulos G. **Arabinosylcytosine induces fetal hemoglobin in baboons by perturbing erythroid cell differentiation kinetics.** Science 1984; 224: 617.
- 100.- Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. **Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia.** J Clin Invest 1984; 74: 652.
- 101.- Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Rachmilewitz EA, Avraham A, Palumbo GA, Frassoni F, Sahar D, Rosenbaum H, Paltiel O, Zion M, Ben-Neriah Y. **Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia.** Blood 1997; 90: 4918.

- 102.- Silverman LR, Holland JF, Weinberg RS, Alter BP, Davis RB, Ellison RR, Demakos EP, Cornell CJ Jr, Carey RW, Schiffer C. **Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes.** *Leukemia* 1993 (suppl 1); 7: 21.
- 103.- Willemze R, Archimbaud E, Muus P. **Preliminary results with 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)-containing chemotherapy in patients with relapsed or refractory acute leukemia. The EORTC Leukemia Cooperative Group.** *Leukemia* 1993 (suppl 1); 7: 49.
- 104.- Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M. **Inhibitions of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 684.
- 105.- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. **Cancer statistics, 1997.** *CA cancer J Clin* 1997; 47: 68.
- 106.- Cortes JE, Kantarjian HM. **Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy.** *Cancer* 1995; 76: 2396-417.
- 107.- Laport GF, Larson RA. **Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia.** *Semin Oncol* 1997; 24: 70-82.
- 108.- Pui C-H. **Acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatr Clin North Am* 1997; 44: 831-46.
- 109.- Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. **Cytogenetics abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome: a collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique.** *Blood* 1996; 88:2818.
- 110.- Chessells JM, Hall E, Prentice HG, Durrant J, Bailey CC, Richards SM. **The impact of age on outcome in lymphoblastic leukemia: MRC UKALLX and XA compared: a report from the MRC Paediatrics and Adult Working Parties.** *Leukemia* 1998; 12: 463-73.
- 111.- Copelan EA, McGuire EA. **The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adult.** *Blood* 1995; 85: 1151-68.
- 112.- Pui C-H, Behm FG, Crist WM. **Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 1993; 82: 343-62.
- 113.- Pui C-H. **Childhood leukemias.** *N Eng J Med* 1995; 332: 1618-30.

- 114.- Kishimoto T, Goyert S, Kikutani H, et al. **CD antigens 1996**. Blood 1997; 89: 3502.
- 115.- Pui C-H, Raimondi SC, Head DR, et al. **Characteristics of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse**. Blood 1991; 78: 1327-37.
- 116.- Larson RA, Dodge RK, Burns CP, et al. **A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 8811**. Blood 1995; 85: 2025-37.
- 117.- Uckun FM, Sather HN, Gaynon PS, et al. **Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group**. Blood 1997; 90: 28-35.
- 118.- Campana D, Pui C-H. **Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance**. Blood 1995; 85: 1416-34.
- 119.- Look AT. **Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias**. Science 1997; 278: 1059-64.
- 120 Pui C-H, Crist WM. **Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia**. J Pediatr 1994; 124: 491-503.
- 121.- Schorin MA, Blattner S, Gelber RD, et al. **Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01**. J Clin Oncol 1994; 12: 740-7.
- 122.- Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D, et al. **Chemotherapy in 998 unselect childhood acute lymphoblastic leukemia patients: results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86**. Blood 1994; 84: 3122-33.
- 123.- Soussain C, Patte C, Ostronoff M, et al. **Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults: a retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols**. Blood 1995; 85: 664-74
- 124.- Hoelzer D, Ludwig W-D, Thiel E, et al. **Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia**. Blood 1996; 87: 495-508.
- 125.- Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D, et al. **Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group**. Blood 1992; 80: 2471-8.

- 126.- Patte C. **Non-Hodgkin's lymphoma**. Eur J Cancer 1998; 34: 359-63.
- 127.- Nachman J, Sather HN, Buckley JD, et al. **Young adults 16-21 years of age at diagnosis entered on Childrens Cancer Group acute lymphoblastic leukemia and acute myeloblastic leukemia protocols: results of treatment**. Cancer 1993; 71 (Suppl): 3377-85.
- 128.- Pui C-H, Boyett JM, Hancock ML, et al. **Outcome of treatment for childhood cancer in black as compared with white children: the St. Jude Children's Research Hospital experience, 1962 through 1992**. JAMA 1995; 273: 633-7.
- 129.- 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.
- 130.- Pui C-H, Kane JR, Crist WM, et al. **Biology and treatment of infant leukemias**. Leukemia 1995; 9: 762-9.
- 131.- Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, et al. **Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study**. Blood 1994; 84: 570-3.
- 132.- Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, et al. **Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age**. Blood 1996; 87: 2870-2877.
- 133.- Rubnitz JE, Downing JR, Pui C-H, et al. **TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance**. J Clin Oncol 1997; 15: 1150-7.
- 134.- Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. **Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials**. Blood 1997; 90: 571-7.
- 135.- Gajjar A, Ribeiro R, Hancock ML, et al. **Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia**. Blood 1995; 86: 1292-5.
- 136.- Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, et al. **Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review**. Cancer 1997; 80: 1717-26.

- 137.- Coustan-Smith E, Behm FG, Sánchez J, et al. **Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia.** Lancet 1998; 351: 550-4.
- 138.- Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, et al. **Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia.** N Engl J Med 1998; 339: 591-8.
- 139.- Hunger SP, Fall FZ, Camitta BM, et al. **E2A-PBX1 chimeric transcript status at end of consolidation is not predictive of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemias with a t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study.** Blood 1998; 91: 1021-8.
- 140.- Ribeiro RC, Broniscer A, Rivera GK, et al. **Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in children: durable responses to chemotherapy associated with low initial white blood cell counts.** Leukemia 1997; 11: 1493-6.
- 141.- Schrappe M, Aricò M, Harbott J, et al. **Ph+ childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome.** Blood (in press).
- 142.- Pui C-H, Carroll AJ, Raimondi SC, et al. **Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line.** Blood 1990; 75: 1170-7.
- 143.- Pui C-H, Frankel LS, Carroll AJ, et al. **Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases.** Blood 1991; 77: 440-7.
- 144.- Conter V, Schrappe M, Aricó M, et al. **Role of cranial radiotherapy for childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with high WBC count and good response to prednisone.** J Clin Oncol 1997; 15: 2786-91.
- 145.- Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, et al. **Low leukocyte counts with blasts cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia.** N Engl J Med 1993; 329: 314-9.
- 146.- Singal R, Ginder GD. **DNA methylation.** Blood 1999; 93: 4059-4070.
- 147.- Issa J-PJ, Baylin SB, Herman JG. **DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implication.** Leukemia 1997; 11 (Suppl 1): S7-S11.

- 148.- Baylin SB, Makos M, Wu JJ et al. **Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potencial consequences for tumor progression.** Cancer Cell 1991; 3: 383-390.
- 149.- Matsukoa S, Edwards MC, Bai C et al. **P57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 CDK inhibitor family is a candidate tumor suppressor gene.** Genes Dev 1995; 9: 650-662.
- 150.- Przepiorka D, Baylin SB, McBride OW, Testa JR, de Ba, Nellein BD. **The human calcitonin gene is located on the short arm of chromosome 11.** Biochem Biophys Res Commun 1984; 120: 493-499.
- 151.- Baylin SB, Fearon ER, Vogelstein B et al. **Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies.** Blood 1984; 70: 412-417.
- 152.- Ihalainen J, Iuvonen E, Savolainen ER, Ruutu T, Palotie A. **Calcitonin gene methylation in chronic myeloproliferative disorders.** Leukemia 1994; 8: 230-235.
- 153.- Dhodapkar M, Grill J, Lust JA. **Abnormal regional hypermethylation of the calcitonin gene in myelodysplastic syndromes.** Leuk Res 1995; 19: 719-726.
- 154.- Nelkin BD, Przepiorka D, Burke PJ, Thomas ED, Baylin SB. **Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia.** Blood 1991; 77: 2431-2434.
- 155.- Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson SE. **Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation.** Blood 1991; 77: 2435-2440.
- 156.- Leegwater PAJ, Lambooy LHJ,, De Abren RA, Bökkerink JPM, van den Heuvel LP. **DNA methylation patterns in the calcitonin gene region at first diagnosis and at relapse of acute lymphoblastic leukemia.** Leukemia 1997; 11: 971-978.
- 157.- Hartwell LH, Weinert TA. **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** Science 1989; 246: 629-34.
- 158.- Pardee AB. **G1 events and regulation of cell proliferation.** Science 1989; 246: 603-8.
- 159.- Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mitnacht S, Weinberg RA. **The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling.** Trends Biochem Sci 1992; 17: 312-5.
- 160.- Hinds PW, WeinbergRa. **Tumor suppressor genes.** Curr Opin Genet Dev 1994; 4: 135-41.

- 161.- Pines J. **Protein kinases and cell cycle control.** *Semin Cell Biol* 1994; 5: 399-408.
- 162.- Koff A, Croos F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. **Human cyclin E a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family.** *Cell* 1991; 66: 1217-28.
- 163.- Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. **Genomic organization, chromosomal localization and independent expression of human cyclin D genes.** *Genomics* 1992; 13: 565-74.
- 164.- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. **Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts.** *Genes Dev* 1993; 7: 1559-71.
- 165.- Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. **Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system.** *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1669-79.
- 166.- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. **Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.** *Genes Dev* 1993; 7: 812-21.
- 167.- Zhu X, Ohtsubo M, Bohmer RM, Roberts JM, Assoian RK. **Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E2-CDK2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein.** *J Cell Biol* 1996; 133: 391-403.
- 168.- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. **Formation and activation of a cyclin E-CDK2 complex during the G1 phase of the human cell cycle.** *Science* 1992; 257: 1689-94.
- 169.- Okamoto K, Beach D. **Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein.** *EMBO J* 1994; 13: 4816-22.
- 170.- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. **Cyclin A is required at two points in the human cell cycle.** *EMBO J* 1992; 11: 961-71.
- 171.- Minshull J, Golsteyn R, Hill CS, Hunt T. **The A- and B-type cyclin associated CDC2 kinases in Xenopus turn on and off and different times in the cell cycle.** *EMBO J* 1990; 9: 2865-75.
- 172.- Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato J-Y. **D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells.** *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2066-76.

- 173.- Weinberg RA. **Tumor suppressor genes.** Science 1991; 254: 1138-46.
- 174.- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. **Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** Cell 1993; 75: 817-25.
- 175.- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. **Cloning of p27KIP1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.** Cell 1994; 78: 59-66.
- 176.- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. **P27KIP1, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.** Genes Dev 1994; 8: 9-22.
- 177.- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parkers S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. **P57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 CDK inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene.** Genes Dev 1995; 9: 650-62.
- 178.- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowdski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. **Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.** Mol Biol Cell 1995; 6: 387-400.
- 179.- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. **Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.** Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5545-9.
- 180.- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. **A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.** Nature 1993; 366: 704-7.
- 181.- Hannon GJ, Beach D. **P15INK4b is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.** Nature 1994; 371: 257-61.
- 182.- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. **Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6.** Mol Cell Biol 1995; 15: 2672-81.
- 183.- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ. **Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines.** Cancer Res 1995; 55: 505-9.

- 184.- Guan KL, Jenkins CW, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera Ag, Xiong J. **Growth suppression by p18, a p16INK4/Mts1 and p14INK4b/Mts2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type prb function.** Genes Dev 1994; 8: 2939-52.
- 185.- Ortega JJ, Javier G, Olive T. **Treatment of standard and high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia with two CNS prophylaxis regimens.** In: Büchner T, Schellong G, Hiddemann W, Urbanitz D, Ritter J, eds. **Acute Leukemias. Prognostic factors and treatment strategies.** Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1987; 483-492.
- 186.- 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: 222-30.
- 187.- Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A et al. **Intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem cell transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukemia. Preliminary results of the ongoing protocol PETHEMA ALL-93.** In: Hiddeman W, Büchner T, Wörmann B, Ritter J, Creutzig U, Keating M, Plunkett W, eds. **Acute Leukemias VII. Experimental approaches and novel therapies.** Berlin, Springer-Verlag 1998; 755-765.
- 188.- Ortega JJ. **Leucemias agudas en el niño: treinta años después (1968-1997).** Haematologica 1998; 83 (Suppl 1): 125-152.
- 189.- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nuclei Acids Res 1988; 16: 1215.
- 190.- Román J, Andrés P, Alvarez MA, Torres A. **Salting out procedure for isolation of DNA from stored bone marrow slides for PCR.** Eur J Haematol 1993; 50: 237.
- 191.- Chomczynski P, Sacchi N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thicianate-phenol-chloroform extraction.** Anal Biochem 1987; 162: 156.
- 192.- Ritter M, De Kant E, Huhn D, Neubauer A. **Detection of DNA methylation in the calcitonin gene in human leukemias using differential polymerase chain reaction.** Leukemia 1995; 9: 915-921.
- 193.- Iolascon A, Ragione FD, Giordani L, Serra A, Saglio G, Faienza MF. **Expression of cell cycle regulatory genes in chronic myelogenous leukemia.** Haematologica 1998; 83: 771-777.

- 194.- Borrow J, Goddard AD, Gibbons B et al. **Diagnosis of acute promyelocytic leukemia by RT-PCR: detection of PML-RARA and RARA-PML fusion transcripts.** Br J Haematol 1992; 82: 529-540.
- 195.- Cimino G, Rapanotti MC, Rivolta A et al. **Prognostic relevance of ALL-1 gene rearrangement in infant acute leukemias.** Leukemia 1995; 9: 391-195.
- 196.- Saglio G, Pane F, Gottardi E et al. **Consistent amounts of acute leukemia-associated p190BCR-ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis.** Blood 1996; 87: 1075-1080.
- 197.- Pui C-H, Evans WE. **Acute lymphoblastic leukemia.** N Engl J Med 1998; 339: 605-615.
- 198.- Pui C-H, Crist Wm. Look AT. **Biology and clonical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Blood 1990; 76: 1449-1463.
- 199.- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. **Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia.** Blood 1998; 91: 3995-4019.
- 200.- Uckun FM, Sensel MG, Sun L et al. **Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia.** Blood 1998; 91: 735-746.
- 201.- Foa P, Ortolani S, Pogliani EM et al. **Immunoreactive calcitonin: a tumor marker of myelogenous leukemias.** Int J Biol Markers 1990; 5: 27-30.
- 202.- De Butros A, Nelkin BD, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin SB. **The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia.** Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 5693-5697.
- 203.- Sherr CJ. **Cancer cell cycles.** Science 1996; 274: 1672-1677.
- 204.- Drexler HG. **Review of the alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells.** Leukemia 1998; 12: 854-859.
- 205.- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli ND. **Germline p16 mutations in familial melanoma.** Nat Genet 1994; 8: 15-21.
- 206.- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. **Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors.** Cancer Res 1994; 54: 6353-8.

- 207.- Serrano M. **The tumor suppressor protein p16INK4a.** *Experim Cell Res* 1997; 237: 7-13.
- 208.- Sidransky D. **Two tracks but one race?** *Cancer Genet Curr Biol* 1996; 6: 523-526.
- 209.- Sill H, Goldman JM, Cross NCP. **Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia.** *Blood* 1995; 85: 2013-2016.
- 210.- Dreyling MH, Bohlander SK, Le Beau MM, Olopade OI. **Refined mapping of genomic rearrangements involving the short arm of chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemias and other hematologic malignances.** *Blood* 1995; 86: 1931-1938.
- 211.- Ogawa S, Hirano N, Sato N, Takahashi T, Hangaishi A, Tanaka K et al. **Homozygous loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16) gene in human leukemias.** *Blood* 1994; 84: 2431-2435.
- 212.- Quesnel B, Preudhomme C, Fenaux P. **P16 INK4a gene and hematological malignances.** *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 11-24.
- 213.- Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. **Candidate tumor-suppressos genes MTS1 (p16INK4a) and MTS2 (p15INK4b) display frequent homozygous deletions in primary cells from T-but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias.** *Blood* 1994; 84: 4038-4044.
- 214.- Cayuela JM, Hebert J, Sigaux F. **Homozygous MTS1 (p16INK4a) deletion in primary tumor cells of 63 leukemic patients.** *Blood* 1995; 85: 854-861.
- 215.- Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Miura Y, Takeyama K et al. **Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies.** *Blood* 1995; 86: 1548-1556.
- 216.- Stransk G, Height SE, Mitchell P, Jadayel D, Yuille MAR, De Lord C et al. **Deletions and rearrangementsof CDKN2 in lymphoid malignancy.** *Blood* 1995; 85: 893-901.
- 217.- Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tobler A, Janssen JWG et al. **Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4b, p16/MTS1/INK4a, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood.** *Blood* 1995; 86: 755-760.

- 218.- Herman JG, Civin CI, Issa JPJ, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. **Distinct patterns of inactivation of p15INK4b and p16INK4a characterize major types of hematological malignancies.** Cancer Res 1997; 57: 834-841.
- 219.- Iravani M, Dhat R, Price CM. **Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2, CDKN1, p15(INK4b) in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Oncogene 1997; 15: 2609-2614.
- 220.- Batova A, Diccianni MB, Nobori T, Vu T, Yu J, Bridgeman L et al. **Frequent deletion in the methyladenosine phosphorylase gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: strategies for enzyme-targeted therapy.** Blood 1996; 88: 3083-3090.
- 221.- Martínez-Delgado B, Fernández-Piqueras J, García MJ, Gallego J, Rivas C, Robledo M, Benítez J. **Hypermethylation of a 5' CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma.** Leukemia 1997; 11: 425-428.
- 222.- Otsuki T, Clark HM, Wellmann A, Jaffè ES, Raffeld M. **Involvement of CDKN2 (p16INK4a/MTS1) and p15INK4b/MTS2 in human leukemias and lymphomas.** Cancer Res 1995; 55: 1436-1440.
- 223.- Quesnel B, Guillermo G, Verecque R, Vincent H, Preudhomme C, Bauters F et al. **Methylation of the p15INK4b gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression.** Blood 1998; 91: 2985-2990.
- 224.- Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R et al. **Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies.** Blood 1994; 84: 3781-3784.
- 225.- Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT et al. **Somatic mutations of the Waf1/CIP1 gene in primary prostate cancer.** Oncogene 1995; 11: 1395-1398.
- 226.- Sánchez E, Chacón I, Plaza MM, Muñoz E, Cruz MA, Martínez B et al. **The outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent of the relationship between different cell cycle regulators proteins.** J Clin Oncol 1998; 16: 1-10.
- 227.- Pietenpol JA, Boglander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C et al. **Assignment of the human p27KIP1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias.** Cancer Res 1995; 55: 1206-1210.

- 228.- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V et al. **Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27.** Science 1995; 269: 682-685.