



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

T E S I S

ESTUDIO DE METILACIÓN DE PROMOTORES Y EXPRESIÓN DE DETERMINADOS GENES RELACIONADOS CON LA ETIOLOGÍA Y PROGRESIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE EN PACIENTES DE RECIENTE DIAGNÓSTICO Y EN RECAÍDA.

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA :

DÉBORAH MARÍA MARTÍNEZ BAÑOS

TUTOR:

**DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

ASESOR TÉCNICO:

**M. EN C. BEATRÍZ E. SÁNCHEZ HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue desarrollada con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondo Sectorial de Salud SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-2007).

Proyecto:

Estudio de metilación de promotores y expresión de determinados genes relacionados con la etiología y progresión del mieloma múltiple en pacientes de reciente diagnóstico y en recaída.

Clave:

69695

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
I. ANTECEDENTES	9
Mieloma Múltiple	
I.1 Epidemiología	
I.2 Fisiopatología	
I.3 Criterios diagnósticos	
I.4 Modelo de patogénesis molecular y citogenética	
I.5 Epigenética y cáncer	
I.6 Alteraciones epigenéticas	
II. HIPÓTESIS	31
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. OBJETIVOS	33
IV.1 Objetivo general	
IV.2 Objetivos específicos	
V. MATERIAL Y MÉTODOS	34
V.1 Diseño	
V.1.1 Descripción	
V.2 Población	
V.3 Criterios de selección	
V.4 Análisis estadístico	
V.5 Elaboración de la base de datos	
V.6 Métodos de laboratorio	
V.6.1. Separación de células mononucleares a partir de aspirado de médula ósea	
V.6.2 Aislamiento de ADN	

V.6.3 Aislamiento de ARN total	
V.6.4 Síntesis de ADNc	
V.6.5 Análisis de expresión de <i>P16, E-CADERINA, SOCS-1, P73 y SHP1</i>	
V.6.6 Conversión de ADN metilado	
V.6.7 Análisis de metilación de <i>P16, E-CADERINA, SOCS-1, P73 y SHP1</i>	
V.6.8 Metilación global	

VI.RESULTADOS	59
VI.1 Características demográficas y clínicas	
VI.2 Metilación de promotores y ensayos de expresión	
VI.3 Metilación global	
VI.4 Supervivencia global y supervivencia libre de progresión	
VII.DISCUSIÓN	79
VIII.CONCLUSIONES	86
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMEN.

Introducción. El mieloma múltiple es una enfermedad clonal de células plasmáticas que corresponde al 13% de los cánceres hematológicos y al 1% de todas las neoplasias. Estudios recientes que han abordado la patogénesis molecular y la biología del mieloma múltiple han demostrado un escenario epigenómico complejo que contribuye al inicio, pronóstico y variabilidad individual.

Hipótesis. La metilación de los promotores de los genes *P16*, *SOCS-1*, *E-CADERINA*, *P73* y *SHP-1* se encuentra incrementada en mieloma múltiple en períodos de actividad y disminuye en períodos de remisión.

La metilación global del ADN se encuentra disminuída en períodos de actividad del mieloma múltiple.

Metodología. Se determinó la metilación de los promotores de los genes y la metilación global durante actividad de la enfermedad y remisión. Para determinar el estado de metilación de los promotores de los genes se utilizó PCR específica para metilación de punto final. El porcentaje de metilación global se determinó mediante el uso de un kit comercial de ELISA. Se correlacionó los resultados con las variables clínicas de los pacientes.

Resultados. El comportamiento de la proporción de pacientes con el promotor metilado para cada gen en los dos puntos de medición fue diferente para *SOCS-1*. Este gen se encontró metilado en 9 pacientes (29%) durante la enfermedad

activa y no metilado en remisión y en 1 paciente (3.2%) se encontró metilado en remisión pero no en enfermedad activa ($p = 0.021$). El estado de metilación de los promotores de los genes no correlacionó con su expresión ($p > 0.05$). El promedio del porcentaje de metilación global durante enfermedad activa y en remisión fue de 14.26 y 13.83%, respectivamente, con desviaciones estándar de 21.48 (95% CI, 2.814-25.713) y 10.72 (95% CI, 8.115-19.549), respectivamente. Hubo una tendencia hacia una correlación positiva moderada entre ambas variables, con un coeficiente de relación de Spearman de 0.494 ($P=0.051$). La mediana de metilación global fue 8.78% (rango 0.41-88.34%).

Conclusiones. La metilación en las posiciones de los CpGs -473 a -347 del promotor de *p16*, de -693 a -554 del promotor de *SOCS-1* y de +233 a +392 del promotor de *SHP-1* se asocian con variables clínicas que tienen un impacto negativo sobre el pronóstico de la enfermedad, junto con la hipometilación global durante la remisión. La expresión de los genes *P16*, *SOCS-1*, *SHP-1*, *E-caderina* y *p73* es independiente del estado de metilación de los los promotores que se analizaron en este estudio.

ABSTRACT.

Introduction. Recent studies on the molecular pathogenesis and biology of multiple myeloma have demonstrated a complex epigenomic landscape contributing to the disease onset, prognosis and high individual variability.

Hypothesis. Methylation of the promoter of *P16*, *SOCS-1*, *E-CADHERIN*, *P73* y *SHP-1* is increased in multiple myeloma at activity and it decreases during remission. Global methylation of DNA is diminished in periods of activity of multiple myeloma.

Methodology. Promotor methylation of the genes and global methylation was determined during disease activity and remission. The methylation status of the promoters of the genes was determined by methylation specific PCR. Percentage of global methylation was determined by ELISA. Results were correlated with clinical variables.

Results: The percentage of patients with methylation at the promoter at the different points was different for *SOCS-1*. This gene was methylated in 9 patients (29%) during disease activity and not methylated in remission and in one patient (3.2%) it was methylated in remission but during active disease ($p=0.021$). Methylation status of the promoters did not correlate with gene expression ($p > 0.05$). The mean percentages of global methylation during active disease and in remission were 14.26% and 13.83%, with standard deviations of 21.48 (95%CI: 2.814–25.713) and 10.72 (95%CI: 8.115–19.549), respectively, which were not

significantly different. The median of global methylation percentage was 8.78 (range, 0.41%–88.34%). There was a trend towards a moderate positive correlation between both variables, with a Spearman's correlation coefficient of 0.494 ($p = 0.051$)

Conclusions. The methylation of CpGs -473 to -347 of *P16* promoter, -693 to -554 of *SOCS-1* promoter and +233 to +392 of *SHP-1* promoter were associated to clinical variables that have a negative impact on the prognosis of the disease, along with global hypomethylation during remission. Expression of *P16*, *SOCS-1*, *SHP1*, *E-CADHERIN* and *P73* is independent from the methylation of the promoters analyzed in this study.

I. ANTECEDENTES

MIELOMA MÚLTIPLE

1.1 Epidemiología

El Mieloma múltiple (MM) representa el 1,5 % de todas las neoplasias y el 15 % de las neoplasias hematológicas (Wingo et al., 1995; Howe et al., 2001). Es más frecuente en la población adulta con una mediana de edad entre 69 y 70 años.

El MM constituye, por frecuencia, la segunda neoplasia hematológica después de el linfoma. Según datos de 2006 en EE.UU, su incidencia es de 56 casos nuevos por cada 1.000.000 de habitantes por año. Además, se sitúa como la décima causa de muerte por cáncer en números absolutos con 3,8 muertes por cada 100.000 habitantes por año (Greenlee et al., 2001) . La edad de presentación se sitúa en los 69 años y sólo un 15 % de los casos se diagnostica antes de los 50 años. No hay diferencias relevantes en la incidencia por sexos y respecto a la raza, se presume una mayor incidencia en negros americanos y población caribeña respecto a otras poblaciones; estas diferencias no están totalmente aclaradas (Howe et al., 2001).

En los Estados Unidos se diagnostican 4 000 nuevos casos de mieloma al año, lo que corresponde a 1% de todos los cánceres y 10-15% de las neoplasias hematológicas (Greenle et al., 2001). En nuestro país, de acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (SSA, 1999), en ese año hubo 53 669

defunciones por tumores malignos, de las cuales 47.8% correspondieron al género masculino y 52.2% al género femenino. El 1.1% de estas defunciones fueron secundarias a MM. Este cáncer destacó entre las 20 principales causas de mortalidad por tumores malignos en hombres (tasa 0.64 x 100 000), y corresponde a la tercera entidad hematológica maligna más frecuente (SSA, 1999). De acuerdo al reporte de GLOBOCAN, en 2012 la incidencia del mieloma múltiple en México fue de 1380 y la mortalidad de 1029 defunciones. La incidencia fue prácticamente igual en ambos géneros. (GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, International agency for research on cáncer, World Health Organization). Recientemente se publicó un artículo en el que se reportó la epidemiología del mieloma múltiple en ciertas instituciones de 5 países latinoamericanos: Argentina, Brazil, Chile, México y Perú (Hungria, et.al, 2017). Se reunieron los datos de 850 pacientes. La mediana de edad al diagnóstico fue de 60.9 años (25.9-97.9), el 46.9% de los casos correspondió a género femenino y el 53.1% al género masculino, el 68.9% de los casos se diagnosticó en una estadio Durie-Salmon III y el 34.2% de los casos se diagnosticó en un estadio ISS de III. La mediana de SG de los pacientes no elegibles para trasplante (n=461) fue de 67.4 años y la de los elegibles para trasplante fue de 43.0 meses.

En población negra se duplica la frecuencia observada en población caucásica. La relación masculino:femenino es 1.4:1 (Howe et al., 2001). La mediana de

edad al diagnóstico es 71 años (Greipp et al., 2005), la mediana de supervivencia a partir del diagnóstico es aproximadamente 3-4 años, aunque el rango varía entre menos de 6 meses a más de 10 años (Kyle et al., 2004; Conté et al., 2007).

1.2 Fisiopatología

Es una enfermedad incurable con un pronóstico heterogéneo difícil de predecir y con una supervivencia a los 5 años que no supera el 40 %. En muchos casos está precedida por una anomalía llamada gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI) (Kyle et al., 2004), que ocurre aproximadamente en el 3 % de los individuos mayores de 50 años y puede progresar a MM (Seidl et al., 2003). Un estadio de la enfermedad intermedio entre GMSI y MM es el mieloma múltiple asintomático o larvado (MMA), en el cual el paciente se encuentra asintomático, no existe evidencia de daño a órgano blanco ni de eventos definitorios de mieloma (Mateos, González-Calle, 2017). El riesgo anual de progresión de MMA a MM es de 10% por año durante los primeros 5 años, 5% por año durante los siguientes 5 años y sólo 1% por año después de 10 años (Kyle et al., 2007). Hay que recordar que el MM se establece en la médula ósea (MO) y en este sentido, ya desde hace algunos años, se le ha asignado mayor importancia al rol que tiene el microambiente de la MO en el desarrollo del MM. El microambiente (estroma) está conformado por elementos extracelulares de

matríz y elementos celulares, tales como células fibroblásticas, células endoteliales, osteoblastos, osteocitos y células del sistema inmune (Dispenzieri et al., 2004). Las interacciones de estos tipos celulares están mediadas por citocinas, moléculas de adhesión, receptores celulares y solubles (De Reave; 2005).

En la fisiopatología del MM, el fenómeno de interacción involucra factores parácrinos involucrados en la supervivencia, diferenciación, proliferación, resistencia a drogas, osteoclastogénesis, inhibición de la osteogénesis, angiogénesis, deficiencia humoral y celular y anemia (Bergsagel et al., 2005). Las células de MM al migrar hacia la MO establecen una primera relación con las células del endotelio, activando la expresión de citocinas y moléculas de adhesión en dichas células, las que facilitarán su adhesión a las células del estroma de la MO. La adhesión de éstas a las células del estroma produce la activación del factor NF-kB que participa en la transcripción y secreción de interleucina-6 (IL-6) (Fonseca et al., 2004).

El MM se caracteriza por alteraciones genéticas muy complejas. La GMSI considerada como predecesora del mieloma múltiple, puede ser conceptualizada como un primer cúmulo de alteraciones genéticas que requiere otras mutaciones para progresar a MM (Kuehl WM; 2002). Actualmente se sabe que algunas alteraciones presentes en el MM, se encuentran en la GMSI. Sin embargo, el

hallazgo de las mismas en GMSI no significa progresión a MM (Munshi et al., 2001).

Las manifestaciones clínicas más comunes están relacionadas con el daño a órgano blanco, manifiestas en forma de anemia o pancitopenia, dolor óseo como síntoma más común en el 70 % de los casos y fracturas patológicas. Suelen encontrarse otras expresiones derivadas de la hipercalcemia por daño óseo o asociadas a la insuficiencia renal (Bergsagel et al., 2005); así mismo, el hallazgo de más de 30 g por litro de proteína monoclonal, más de 10 % de plasmocitos en la médula ósea y el compromiso de dos órganos blancos en un año, manifestado por hipercalcemia, daño renal, anemia, lesiones óseas, manifestaciones derivadas de hiperviscosidad e infecciones bacterianas recurrentes, son considerados criterios clínicos para el diagnóstico oportuno de la enfermedad (Kyle et al., 2004).

Gammapatías Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI)

Se requieren 3 criterios:

1. Paraproteína monoclonal en el suero <3 g/dL.
2. Plasmocitosis en médula ósea inferior a un 10 %.
3. Ausencia de lesiones líticas en hueso, anemia, hipercalcemia e insuficiencia renal relacionadas a un proceso proliferativo de células plasmáticas.

1.3 Criterios diagnósticos

Gammapatía Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI)

Se requieren 3 criterios:

1. Paraproteína monoclonal en el suero <3 g/dL.
2. Plasmocitosis en médula ósea inferior a un 10 %.
3. Ausencia de lesiones líticas en hueso, anemia, hipercalcemia e insuficiencia renal relacionadas a un proceso proliferativo de células plasmáticas.

MM asintomático

Se deben de reunir ambos criterios:

1. Proteína monoclonal sérica (IgG o IgA) ≥ 30 g/L o proteína monoclonal urinaria ≥ 500 mg en 24 horas y/o células plasmáticas clonales en médula ósea entre 10-60%.
2. Ausencia de eventos definitorios de mieloma o amiloidosis.

MM Sintomático:

Se requieren un criterio del punto 1 y al menos un criterio de 2 o 3:

1. Plasmocitosis monoclonal en médula ósea $\geq 10\%$ o plasmocitoma.
2. Disfunción orgánica en relación con el mieloma (1 ó más criterios).

Calcio alto ≥ 1 mg/dL mayor del nivel basal o hipercalcemia > 11 mg/dL

Insuficiencia renal: Depuración de creatinina <40 mL/min o creatinina sérica >2 mg/dL

Anemia: disminución de hemoglobina >2 g/dL por abajo del límite normal o reducción <10 g/dL

Hueso: una o más lesiones osteolíticas (≥5 mm) demostradas por SOM, TC o PET-CT3.

3. Uno o más de los siguientes biomarcadores de malignidad.

Células plasmáticas clonales en médula ósea ≥60%

Relación de cadenas ligeras libres involucrada:no involucrada ≥100

>1 lesión focal en IRM (≥5 mm)

1.4 Modelo de patogénesis molecular y citogenética del mieloma múltiple.

La clasificación molecular y citogenética del mieloma ha sido revisada por múltiples autores y recientemente por el grupo internacional de trabajo del mieloma (IMWG). Esta se muestra en el cuadro 1.

En MM se ha propuesto dos vías de patogénesis: la vía que involucra los tumores no hiperdiploides (MM-NNH) (<48 o >75 cromosomas), que engloba hipodiploidía, pseudodiploidía, tetraploidía y translocaciones IgH) o la vía que involucra los hiperdiploides (MM-HD), que engloba trisomías y una baja prevalencia de translocaciones IgH. La disregulación del gen de *ciclina D* parece

ser un evento temprano y que asocia a un grupo. Esta disregulación hace a las células más susceptibles a estímulos proliferativos, lo que resulta en interacción de células estromales de la médula ósea que producen IL-6, factor de crecimiento parecido a la insulina 1 y otras citocinas. La prevalencia de mutaciones en *RAS* es de 30-40% en etapas tempranas del MM y un poco más altas en MM avanzado; las mutaciones en *FGFR3* pueden currir con mayor frecuencia en MM avanzado.

Las alteraciones cromosómicas más frecuentemente asociadas a MM son: 1) Delección del cromosoma 13: se observa hasta en un 50% de los casos (Avet-Loiseau et al., 1999; Bergsagel et al., 2005) se asocia con supervivencia corta y menor probabilidad de respuesta a tratamiento con quimioterapia convencional y dosis alta de quimioterapia (melfalán) y rescate con trasplante autólogo (Pérez Simón et al., 1988; Seong et al., 1998, Shaughnessy et al., 2003) 2) Delección 17p: se ha reportado en pacientes con MM al momento del diagnóstico en el 5-10%; sin embargo en MM avanzado se encuentra hasta en el 40% de los casos. Es un predictor de mal pronóstico (Perez Simón et al., 1998; Avet-Loiseau et al., 1999). En una cohorte de pacientes tratados con dosis altas de quimioterapia (melfalán) y rescate con trasplante autólogo de células progenitoras se encontró como un marcador de mal pronóstico independiente, con una supervivencia libre de progresión de 7.9 meses comparado con 25.7 meses para los pacientes que no tenían esta alteración (Chang et al., 2005). 3) La t(11;14)(q13;q32) se puede

identificar en 15-20% de los pacientes con MM por técnica de FISH (Avet-Loiseau et al., 2002; Gertz et al., 2005; Fonseca et al., 2002). Su presencia coloca al paciente en un riesgo intermedio. 4) La $t(4;14)(p16.3;q32)$ se detecta en 15-20% de los pacientes con MM por técnica de FISH (Chesi et al., 1997; Chesi et al., 1998; Richelda et al., 1997) . Se asocia a pobre pronóstico independientemente del tratamiento que se administre (Facon et al., 2001; Avet-Loiseau et al, 2002).

Cuadro 1. Clasificación citogenética/molecular propuesta por el International Myeloma Working Group.

			Porcentaje de pacientes	Hallazgos clínicos y de laboratorio
Hiperdiploide			45	Más favorable, IgG-K, más añosos
			40	Agresivo, IgA-I, más jóvenes
	Translocación gen ciclina D (18%)	t(11;14)(q13;132)	16	Sobrerregulación de CCND1; pronóstico favorable; lesiones líticas.
		t(6;14q)(p21;32)	2	Probablemente igual que CCND1
		<1	Raro	
No hiperdiploide	Translocación MMSET	t(4;14)(p16;q32)	15	Sobrerregulación de MMSET; sobrerregulación de FGFR3 en 75%, pronóstico desfavorable con tratamiento convencional, lesiones óseas menos frecuente
		t(14;16)(q32;q23)	5	Agresivo
	Translocación MAF	t(14;20)(q32;q11)	2	Agresivo
		t(8;14)(q24;q32)	1	Pbe. Agresivo
No clasificado (otras)			15	Varios subgrupos y algunos se traslapan

La figura 1 muestra las translocaciones, alteraciones en el número de copias y mutaciones descritas en MM.

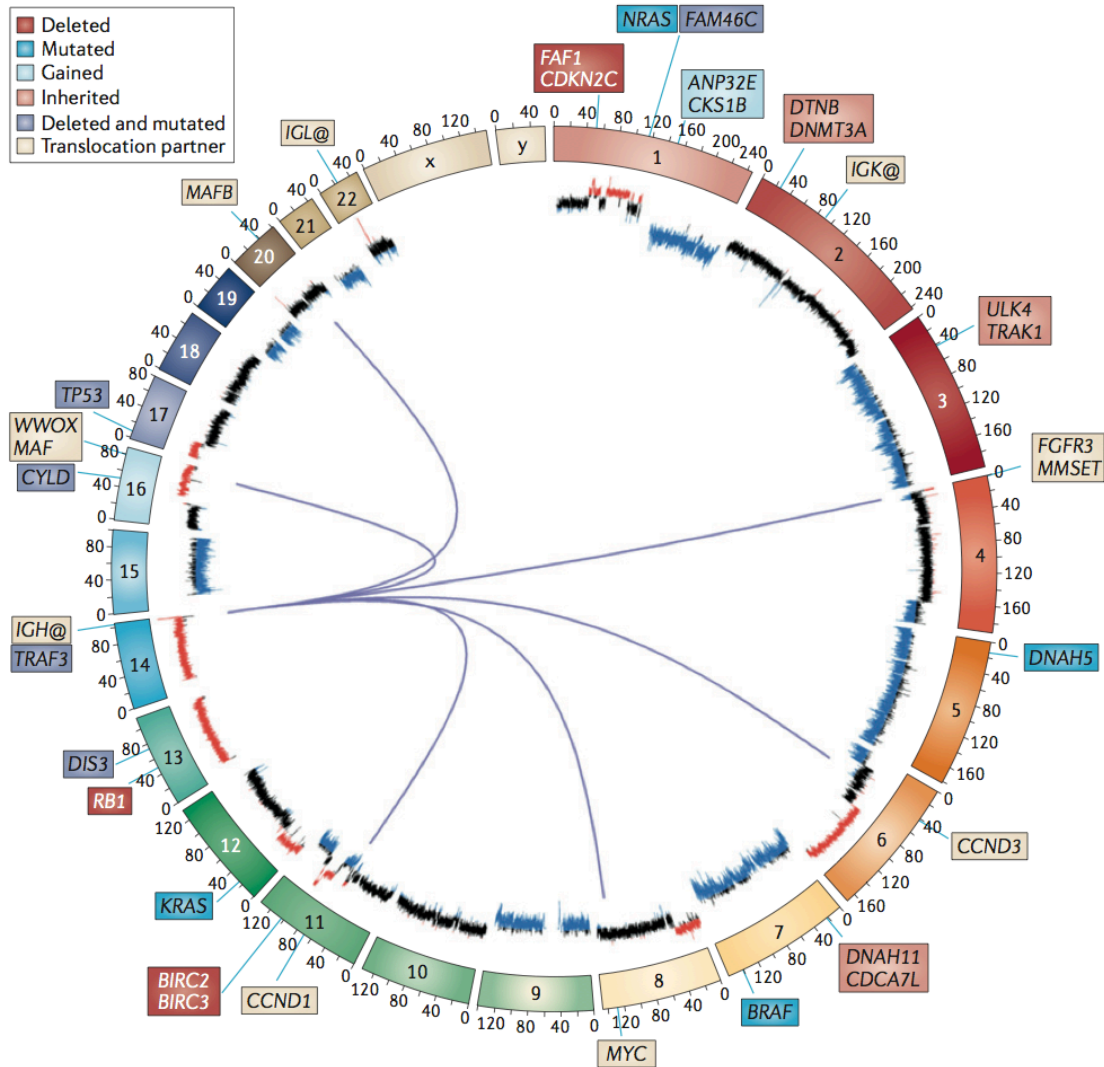


Figura 1. Los cambios genéticos clave en el genoma en mieloma. Se muestran las translocaciones clave, CNA y mutaciones descritas en mieloma. Los cromosomas están dispuestos en el círculo iniciando en la parte superior con el cromosoma 1 y continúa en el sentido del reloj. Las translocaciones de los locus de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (*IGH@*) se muestran con líneas que salen del cromosoma 14 a los cromosomas con los que se transloca. El número de copias se presenta en el interior del círculo, las deleciones se

muestran en rojo, las ganancias en azul y el número de copias normales en negro. Los genes que son blanco de delecciones y/o mutaciones se encuentran etiquetados afuera del círculo y el color representa el tipo de alteración (cuadro superior izquierdo de la figura). *ANP32E*, miembro E de la familia de la fosfoproteína 32 nuclear ácido-leucina; *BIRC*, proteína que contiene repetidos de IAP baculoviral; *CCND*, ciclina D; *CDCA7L*, asociado a la división celular 7-like; *CKS1B*, proteína cinasa CDC28 1B; *CYLD*, cilindromatosis; *DNAH*, dinein, axonemal, cadena pesada; *DNMT3A*, DNA metiltransferasa 3A, *DTNB*, distrobrevina, beta; *FAF1*, Factor 1 asociado a FAS; *FGFR3*, receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos 3; *IGK@*, locus de la cadena ligera kappa; *IGL@*, locus de la cadena ligera lambda; *MMSET*, dominio SET de mieloma múltiple; *TRAF3*, receptor asociado del factor de necrosis tumoral 3; *TRAK1*, proteína de tráfico 1, unida a kinesina; *WWOX*, dominio en oxidoreductasa que contiene WW. (Modificado de Morgan 2012).

1.5 Epigenética y cáncer

En eucariontes la metilación del ADN es una modificación epigenética común y esta marca es típica de heterocromatina. Los residuos de citosina del carbón en la quinta posición son susceptibles de metilación comparados con otras bases nitrogenadas y constituye aproximadamente el 1% del total de nucleótidos. La metilación del ADN ocurre principalmente en residuos de citosinas que forman parte del dinucleótido CpG que se distribuye a lo largo del genoma y se encuentra concentrado en regiones conocidas como islas CpG (Jones 2001). Estas coinciden parcialmente con las regiones promotoras en aproximadamente 60-70% de los genes en el humano. En el proceso de conversión de citosinas a 5-metil citosinas (5mC) intervienen las DNA metil transferasas (DNMTs). Estas pueden ser metiltransferasas de mantenimiento o *de novo*. La represión de la expresión de genes por medio de la metilación del ADN es consecuencia directa

de impedir la unión de factores de transcripción e indirecta al incorporar proteínas de dominio de unión a CpG metilados (MBD, como MeCP2). Recientemente, se han identificado mecanismos para remover el grupo metilo mediados por las familias de enzimas “ten-eleven translocation” (TET) y deaminasas de citidina inducida por activación (Zhao 2013).

El nucleosoma es la estructura básica en que la cromatina enrolla 147 pb de ADN alrededor de un octámero formado por cuatro histonas que forman una super hélice. La carga positiva inherente a las histonas favorece su unión al ADN cargado negativamente. Las modificaciones post transduccionales de las histonas modifican el nivel de compactación de la cromatina y por lo tanto tienen impacto en la regulación de la transcripción.

En las células normales, es necesario que exista un balance preciso en la acetilación de histonas del ADN. Este balance es controlado por enzimas acetiladoras de histonas (HATS) así como enzimas deacetilasas de histonas (HDACs). Otras modificaciones incluyen la metilación de residuos de lisina de las histonas, esta es catalizada por metiltransferasas de histonas (MTH) y es un proceso que regula la expresión génica y la estructura de la cromatina. En general, la metilación en las lisinas de K9 y K27 de la H3 y K20 de la H4 se han asociado con silenciamiento génico mientras que la metilación en H3K4, H3K36 y H3K se ha asociado con activación (Georgepulos 2002). Tanto los cambios genéticos como epigenéticos son responsables de la disrupción en las vías de

señalización celular en cáncer. Los proto-oncogenes pueden ser sobreexpresados por la ganancia de cromosomas, amplificación génica, translocaciones y mutaciones activadoras. Los genes supresores de tumor (GST) pueden ser inactivados por pérdidas cromosómicas, deleciones y mutaciones puntuales. Sin embargo, es claro que actualmente el silenciamiento génico de los GST asociado a la hipermetilación podría ser considerado como un equivalente funcional de mutaciones puntuales y deleciones, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo del cáncer (Muñoz-Pinedo 2013).

La mayor parte de la cromatina se encuentra en un estado transcripcionalmente inactivo, al formar la fibra de 30 nm de diámetro queda en un estado muy compactado formando la llamada “cromatina cerrada” o heterocromatina. En oposición, la “cromatina abierta” es accesible a la maquinaria de transcripción (Fig.2). La transcripción es regulada por una serie de procesos dinámicos necesarios para reunir los requerimientos adecuados para la síntesis de una proteína particular en un determinado contexto celular. Aunque el orden exacto de los eventos del silenciamiento génico es poco conocido, algunos aspectos son característicos de este estado transcripcional de la cromatina. Las citosinas metiladas de los promotores silenciados se unen a un grupo específico de proteínas represoras. Estas se unen a los dominios de unión de los CpG metilados o methyl-CpG-binding-domain proteins (MBDs), en un complejo que también incluye a la desacetilasa de histonas (HDAC). Esta última juega un rol

central en la regulación de la transcripción debido a que es capaz de remover los grupos acetilo de los aminoácidos en los extremos N-terminal, también llamados colas de las histonas. Este proceso está involucrado en la condensación del nucleosoma y de las histonas hipoacetiladas que también forman parte del silenciamiento temporal de los genes en las regiones de eucromatina. Al contrario, en los promotores transcripcionalmente activos con citosinas no metiladas, las histonas son acetiladas por una acetiltransferasa de histonas (HATs) que forma un complejo activador de la transcripción con factores de transcripción y proteínas coactivadoras (Mungall 2002).

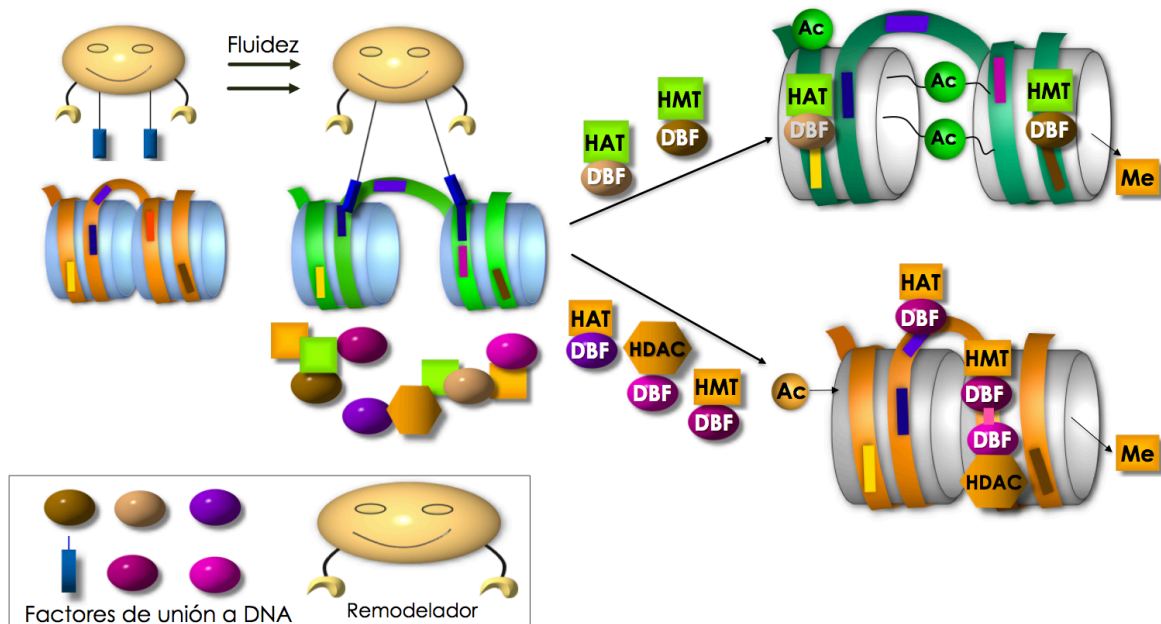


Fig.2 Modelo esquemático que representa la estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor. La cromatina transcripcionalmente activa es caracterizada por citosinas no metiladas y colas de histonas acetiladas. Cuando las citosinas se metilan se unen a MBDs, que atraen HDACs, que van a remover los grupos acetilos de las colas de histonas. El ADN se transforma en una estructura de cromatina cerrada llevando la marca de silenciamiento. (Georgopoulos; 2002).

En principio cualquier combinación de eventos genéticos y epigenéticos puede llevar a la inactivación de un GST. Es bien conocido por observaciones epidemiológicas que la edad es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de cáncer y en muchos tipos de cáncer es también un factor pronóstico independiente de la respuesta a tratamiento. Los eventos moleculares que subyacen a los efectos adversos de la edad son probablemente multifactoriales (Shen 2010). Sin embargo, patrones alterados de metilación de ADN en pacientes mayores puede ser un elemento clave. En células somáticas, la

metilación global disminuye con la edad, mientras que que la metilación de las áreas promotoras aumenta (Delcuve 2009). La metilación de las citosinas parece extenderse desde las secuencias más alejadas hacia los promotores hasta alcanzar un nivel donde el gen es silenciado (Gronbaek 2007). (Fig.3).

Dependiendo de la función del gen involucrado, estos cambios pueden no tener consecuencias o pueden representar una condición premaligna si ésta ocurre en genes reguladores del crecimiento y muerte celular. Se ha sugerido que la metilación relacionada a la edad puede cambiar la fisiología de las células normales de forma que las hace más susceptibles de adquirir defectos genéticos secundarios y por lo tanto promueve la transformación maligna (Delcuve 2009).

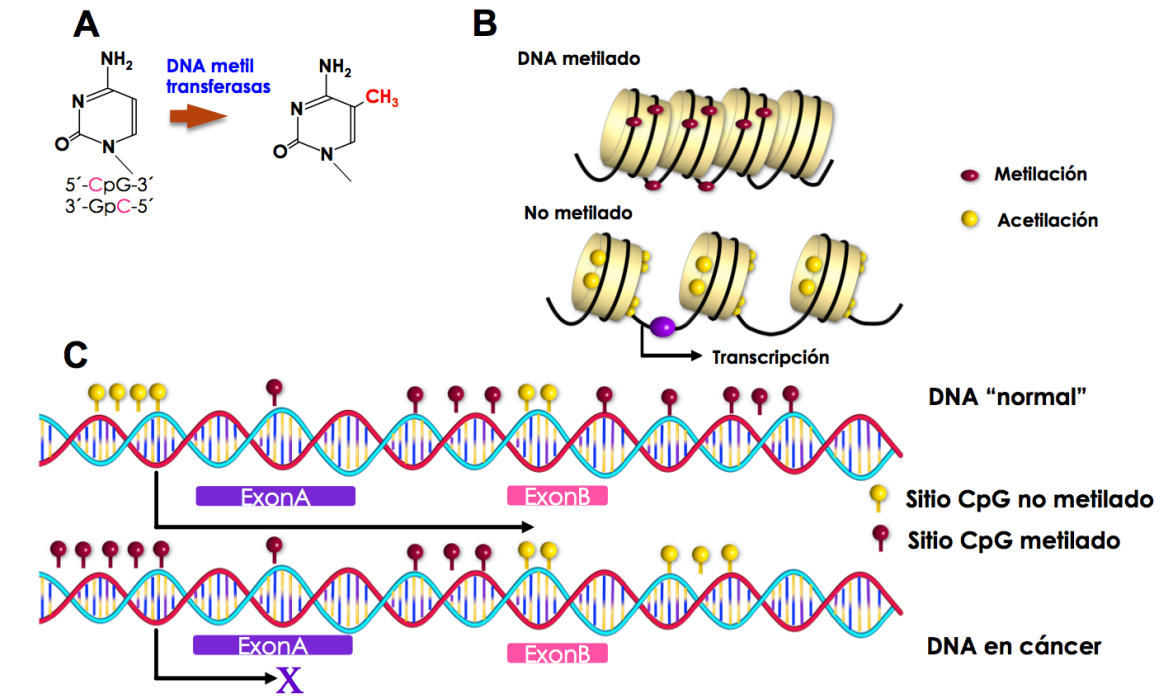


Fig.3 Cambios en la metilación del ADN en promotores durante la carcinogénesis. En tejido normal, la metilación es preferencialmente encontrada en las citosinas de las regiones codificantes de los genes y las islas CpG de los promotores se encuentran demetiladas. En el envejecimiento y en las lesiones preneoplásicas, la metilación se prolonga hacia los promotores. En la medida que estos se metilan se bloquea la transcripción, que puede llevar a la inactivación de los genes supresores de tumores, y que se pueden reactivar con el uso de inhibidores de metiltransferasas (Gronbaek 2007).

Los microRNAs son moléculas de RNA de doble cadena no codificantes conformados por 20-25 nucleótidos. El microRNA maduro se une a su blanco, generalmente una región no traducida 3' y regula la expresión del gen blanco mediante la represión de la traducción o la degradación del RNAm (Tagliaferri 2012). La figura 4 muestra la biogénesis de los miRNAs y su regulación.

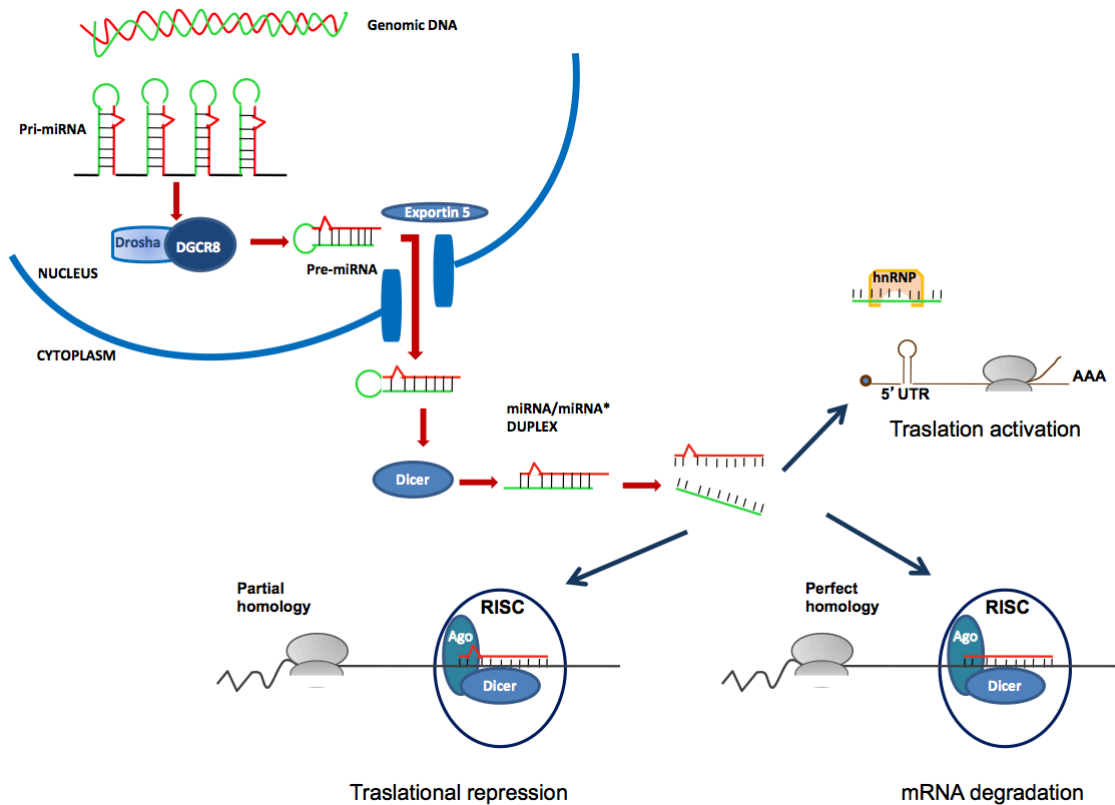


Fig. 4 Diagrama de la regulación traduccional y biogénesis de los miRNAs. El miRNA es transcrito por varias RNA polimerasas II en una horquilla pri-miRNA que es cortada por Drosha, miembro de la familia de RNA polimerasa III, en un pre-miRNA de 70-100 pb que se transloca del núcleo por exportina 5. DGCR8, subunidad DGCR8 del complejo microprocesador de la región crítica del Síndrome de DiGeorge; RISC, complejo silenciador inducido por RNA; Ago, Argonauta; Dicer, Dicer RNasa III; hnRPN, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas; 5'UTR, región no traducida 5'; AAA, cola de poly(A). (Tagliaferri;2012).

1.6 Alteraciones epigenéticas

1.6.1. Cambios en la metilación del ADN

El silenciamiento transcripcional (ST) secundario a hipermetilación de promotores se ha demostrado en muestras de médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y líneas celulares de MM en múltiples genes con diferentes funciones. En el cuadro

2 se resumen los genes supresores de tumores que se han encontrado hipermetilados en MM o en GMSI en dos o más estudios.

Cuadro 2. Genes supresores de tumores cuyos promotores se han encontrado hipermetilados en MM/GMSI en dos o más estudios.

Gen	Localización cromosómica	Función	Frecuencia de metilación (%)	
			GMSI	MM primario
<i>INK4A</i>	9p21.3	Control del ciclo celular	0-39	0-42.9
<i>ARF</i>	9p21.3	Control del ciclo celular	0-29	0-29
<i>CDKN2B</i>	9p21.3	Control del ciclo celular	0-50	13.5-75
<i>CDKN1C</i>	11p15.5	Control del ciclo celular	0-17	0-5.5
<i>TP73</i>	1p36.3	Control del ciclo celular	21-33	0-45
<i>DAPK</i>	9q21.33	Apoptosis y autofagia	15-50	5.9-77
<i>BNIP3</i>	10q26.3	Proteína proapoptótica de la familia Bcl2	4	5-21
<i>SFRP1</i>	8p11.21	Inhibidor de la vía Wnt		14-35
<i>SFRP4</i>	7p14.1	Inhibidor de la vía Wnt		1.3-14
<i>SFRP5</i>	10q24.1	Inhibidor de la vía Wnt		4-6.9
<i>VHL</i>	3p25.3	Pérdida de respuesta a hipoxia	0	0-33
<i>CDH1</i>	16q22.1	Adhesión celular	0	27-87
<i>MGMT</i>	10q26.3	Reparación de ADN	7-8	0-40
<i>ER</i>	6q25.1	Receptor de estrógeno	15.8	0-40.6
<i>RARB</i>	3p24.2	Receptor de ácido retinóico	0	0-11.8
<i>RASSF1</i>	3p21.3	Proteína RAS efectora	0-14	2-15
<i>SOCS-1</i>	16p13.13	Inhibidor de la vía Jak/STAT	14	0-74.5
<i>SHP1</i>	12p.13	Inhibidor de la vía Jak/STAT	31.6	14.7-84.4

* modificado de Dimopoulos et al 2014

Algunos de estos se han reactivado *in vitro* al administrar tratamiento con inhibidores de metiltransferasas como la 5-aza-2deoxicitidina, 5-azacitidina y zebularina.

I.6.2. mi-RNAs

Recientemente se han publicado diferentes estudios sobre miRNAs y mieloma. El cuadro 3 resume miRNAs aberrantes y su función así como relevancia clínica y blancos en oncogénesis.

Cuadro 3. miRNAs aberrantes y su función, blanco y relevancia clínica en oncogénesis.

miRNA	Cambio	Relevancia clínica / función / blanco
		Asociación con maduración de células B
miR-125b	+21.9	Su alta expresión resultó en regulación a la baja de <i>IRF4</i> y <i>Blimp1</i> Reducción de muerte celular inducida por dexametasona en MM Blanco transcripcional de <i>p53</i>
miR-148a	+19.2	Sobrerregulación en células plasmáticas de MM y asociación con pobre SLP
miR-196b	+12.5	Su regulación a la baja incrementa la expresión de <i>CCND2</i> e induce el paso de G1 a fase S
miR-21	+10.9	Inducción de la vía IL-6/STAT-3 al adherirse a células de la médula ósea y células del estroma de la médula ósea Su sobreexpresión inhibió apoptosis e incrementó la resistencia a drogas Sobrerregulación por la sobreexpresión de <i>c-MYC</i>
miR-20a	+9.2	Regulación a la alta en células plasmáticas de MM y correlación con SLP más corta. Asociación con sobreexpresión de <i>CCND2</i> y promoción del ciclo celular de fase G1 a S

			Inhibición en migración celular e invasión al elegir como blanco a <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i>
miR-194-5p			Blanco transcripcional directo de <i>p53</i>
miR-215	+8.4		Su regulación a la baja se ha asociado con hipermetilación de promotores, que podrían alterar el asa <i>p53/MDM2</i> y promocionar el desarrollo de MM
miR-330-3p	+7.9		Sobrerregulado en MM agresivo y asociación con supervivencia global corta
miR-214	+7.9		Su regulación a la baja fue causada por metilación de ADN y resultó en inhibición de la proliferación de células de mieloma Blanco de <i>PSMD10</i> y <i>ASF1B</i>
			Control de diferenciación de células B al elegir como blanco a <i>c-Myb</i>
miR-150-5p	-3.5		Promueve crecimiento celular, invasión y metástasis vía interacción con <i>Mucin 4</i> Blanco potencial de survivina
			Blanco de tumores asociados a macrófagos para inducir la producción de <i>VEGF</i> y el crecimiento tumoral vía angiogénesis
			Blanco terapéutico potencial en MM
			Asociación con la translocación t(11;14)
miR-363-3p	-4.3		Su blanco es <i>PPP2R4</i> , la señal de activación de IL-6 y resulta en incremento en crecimiento celular y supervivencia
*Modificado de Tagliaferri 2012			

I.6.3. Modificación de histonas

En MM la alteración de modificación de histonas más característica es la regulación a la alta de *MMSET* (dominio SET de mieloma múltiple) que se presenta en los casos de MM con t(4;14), aproximadamente un 15-20% del total. *MMSET* se expresa en todos los tejidos. *MMSET* cataliza la dimetilación de H3K36 e incrementa la función de HDAC1 y HDAC2 y la demetilasa de histonas

LSD1. El incremento en las marcas H3K36m2 causa activación transcripcional en loci oncogénicos y una reducción global de marcas H3K27me3, que generalmente se asocia a represión.

La regulación a la alta de EZH2 en MM puede ser por activación de c-Myc, mediado por IL-6 o ser consecuencia de la regulación a la baja de miR-26^a. Estas alteraciones junto con mutaciones inactivadoras de UTX representan mecanismos que explican el incremento en los niveles de la marca represora H3K27me3 en genes blanco de PRC2 (Dimopoulos 2014, Amodio 2017).

II. HIPÓTESIS

La metilación de los promotores de los genes *P16*, *SOCS-1*, *E-CADERINA*, *P73* y *SHP-1* se encuentra incrementada en mieloma múltiple en períodos de actividad y disminuye en períodos de remisión.

La metilación global del ADN se encuentra disminuída en períodos de actividad del mieloma múltiple.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad en donde ciertos factores genéticos y ambientales se combinan para su desarrollo. La epigenética, ejemplificada en la metilación del ADN y la modificación de histonas, representa un nexo entre ambos procesos.

El MM es una enfermedad incurable, en la que están involucrados múltiples fenómenos genéticos y epigenéticos. El silenciamiento transcripcional de promotores de genes secundario a hipermetilación, es un fenómeno frecuente en MM. Diversos grupos han estudiado por separado a los diferentes genes involucrados; sin embargo el estado de metilación global no ha sido estudiado en esta neoplasia. La hipometilación genómica global se ha asociado a la inducción de inestabilidad cromosómica. En este estudio se evaluará el estado de metilación global en el tumor (médula ósea).

Este trabajo tiene como finalidad explorar diferentes puntos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y analizarlos de forma integral: estado de metilación del ADN en general en el tumor e hipermetilación de islas CpG de los promotores de determinados genes involucrados en la fisiopatología del MM. Estos aspectos se evaluarán en diferentes momentos de la enfermedad, para comparar la evolución de los mismos al momento del diagnóstico, remisión y recaída. El seguimiento longitudinal de la hipermetilación de islas CpG de los promotores de determinados genes a través de diferentes etapas de la enfermedad ha sido

estudiado sólo en 1 estudio que evaluó 4 pacientes. Ya que estos eventos se han postulado como mecanismos de inicio de la enfermedad, es importante conocer cuál es su comportamiento cuando la enfermedad entra en remisión y durante la recaída.

IV. OBJETIVOS:

IV.1 Objetivo general:

Estudiar el estado de metilación y expresión de *P16*, *SOCS-1*, *P73*, *E-CADERINA* y *SHP1*, genes que se han encontrado relacionados con la presentación, progresión y respuesta al tratamiento en pacientes con MM.

IV.2 Objetivos específicos:

1. Determinar el estado de metilación de los promotores de los genes *P16*, *SOCS-1*, *P73*, *E-CADERINA* y *SHP1*.
2. Determinar el estado de la expresión de los genes *P16*, *SOCS-1*, *P73*, *E-CADERINA* y *SHP1*.
3. Determinar la correlación entre factores clínicos con el estado de metilación de los promotores de los genes *P16*, *SOCS-1*, *P73*, *E-CADERINA* y *SHP1*.
4. Determinar el estado de la metilación global del ADN.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Diseño del estudio:

Se trata de un estudio de cohorte, prospectivo, longitudinal.

V.1.1 Descripción del estudio:

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. A todos los pacientes se les informó de los objetivos y procedimientos del estudio y todos aquellos pacientes que otorgaron su consentimiento informado por escrito fueron incluidos en el estudio con la seguridad de que la información recabada para este estudio era confidencial, que su participación era voluntaria pudiéndose negar a participar en cualquier momento y que eso no repercutiría en su tratamiento ni seguimiento dentro de la Institución. De cada participante se obtuvieron muestras de médula ósea y de dichas muestras se realizó la extracción de ADN y ARN para analizar el estado de metilación y de expresión de los genes propuestos.

V.2 Población de estudio:

En este estudio participaron pacientes de la Clínica de Mieloma Múltiple del Departamento de Hematología y Oncología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) de noviembre del 2006 a julio del 2012.

V.3 Criterios de selección

a) Criterios de Inclusión.

Pacientes con diagnóstico de MM sintomático de acuerdo a los criterios del Grupo Internacional de trabajo de Mieloma Múltiple (International Myeloma Working Group: IMWG) (Durie et al., 2006) en etapa de enfermedad activa (diagnóstico reciente sin tratamiento o recaída) y pacientes con MM en enfermedad inactiva (remisión) que desearan ingresar al protocolo y firmaran un consentimiento informado.

b) Criterios de Exclusión.

Presencia de otra neoplasia diferente de alguna discrasia de células plasmáticas en el pasado o concomitante. Uso de algún fármaco que afecte los procesos de metilación.

V.4 Análisis estadístico:

Las variables continuas se describieron como medianas y rangos, las variables categóricas se describieron como frecuencias y proporciones. Para estimar las diferencias estadísticas significativas entre proporciones, se utilizó la Chi cuadrada. Las medianas se analizaron mediante la prueba de t de muestras independientes. El estado de metilación de los genes se comparó para el mismo paciente en actividad y remisión utilizando la prueba Chi cuadrada pareada de McNemar. También las variables continuas medidas en actividad vs remisión o

con o sin metilación se compararon con la prueba t pareada. Los análisis de supervivencia se desarrollaron mediante el método de Kaplan-Meier. Los factores de pronóstico relacionados a la supervivencia se analizaron mediante el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Las asociaciones de la metilación global entre los grupos se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. La supervivencia global (SG) se calculó del momento del diagnóstico hasta la muerte o la última fecha en que se tuviese la certeza de que el paciente se encontraba vivo. La supervivencia libre de progresión se calculó del la fecha de inicio de tratamiento a la fecha de progresión o recaída. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. El análisis se analizó utilizando el paquete estadístico SPSS 21.0 (IBM Corporation, USA).

V.5 Elaboración de la base de datos:

Se construyó una base de datos en Excel en la que se recopiló la siguiente información:

a. Características demográficas de los pacientes (número de registro, iniciales del paciente, género, edad al diagnóstico, fecha de diagnóstico, estado de desempeño funcional de acuerdo al grupo oncológico cooperativo del este (ECOG por sus siglas en inglés), estadio de la enfermedad por clasificación Durie-Salmon e índice de estadificación internacional (ISS), tipo de proteína monoclonal, presencia de plasmocitoma óseo o extramedular, presencia de

lesiones líticas, tipo de tratamiento que recibió, uso de agentes novedosos, respuesta al tratamiento*, estado de la enfermedad al corte del estudio, estado del paciente (vivo o muerto) al corte del estudio, presencia de amiloidosis, fecha de defunción.

b. Parámetros de laboratorio en el momento de actividad de la enfermedad (hemoglobina, plaquetas, albúmina, calcio, deshidrogenasa láctica, creatinina, β 2microglobulina).

c. Resultados de los ensayos de PCR específica de metilación (MSP) y expresión de *P16*, *E-CADERINA*, *SOCS-1*, *P73* y *SHP1*.

d. Porcentaje de metilación global en actividad y en remisión.

*La respuesta al tratamiento se determinó de acuerdo a los criterios del IMWG ((Durie et al., 2006): Respuesta completa (RC) se definió como inmunofijación de proteínas negativa en suero y orina, desaparición de cualquier plasmacitoma de tejidos blandos y menos de 5% de células plasmáticas en la biopsia de médula ósea. Respuesta parcial (RP) se definió como una disminución $\geq 50\%$ en la proteína monoclonal sérica y una reducción $\geq 90\%$ en la proteína monoclonal en orina o < 200 mg/24 horas, en el caso en que no hubiese enfermedad medible por proteína monoclonal, la reducción $\geq 50\%$ de la diferencia entre la cadena ligera libre involucrada y no involucrada, si tampoco existía enfermedad medible por cadenas ligeras libres, una reducción del 50% de las células plasmáticas en la

biopsia de médula ósea (siempre y cuando el porcentaje basal de células plasmáticas fuese $\geq 30\%$) y si existía un plasmacitoma, este debe de haber reducido su tamaño en $\geq 50\%$. Muy buena respuesta parcial (MBRP) se definió como proteína monoclonal detectable por inmunofijación pero con una reducción $\geq 90\%$ en la proteína monoclonal sérica y proteína monoclonal urinaria menor a 100 mg/24 h o indetectable por electroforesis. Si la enfermedad no satisface los criterios de RP, MBRP, RC o enfermedad progresiva (EP) se clasificaba como enfermedad estable. La EP requería cualquiera de los siguientes: incremento $\geq 25\%$ en la proteína monoclonal sérica (incremento absoluto ≥ 0.5 g/dL) o en la proteína monoclonal urinaria (incremento absoluto ≥ 200 mg/dL) o en el caso de enfermedad no medible por proteína monoclonal, un incremento de $\geq 25\%$ de la diferencia entre la cadena ligera libre involucrada y no involucrada (incremento absoluto > 10 mg/dL) o un incremento del 25% del porcentaje de las células plasmáticas en la biopsia de médula ósea (increment absolute $\geq 10\%$), el desarrollo de lesiones óseas nuevas, plasmacitomas de tejidos blandos o un incremento definitivo en lesiones preexistentes o hipercalcemia (calcio corregido ≥ 11.5 mg/dl) atribuible a la enfermedad proliferativa de células plasmáticas. Todas las respuestas se debieron de confirmar en dos evaluaciones consecutivas.

V.6 Métodos de laboratorio:

V.6.1 Separación de células mononucleares (CMNS) a partir de aspirado de médula ósea

En condiciones asépticas, se obtiene ≤ 10 ml de médula ósea (MO) por aspiración. Las muestras se procesan en menos de dos horas después de la punción. La separación de las CMNs se realiza por gradiente con Ficoll.

En un tubo cónico de 50 mL, se diluye 10 mL de MO con 30 mL de PBS, y se homogeneiza por inversión. La MO diluida se transfiere con una pipeta lentamente sobre 10 mL de solución de Ficoll, cuidando de no romper el gradiente. Se centrifugan las muestras a 1800 rpm durante 30 min. La fase superior de líquido plasmático se retira por aspiración y se desecha. Con pipeta estéril se toma el anillo de CMNs y se transfiere a un tubo cónico limpio. El paquete celular se lava dos veces con solución amortiguadora de PBS. El sobrenadante se retira por aspiración, quedando un remanente de aproximadamente 1 mL. El paquete celular se resuspende y se agrega 600-1000 mL de solución *RNA later* (AMBION®) para preservar el ARN. Se fracciona en alícuotas de 500 mL y se conserva a -70°C , hasta usarse.

V.6.2 Extracción de ADN a partir de CMNS

Se extrajo ADN de las células de médula ósea enriquecidas en células plasmáticas. La extracción se llevó a cabo por medio de kits comerciales (QiAmp

DNA Micro Kit de QIAGEN®) de acuerdo con las condiciones reportadas por el proveedor.

1. Se agrega 20 μ l de proteasa al fondo de un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Se adiciona 200 μ l de la muestra al tubo de microcentrífuga. Si la muestra es menor a 200 μ l se adiciona el volumen faltante con PBS. Se agrega 4 μ l de RNasa A (100 mg/ml).
3. Se adiciona 200 μ l de buffer AL a la muestra. Se mezcla con vórtex por 15 segundos.
4. Se incuba a 56°C por 10 minutos.
5. Se centrifuga brevemente.
6. Se adiciona 200 μ l de etanol (96-100%) y se mezcla nuevamente con vórtex por 15 segundos. Se centrifuga brevemente.
7. Se transfiere la mezcla a una columna de centrifugado (en un tubo recolector de 2 ml). Se cierra y se centrifuga a máxima velocidad (20,000 x g; 14, 000 rpm) por 1 minuto. Se coloca la columna de centrifugado en un tubo recolector nuevo de 2 ml y se desecha el líquido filtrado.
8. Se adiciona 500 μ l de buffer AW1 a la columna de centrifugación. Se cierra y se centrifuga a máxima velocidad (20,000 x g; 14, 000 rpm) por 1 minuto. Se coloca la columna de centrifugación en un tubo recolector de 2 ml nuevo y se desecha el filtrado.

9. Se adiciona 500 μ l de buffer AW2 a la columna de centrifugado y se centrifuga a máxima velocidad (20,000 x g; 14, 000 rpm) por 3 minutos.

10. Se coloca la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección y se desecha el anterior. Se centrifuga a máxima velocidad (20,000 x g; 14, 000 rpm) por 1 minuto.

11. Se coloca la columna de centrifugación en un tubo recolector nuevo de 1.5 ml y se desecha el tubo recolector que contiene el filtrado. Se abre la columna de centrifugación y se adiciona 200 μ l de buffer AE o agua destilada. Se incuba a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos, y después se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.

12. Se repite el paso 11 una vez.

Por espectrofotometría (Equipo Nanodrop-Termofisher®) se determina la concentración cada muestra y su pureza de acuerdo a las razones 260/280 y 260/230, el ADN se mantiene a -70°C hasta su uso.

V.6.3 Aislamiento de ARN total a partir de CMNS

Se extrae RNA de las células de médula ósea enriquecidas en células plasmáticas.

Para la extracción y purificación del ARN total se emplea un elkit comercial *RNeasy mini kit* (Qiagen®).

Antes de dar inicio, se realizan los siguientes procedimientos:

-Se adiciona 10 μ l de β -mercaptoetanol por cada 1 ml de buffer RLT. Esta mezcla se almacena a temperatura ambiente hasta 1 mes.

-Al buffer RPE se adicionan 4 volúmenes de etanol (96-100%).

-Todo el material a usar deberá estar libre de RNasas, para ello se trata con 0.01% de DEPC.

-El procedimiento se realiza en frío.

1. Se despega el botón celular al golpear el tubo con los dedos. Se adiciona 600 μ l de buffer RLT. Se mezcla con pipeta.

2. Se homogeiniza el lisado y se transporta a una columna de centrifugación QIAshredder que se coloca en un tubo recolector de 2ml y se centrifuga durante 2 minutos a máxima velocidad.

3. Se adiciona 1 volumen de etanol al 70% y se mezcla bien mediante pipeteo.

4. Se transfiere hasta 700 μ l de la muestra a una columna de centrifugado que se coloca en un tubo recolector de 2ml. Se centrifuga a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) por 15 segundos. Se descarta el líquido recolectado. Si la muestra excede los 700 μ l, se transfieren las alícuotas restantes en la misma columna de centrifugación, y se siguen los mismos pasos.

5. Se adiciona 700 μ l de buffer RW1 a la columna de centrifugación. Se centrifuga a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) por 15 segundos. Se desecha el líquido recolectado.

6. Se adiciona 500 μ l de buffer RPE a la columna de centrifugación. Se centrifuga a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) por 15 segundos. Para lavar la membrana de la columna del tubo. Se desecha el líquido recolectado. Este paso se repite dos veces.

7. Se coloca la columna de centrifugación en un nuevo tubo recolector de 2 ml y se desecha el tubo recolector viejo. Se centrifuga a velocidad máxima por 1 minuto.

8. Se coloca la columna de centrifugación en un nuevo tubo recolector de 1.5 ml. Se adiciona 30-50 μ l de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna de centrifugación. Se centrifuga por 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para eluir el RNA.

9. El RNA se cuantifica en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermofisher®) y se almacena a -70°C hasta su uso.

V.6.4 Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetiza a partir de 1-2 microgramos de ARN total, empleando GeneAmp RNA PCRCore Kit Protocol (Applied Biosystems®).

Transcriptasa Reversa.

1. Se descogela, mezcla y se centrifuga brevemente todos los componentes antes de su uso. Se colocan todas las reacciones en hielo.
2. Preparación de la mezcla para la reacción de transcriptasa reversa.

- a. Se adicionan los componentes a cada tubo de reacción para lograr un volumen final de 20 μl como se muestra en el cuadro siguiente.

Componente	20- μl por reacción	Concentración final
Agua tratada con DEPC	Hasta 20 μl	-
Buffer II de PCR 10X	2 μl	1X
MgCl ₂ 25 mM	4 μl	5 mM
dNTPs 10 mM	2 μl (de cada uno)	1 μM (c/u)
DTT 100 mM	1 μl	5 mM
Inhibidor de RNasa (20 U/ μl)	1 μl	1 U/ μl
MuLV transcriptasa reversa (50 U/ μl)	1 μl	2.5 U/ μl

- b. Se tapan los tubos, mezclan y se centrifugan brevemente.

3. Adición del ARN y oligonucleótidos.

- a. Se adicionan los oligonucleótidos y la muestra a cada tubo para un volumen final de 20 μl de acuerdo al siguiente cuadro.

Componente	20- μl por reacción	Concentración final
50 μM de hexámeros aleatorios	1 μl	2.5 μM
Templado de ARN	Variable	1 μg de ATN total /20- μl de reacción

- b. Se tapan los tubos, se mezclan y se centrifugan brevemente.

Condiciones de la conversión a ADNc. Se realiza la reacción de PCR de acuerdo al siguiente cuadro:

Oligonucleótidos	Temperatura	Tiempo
Hexámeros aleatorios	25°C	10 minutos
	37°C	30 minutos
	95°C	5 minutos
	4°C	Indefinido

V.6.4 Amplificación por PCR.

1. Se descongelan los componentes, se mezclan y se centrifugan brevemente.
2. Preparación de la mezcla de PCR. Se combinan los componentes en cada tubo de acuerdo al siguiente cuadro.

Componente	100-μl por reacción	Concentración final
Aguda destilada esterilizada	Hasta 76 μ l	-
Buffer II de PCR 10X	8 μ l	1X
MgCl ₂ 25 mM	8 μ l	2 mM
ADN polimerasa AmpliTaq (5 U/ μ l)	0.5 μ l	0.025 U/ μ l

- a. Se mezclan y cenrifugan brevemente los componentes.

3. Se agrega 76 μl de la mezcla de PCR a los tubos que contienen los 20 μl de la mezcla de reacción de transcriptasa reversa.
4. Se adicionan los oligonucleótidos de acuerdo al cuadro siguiente:

Componente	100-μl por reacción	Concentración final
Oligonucleótido sentido 10 μM	2 μl	0.2 μM
Oligonucleótido antisentido 10 μM	2 μl	0.2 μM
Total	100 μl	

a. Se cierran los tubos, se mezclan y se centrifugan brevemente.

5. La incubación de las reacciones en el termociclador se realiza de acuerdo a las condiciones que se establecen en el siguiente cuadro:

Paso		Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos
35 ciclos de PCR	Desnaturalización	95°C	15 segundos
	Hibridación	55°C dependiendo de T_m del oligonucleótido	30 segundos
	Extensión	72°C	1 minuto/kg

1 ciclo	Extensión final	72°C	7 minutos
Detener		4°C	Indefinido

6. Los productos resultantes de esta reacción se visualizan por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%, se tiñen con bromuro de etidio y se examinan bajo luz UV. La expresión de ARN mensajero de β -actina de cada muestra se analiza y se utiliza como un control interno.

V.6.5 Análisis de expresión génica de P16, E-CADERINA, SOCS-1, P73 y SHP1

Para determinar la expresión de los genes investigados se utiliza PCR. La PCR se realiza con los oligonucleótidos de los genes investigados. Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR se muestran en el cuadro 4. Se utilizan 3 microlitros de cDNA, en un volumen final de 25 microlitros que contienen 0.2 micromoles de cada primer.

Adicionalmente, se incluyen controles negativos (cDNA individuos sanos y agua) y la amplificación de un gen endógeno (β -actina) para todas las muestras en cada ensayo. Para determinar la temperatura ideal de hibridación se realiza PCR con gradiente de temperatura.

Cuadro 4. Oligonucleótidos y condiciones de la PCR para evaluar la expresión de los genes de interés.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento, °C	Tamaño pb
β -actin	For 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' Rev 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	60.2	353
<i>E-cad</i>	For 5'-GGTCTGTCATGGAAGGTGCTC-3' Rev 5'-CAGGATCTTGGCTGAGGATGG-3'	61.5	124
<i>P73</i>	For 5'-CCACGAGCCTACCATGCTTTAC-3' Rev 5'-GGCACTGCTGAGCAAATTGA-3'	56.5	314
p16INK4A	For 5'-GGGGGCACCAGAGGCAGT-3' Rev 5'-GGTTGTGGCGGGGCGCAGTT-3'	63.1	159
<i>SHP-1</i>	For 5'-CGAGGTGTCCACGGTAGCTT-3' Rev 5'-CCCCTCCATACAGGTCATAGAAAT-3'	61.0	139
<i>SOCS-1</i>	For 5'-CAGGTGGCAGCCGACAATGC-3' Rev 5'-CCGCCGTCGGGGCTCTG-3'	64.3	52

E-cad, E-caderina; P16INK4A; *SHP-1*, Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1; *SOCS-1*, supresor de señalización de citosinas.

V.6.6 Conversión de ADN metilado:

Para la conversión con bisulfito de sodio, se usan 1.5 microgramos de ADN empleando un método comercial (EpiTect Bisulfite Kit, QIAGEN).

Antes de dar inicio, se realizan los siguientes preparativos:

Se adiciona 30 ml de etanol (96-100%) al buffer de lavado. Se almacena a temperatura ambiente. Se mezcla por inversión antes de iniciar el procedimiento.

Se adiciona 27 ml de etanol (96-100%) al buffer de desulfonación. Se almacena a temperatura ambiente. Se mezcla por inversión antes de iniciar el procedimiento.

Se adiciona 310 μl de agua libre de RNAsas al acarreador liofilizado de RNA (310 μg) para obtener una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se disuelve utilizando vórtex vigorosamente.

Conversión de ADN con bisulfito.

1. Se descongela el ADN a convertir. Se disuelven las alícuotas necesarias de la mezcla de bisulfito con 800 μl de agua libre de RNAsas. Se mezcla con vórtex hasta que la mezcla esté disuelta, lo cual requiere hasta 5 minutos. En el caso en que no se disuelva la mezcla se calienta a 60°C y se mezcla nuevamente.
2. Se preparan las reacciones de bisulfito en tubos de PCR de 200 μl de acuerdo al siguiente cuadro respetando el orden de la lista.

Componentes de la reacción de bisulfito.

Componente	Volumen por reacción (μl)
Solución de ADN (1ng-500 ng)	Variable* (máximo 40)
Agua libre de RNAsas	Variable*
Mezcla de bisulfito	85
Buffer protector de ADN	35
Volumen total	140

* El volumen máximo de la combinación de solución de ADN y agua libre de RNAsas es 40 μ l

3. Se mezcla la reacción vigorosamente.
4. La conversión de ADN con bisulfito se realiza en un termociclador, de acuerdo a las condiciones del siguiente cuadro.

Condiciones del termociclador para la conversión con bisulfito.

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	99°C
Incubación	25 min	60°C
Desnaturalización	5 min	99°C
Incubación	85 min (1h 25 min)	60°C
Desnaturalización	5 min	99°C
Incubación	175 min (2 h 55 min)	60°C
Mantener	Indefinido	20°C

5. Una vez que se completa la conversión con bisulfito, los tubos de PCR se centrifugan brevemente, después se transfirieren a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
6. Se adicionan 560 μ l de buffer BL que contienen 10 μ g/ml de acarreador de ARN. La solución se mezcla brevemente en vórtex y se centrifuga.

7. La solución se coloca en una columna para centrifugar EpiTect con tubo recolector y se centrifuga a velocidad máxima por 1 minuto. Se desecha el líquido y se coloca la columna de nuevo en el tubo recolector.
8. Se adiciona 500 μ l de buffer de lavado a la columna y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Se desecha el líquido y se coloca la columna de nuevo en el tubo recolector.
9. Se adiciona 500 μ l de buffer de desulfonación a la columna y se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Se centrifuga la columna a máxima velocidad por 1 minuto, se desecha el líquido y se coloca la columna en el tubo recolector.
11. Se adiciona 500 μ l de buffer de lavado y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Se desecha el líquido y se coloca la columna en el tubo recolector.
12. Se repite el paso 11 una vez más.
13. Se coloca la columna para centrifugar en un nuevo tubo recolector de 2 ml y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto para remover cualquier líquido residual.
14. Se coloca la columna en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml. Se adiciona 20 μ l de buffer de elución al centro de la membrana. El ADN purificado se eluye por centrifugación por 1 minuto a aproximadamente 15,00 x g (12,000 rpm). Para incrementar la cantidad de ADN en el

eluído se agrega 20 µl adicionales de buffer de elución al centro de la membrana, se centrifuga por 1 minuto a máxima velocidad.

15. El ADN purificado se almacenó a -20°C hasta su uso.

El ADN modificado se cuantifica por espectrofotometría (Equipo Nanodrop-Thermofisher®) y se mantiene a -70 °C hasta su uso.

V.6.7 Análisis de metilación de P16, E-CADERINA, SOCS-1, P73 y SHP1

La cuantificación de la metilación en regiones promotoras ricas en CpG se realiza mediante PCR metilación específica (MSP). Se diseñaron oligonucleótidos para ADN modificado por bisulfito para distinguir entre ADN metilado y no metilado. El par de oligonucleótidos del ADN no metilado amplifica la muestra en que las citosinas seguidas por guaninas no están metiladas. Después de la modificación del ADN con bisulfito de sodio el ADN contiene timinas en vez de citosinas que se encontraban en la secuencia inicial. El par de oligonucleótidos del ADN metilado amplifica la muestra en que las citosinas están metiladas. En este caso las citosinas no cambiaron después del tratamiento con bisulfito de sodio. Para cada muestra se realizó dos reacciones de PCR: una con los oligonucleótidos complementarios a la secuencia metilada y otra con los oligonucleótidos complementarios a la secuencia no metilada. Para determinar la temperatura ideal de alineamiento se realizó PCR con gradiente de temperatura. El par de

muestras de cada paciente (actividad e inactividad de la enfermedad) se analizaron en el mismo ensayo, junto con controles positivos y negativos.

En todos los ensayos se incluyó 2 controles comerciales: ADN tratado con 5-azacitidina (New England Biolabs®), y ADN tratado *in vitro* con Sss I metiltransferasa (New England Biolabs®).

Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Oligonucleótidos y condiciones de la reacción de PCR específica de metilación.

Gen		Secuencias de oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento, °C	Tamaño, bp
<i>E-cad</i>	M	For 5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3' Rev 5'-TAACTAAAAATTCACCTACCGAC-3'	56.3	116
	U	For 5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3' Rev 5'-CACAACCAATCAACAACACA-3'	56.3	97
<i>P73</i>	M	For 5'-TTAGGTTAGTCGGGACGGAC-3' Rev 5'-CCGAAAAAACCCCTATATCG-3'	56.4	204
	U	For 5'-AGGTTAGTTGGGATGGATGT-3' Rev 5'-AACTCCAAAAAACCCCTATATCAC-3'	56.4	206
<i>P16INK4A</i>	M	For 5'-TTGGTAGTTAGGAAGGTTGTATCGC-3' Rev 5'-TCCCTACTCCCAACCGCG-3'	60	126
	U	For 5'-GGTAGTTAGGAAGGTTGTATTGT-3' Rev 5'-TCCCTACTCCCAACCACA-3'	60	124
<i>SHP-1</i>	M	For 5'-TTTTGTTGATGTTTATTTTCGACGT-3' Rev 5'-GAAAATCCTCACACCTTACGAA-3'	56	112
	U	For 5'-GTTTTGTTGATGTTTATTTTGATGT-3' Rev 5'-ACCAAAATCCTCACACCTTACA-3'	56	112
<i>SOCS-1</i>	M	For 5'-GTTTCGGTTTCGTTTAGTTTTTCGAGG-3' Rev 5'-ACCCCGACCGACCGCGATCTC-3'	62	139
	U	For 5'-GTTTGGTTTTGTTTAGTTTTTGAGG-3' Rev 5'-ACCCAACCAACCAACCAATCTC-3'	62	139

E-cadh, E-cadherina; *P16INK4A*; *SHP-1*, Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1; *SOCS-1*, supresor de señalización de citosinas; M, Metilado; U, No metilado.

V.6.8 Metilación global.

Se determinó el porcentaje de metilación global mediante el uso de un kit comercial de ELISA (MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit, Colorimetric Assay; Epigentek, Inc., Farmingdale, NY, USA) con el uso de anticuerpos dirigidos a secuencias de ADN metilado.

El procedimiento se describe a continuación:

1.El siguiente cuadro resume los diferentes componentes que se utilizaron en el ensayo:

Componente	Descripción
ME1	Buffer de lavado 10X
ME2	Solución de unión
ME3*	Control negativo, 20 ng/μl
ME4**	Control positivo, 20 ng/μl
ME5	Anticuerpo de captura, 1000 ng/μl
ME6	Anticuerpo de detección, 400 ng/μl
ME7	Solución potenciadora
ME8	Solución reveladora
ME9	Solución de paro

* Polinucleótido no metilado que contiene 50% de citosinas

** Polinucleótido metilado que contiene 50% de 5-metilcitosinas

1. Preparación de ME1 1X. Se adiciona 13 ml de ME1 10X a 117 ml de agua destilada (pH 7.2-7.5).

2. Preparación del ME4 diluido.

-Preparación del control de punto único: se diluye 20 ng de ME4 con TE1X a 5 ng/μl (1 μl de ME4+3μl de TE).

-Preparación de la curva estándar: Primero se diluye ME4 a 10 ng/μl (5 μl de ME4 + 5 μl de 1X TE). Después se preparan cinco concentraciones diferentes con el ME4 diluido a 10 ng/μl y 1X TE en 0.5, 1, 2, 5 y 10 ng/μl como se muestra en el cuadro 6:

Cuadro 6. Concentraciones para curva estándar de ADN metilado

Tubo	ME4 (ng/μl)	1X TE	Concentración resultante de ME4
1	1.0 μl	19.00 μl	0.5 ng/μl
2	1.0 μl	9.0 μl	1.0 ng/μl
3	1.0 μl	4.0 μl	2.0 ng/μl
4	2.5 μl	2.5 μl	5.0 ng/μl
5	4.0 μl	0.0 μl	10.0 ng/μl

3. Unión al ADN.

a. Se adiciona 80 μl a ME2 a cada pozo.

b. Se adiciona 1 μ l de ME3, 1 μ l de ME4 diluido y 100 ng de la muestra de ADN (1-8 μ l) a los pozos designados de acuerdo a el cuadro 6. Se mezcla la solución moviendo de lado la plataforma cuidadosamente.

Cuadro 7. Disposición de las muestras para realizar la curva estándar y muestras.

Pozo	Tira 1	Tira 2	Tira 3	Tira 4	Tira 5	Tira 6
A	ME3	ME3	Muestra 3	Muestra 7	Muestra 11	Muestra 15
B	ME4 0.5 ng	ME4 0.5 ng	Muestra 3	Muestra 7	Muestra 11	Muestra 15
C	ME4 1.0 ng	ME4 1.0 ng	Muestra 4	Muestra 8	Muestra 12	Muestra 16
D	ME4 2.0 ng	ME4 2.0 ng	Muestra 4	Muestra 8	Muestra 12	Muestra 16
E	ME4 5.0 ng	ME4 5.0 ng	Muestra 5	Muestra 9	Muestra 13	Muestra 17
F	ME4 10.0 ng	ME4 10.0 ng	Muestra 5	Muestra 9	Muestra 13	Muestra 17
G	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 6	Muestra 10	Muestra 14	Muestra 18
H	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 6	Muestra 10	Muestra 14	Muestra 18

c. Se cubre la plataforma con parafilm y se incuba a 37°C por 90 minutos.

d. Se remueve la solución de unión de la reacción de cada pozo. SE lava cada pozo 3 veces con 150 μ l de ME1 diluido. Para lavar los pozos, agrega ME1 diluido con una pipeta a éstos y después se remueve y se desecha. Se repite 3 veces.

4. Captura de ADN metilado.

a. Se diluye ME5 (dilución 1:1000) con ME1 diluido.

b. Se adiciona 50 μ l de ME5 diluido a cada pozo, después se cubre e incuba a temperatura ambiente por 60 minutos.

c. Se remueve la solución ME5 diluida de cada pozo.

d. Se lava cada pozo tres veces con 150 μ l de ME1 diluido 1X.

e. Se diluye ME6 (dilución 1:2000) con ME1 diluido.

f. Se adiciona 50 μ l de ME6 diluido a cada pozo, se cubre y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos.

g. Se remueve la solución de ME6 diluido de cada pozo.

h. Se lava cada pozo cuatro veces con 150 μ l de ME1 diluido 1x.

i. Se diluye ME7 (dilución 1:5000) con ME1 diluido

j. Se adiciona 50 μ l de ME7 diluido a cada pozo, se cubre y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos.

k. Se remueve la solución de ME7 diluida de cada pozo.

l. Se lava cada pozo cinco veces con 150 μ l de ME1 diluido 1X.

5. Detección de la señal.

a. Se adiciona 100 μ l de ME8 a cada pozo y se incuba a temperatura ambiente por 1 a 10 minutos alejado de la luz. Se inicia el monitoreo del cambio de color en los pozos. La solución ME8 se torna azul en presencia de ADN suficientemente metilado.

b. Se adiciona 100 μ l de ME9 a cada pozo para detener la reacción enzimática cuando el color de los pozos del control positivo se torna azul. Se

mezcla la solución al agitar suavemente y se espera 1-2 minutos para permitir que la reacción se detenga por completo. El color cambia a amarillo después de añadir ME9. La absorbancia se lee a 450 nm durante los siguientes 2-15 minutos.

6. Cálculo de 5-mC.

Cuantificación absoluta. Para cuantificar la cantidad de ADN metilado absoluto se generó una curva estándar y se realizó una gráfica de los valores de densidad óptica (DO) vs la cantidad del valor positivo en cada punto de concentración. Posteriormente se determinó la pendiente (DO/ng) de la curva estándar utilizando regresión lineal en el programa Excel. Se calculó la cantidad y el porcentaje de ADN (5-mC) metilado en el ADN total utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{ADN metilado (ng)} = (\text{DO muestra} - \text{DO blanco}) / \text{pendiente} \times 2$$

$$\text{Porcentaje de metilación} = (\text{ADN metilado (ng)} / \text{cantidad de ADN agregado}) \times 100\%$$

Hipometilación se consideró si la muestra se encontraba por debajo de la mediana de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de hipometilación del ADN en la enfermedad activa y en remisión.

VI. RESULTADOS

VI.1 Características demográficas y clínicas.

En total, se incluyó a 43 pacientes en el estudio de noviembre 2006 a diciembre 2012. Cuarenta y siete por ciento correspondían al género masculino y 53% al género femenino. El estado de la enfermedad durante la primera toma de médula ósea fue en actividad en un 95.4% (diagnóstico 65.1%, recaída 25.6%, enfermedad refractaria 4.7%) y en inactividad en un 4.6% (respuesta parcial 2.3% y respuesta completa 2.3%). La mediana de edad al diagnóstico fue 60 años (rango 36-87 años). La etapa de la enfermedad al diagnóstico de acuerdo al sistema de estadificación Durie-Salmon fue IA 7.1%, IIA 9.5%, IIIA 71.4% y IIIB 11.9%. En cuanto al ISS, los pacientes se clasificaron en 1, 2 y 3 en 27.5%, 32.5% y 40%, respectivamente. La presencia de plasmocitomas se documentó en 41.9% de los enfermos, de los cuales plasmocitomas óseos se encontraron en 21.4% y plasmocitomas extramedulares en 20.9%. El 74.4% de los casos se encontró con lesiones líticas. En cuanto al isotipo de la enfermedad, los más frecuentes fueron IgG en 47.1%, IgA 29.4 %, cadenas ligeras 20.6% y biconal 2.9%. El tipo de tratamiento administrado fue alquilantes en combinación con corticosteroides en 46.5% de los casos, basados en talidomida en 27.9%, basados en bortezomib en 16.3%, quimioterapia infusional en esquema DCEP en 4.7%. Un 4.7% no recibió tratamiento. La respuesta al tratamiento de acuerdo al Grupo Internacional de trabajo de Mieloma Múltiple fue remisión completa 20.9%,

respuesta parcial 37.2%, muy buena respuesta parcial 20.9%, enfermedad estable 7%, enfermedad progresiva 9.3% y enfermedad no evaluable en 4.7%. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se resumen en el cuadro 8.

Cuadro 8. Características demográficas y clínicas de los pacientes.

Características	Estadística descriptiva
Edad, años: Mediana (rango)	60 (36-87)
Género masculino: n. (%)	20 (46.5)
Estadio Durie-Salmon: n. (%)	
I	3 (7.1)
II	4 (9.5)
III	35 (83.3)
ISS: n. (%)	
I	11 (27.5)
II	13 (32.5)
III	16 (40)
Tipo de mieloma: no. (%)	
IgG	16 (47.1)
IgA	10 (29.4)
Cadenas ligeras	7 (20.6)
Biclonal	1 (2.9)
Hemoglobina	
Mediana (rango) g/dl	11.5 (6.2-15.6)
Creatinina	
Mediana (rango) mg/dl	9.4 (4.8-8.56)
Calcio	
Mediana (rango) mg/dl	9.1 (9-13.6)
Lesiones líticas: n. (%)	32 (74.4)
Plasmocitoma: n. (%)	18 (41.9)
Óseo: n. (%)	9 (21.4)
Extramedular: n. (%)	9 (20.9)

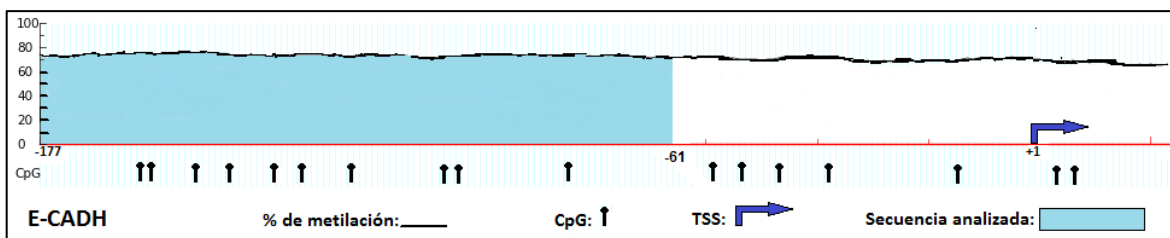
ISS: Sistema de estadiaje internacional, IgG, Inmunoglobulina G; IgA, Inmunoglobulina A.

VI.2 Metilación de promotores y ensayos de expresión

Estado de metilación de los promotores y expresión de los genes *P16*, *SOCS-1*, *E-CADERINA*, *P73* y *SHP-1*.

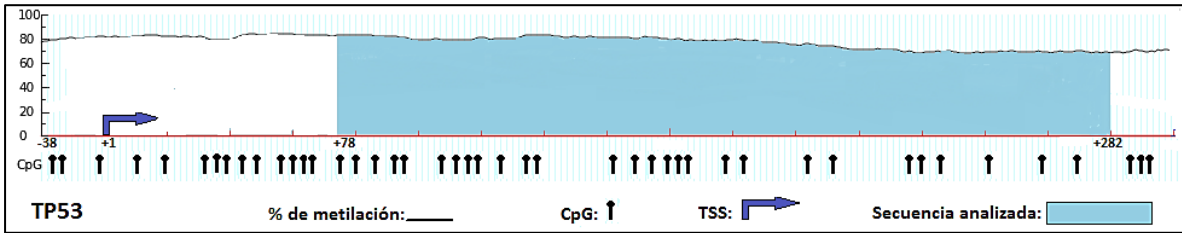
En la figura 5 se muestran los mapas de las secuencias analizadas para cada gen. Se analizó la metilación en las posiciones de los CpGs -473 a -347 del promotor de *p16*, de -693 a -554 del promotor de *SOCS-1*, +233 a +392 del promotor de *SHP-1*, -177 a -61 del promotor de *E-CADERINA*, y +78 a +282 del promotor de *P73*.

E-Caderina



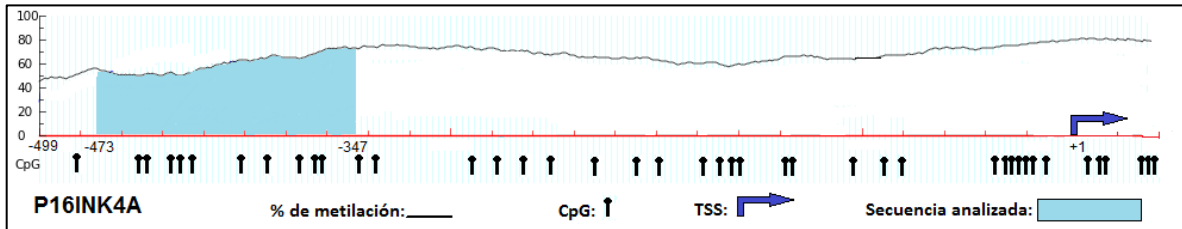
CCAGGCTAGAGGGTCACCGCGTCTATGCGAGGCCGGGTGGGCGGGCCGTCAGCTCCGCCCTGGGGA
 GGGGTCCGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGCAGGTGAACCCCTCAGCCAATCAGCGGTACGGGGGGC
 GGTGCCTCCGGGGCTCACCTGGCTGCAGCCACGCACCCCCTCTCAAGTGGCGTCCGGAAGTGC
 CAAAGCA
 CCTG

TP73



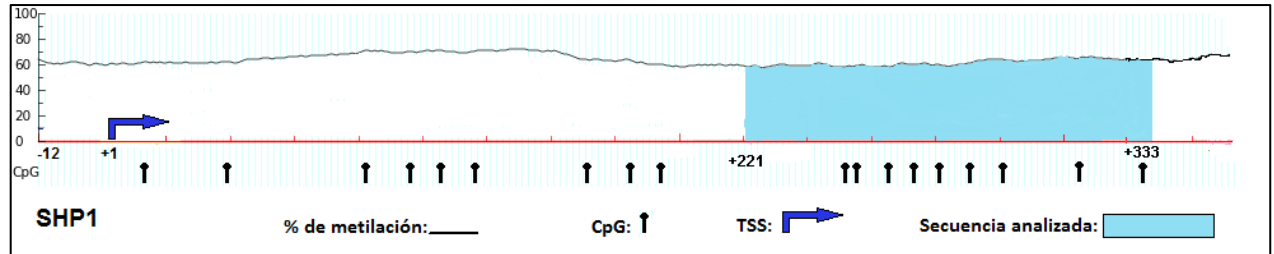
CCCCGCGCCCATATAACCCGCCTAGGGGCGGGCAGCCCGCCCTGCCTCCCGCCCGCGCACCCGCC
 CGGAGGCTCGCGCGCCCGCGAAGGGGACGCAGCGAAACCGGGGCCCGCGCCAGGCCAGCCGGGAC
 GGACGCCGATGCCCGGGGCTGCGACCGCTGCAGGTAGGAGGCCAGGGCCGGGGGGCGGTTCCGGCT
 CCGCGGGCGGGGGCTGGAGCGCAGCGCTGGGCAGGCACCTGGGCTCGCAGCTCCGAAGCTGGGAGG
 TGAGGGGAGAGCGATCGGGGACGAGCTGGGACAAGGCCACACAGGGGGCTCCCTCGGAGTTGGATCGG
 CCCCTGGGACTTGGCGCTCGCGAGAGGCTG

P16INK4A



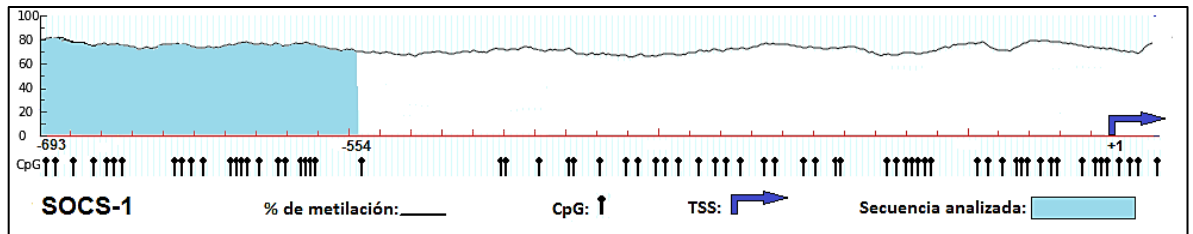
TATGACACCAAACACCCCGATTCAATTTGGCAGTTAGGAAGGTTGTATCGCGGAGGAAGGAAACGGGGC
 GGGGGCGGATTTCTTTTAAACAGAGTGAACGCACCTCAAACCGCCTTTGCTGGCAGGCGGGGGAGCGG
 GGCTGGGAGCAGGGAGGGCCGGAGGGGCGGTGTGGGGGGCAGGTGGGGAGGAGCCCAGTCCTCCTTCC
 TTGCCAACGCTGGCTCTGGCGAGGGCTGCTTCCCGCTGGTGCCCCCGGGGAGACCCAACCTGGGGC
 GACTTCAGGGGTGCCACATTGCTAAGTGTGCTCGGAGTTAATAGCACCTCCTCCGAGCACTCGCTCACGG
 CGTCCCCTTGCTGAAAGATACCGCGTCCCTCCAGAGGATTTGAGGGACAGGGTCCGAGGGGGCT
 CTTCCGCCAGCACCGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGCTGGCTGGTCACCAGAGGGTGGGGCGGACCGC
 GTGCGCTCGGCGGCTGCGGAGAGGGGGAGACAGGCAGCGGGCGGGGGAGCAGCATGGAGCCG
 CGGGCGG

SHP-1



CCCTGCAGTGCCATTGGCCTGGCAGGCAGGATCGAGGAGGAAGTGGCTGATTACTGAGCGG
 TTCTTCCTCACCTGGCTTGGGCCACTGTGCACAGCTGTGCCCGCTGGCTCAGCCC CGCCCC
 TGGCGCCCTCTGCCGTGGCTTCCCCCTCCCTACAGAGAGATGCTGTCCCGTGGGTAAGTCC
 CGGGCACCATCGGGTCCCAGTCTCCTGTTAGTTTTGGAGGGAGGGAGGGCTTTGTTGATG
 CTCACTCGACGTGTGTGAACGTGAGTGGGATCTGCCGCTGCCCTGCGCCTGTTTCCGGTC
 CCTATGAACTTCCCCTTCCCGCAAGGTGTGAGGACCCCGGCTCACTCATGCTCCTCTGCC
 CCTCTT

SOCS-1



GCCCGGCCCGCCAGTTTCCGAGGAAGTGGCCCGGGTGGAGGCGCCCGCGCCGCCAG
 GGGTTCTCTGAAGCCTGTGGTCAGGCCCGCCGCTTCCCGGGAAGCCCGAGCCAAGACCAGA
 GACCGCGGCCCGCCGGGGCTTCGGGACAGCAGGGCGGGCGACTGAGGGCGTCCGACGGCG
 GGTGGAGCAGGGGCTAGGAGGGGTCTACGGGTGGGGTCAGGCTCAGGGTTGGGGACACC
 TTCTGTGGCCTCCTAGGGGATCTGGCTGCAGGGGAGGAGAGGACAGGGCTCTGCCCCCG
 GCGGGTGTGGAGACAGCTGGGGCGGAGGAGGGTGTGTCAGGGCGCGTCCCAAGAGGGCC
 TGGCGGCAGAAAGTGAACCCGAGGTAGCGGGGCAAAATCGGGGTCCGAAGTCCGAAGG
 AGGGGTCCGAGAAGTGGCCCGGAAGGCGCAGGGTCCGGGGCCAGAGCCCCTCGAGAGGCGG
 GTGCTGGGGCAGGTGCGAACAGGCGGGCAGAGGGCCCCCGCGGAGGGTCCAGAAGAGAG
 GAAACAGGGCCGAAGCGGTCTCCGCGGACCGCCACCGCGGAAAGAGAAACCAAAAGTGG
 AGCTGGGGGCGGGGCCCGGCAGGGGGCGGGGCCTCCCGCGTCCAGCCCCCGCCTCCGA
 GCCGTTTAAAGACTGGCGCAGGGGGCGGGCGCGAACAGAGCGAGCTGCGGCCGTGGCA
 GCTGCACGG

Figura 5. Mapas de las secuencias analizadas para cada gen. En estas figuras se muestran los esquemas del promotor de cada gen estudiado. Los elementos relevantes se marcaron de la siguiente manera: segmento de ADN amplificado (área azul), dinucleótidos CpG (flechas negras), porcentaje de metilación (eje de las ordenadas) y sitio de inicio de la transcripción (flecha azul y nucleótido marcado con magenta).

Con la finalidad de identificar diferencias entre el estado de metilación de los promotores y la expresión de los genes durante la enfermedad activa y en remisión, se realizó la MSP para *P16*, *SOCS-1*, *E-CADERINA*, *P73* y *SHP-1*, y la PCR de expresión de los mismos genes en ambos estados de la enfermedad (activa y en remisión). En las figuras 6-10 se muestran algunos ejemplos de los geles de la MSP. En la figura 11 se muestra un ejemplo de PCR de expresión.

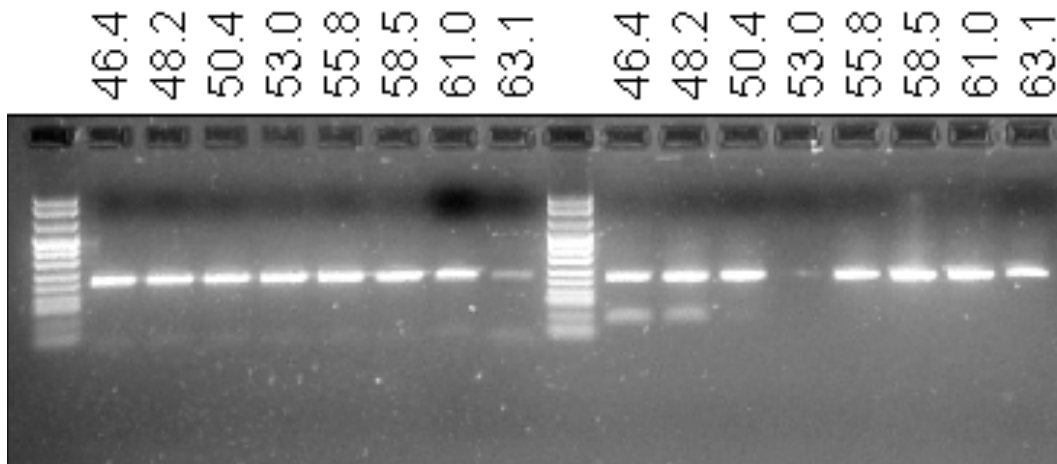


Figura 6. *P73* metilado y no metilado amplificaron adecuadamente entre 46.4 y 63.1°C. Se muestra la amplificación de *P73* metilado (pozos 2-9 del gel) y no metilado (pozos 11-18). La temperatura se especifica en la figura. 10 μ l de reacción. 20 ng de ADN convertido.

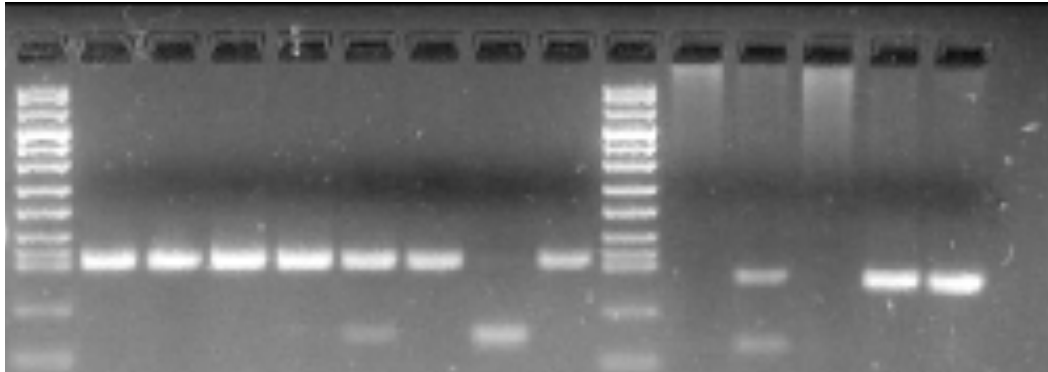


Figura 7. PCR específica de metilación *E-CADHERINA* metilada y no metilada. En los pozos 2-9 observamos la amplificación de muestras de ADN de pacientes con los oligonucleótidos para la secuencia metilada. En todos los casos amplificó, en el pozo 8 observamos una banda muy débil. En los pozos 11-15 observamos la amplificación de muestras de ADN de pacientes con los oligonucleótidos para la secuencia no metilada. En el pozo 11 y 13 no se observa ninguna banda. Tm 56.3°C. 10 μ l de reacción. 20 ng de ADN convertido.

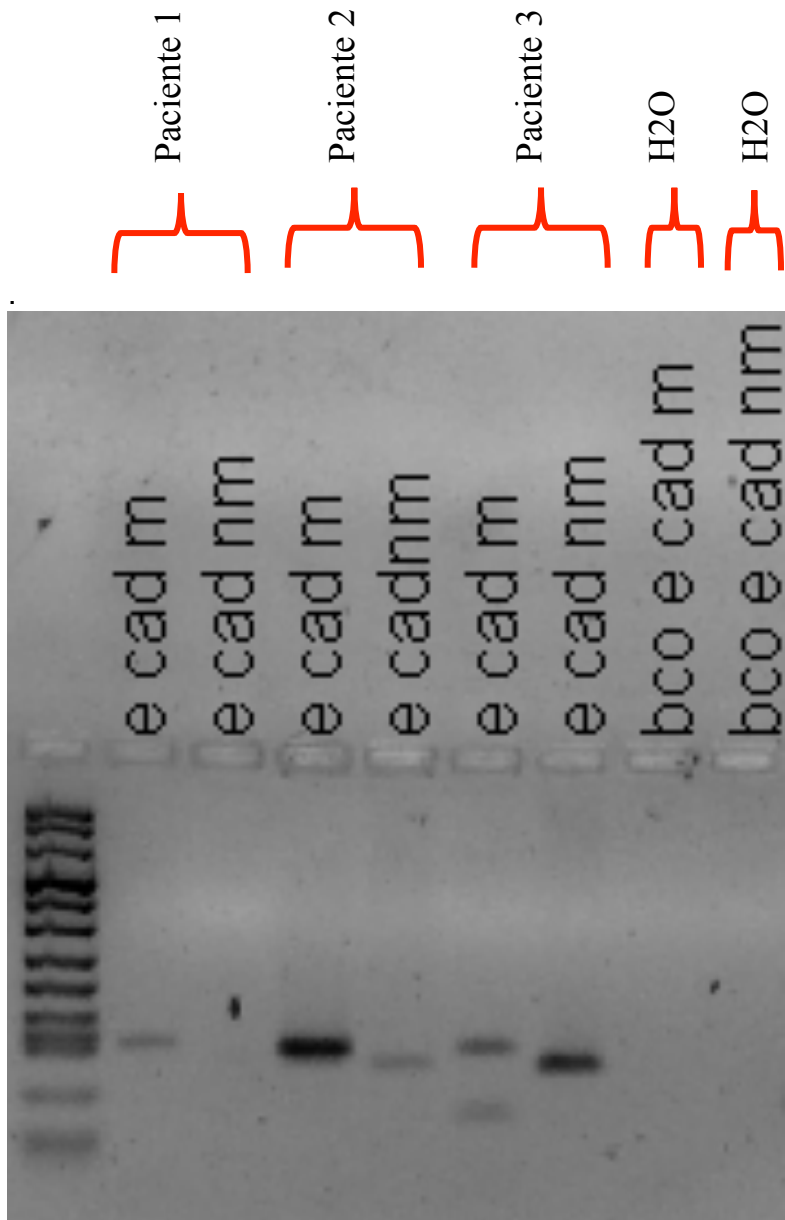


Figura 8. PCR específica de metilación *E-CADERINA* metilada y no metilada. En los pozos 2 y 3 observamos la amplificación de muestras de ADN del mismo paciente con los oligonucleótidos para la secuencia metilada y no metilada, respectivamente. En este caso no se observa banda en la secuencia no metilada. En los pozos 3 y 4 observamos la amplificación en un segundo paciente, la cual fue mayor para la secuencia metilada que para la no metilada. En los pozos 6 y 7 se muestra la amplificación en un tercer paciente, la cual fue mayor en la

secuencia no metilada que en la metilada. En los pozos 8 y 9 se muestra la ausencia de amplificación al realizar el ensayo con agua. Tm 56.3°C. 10 µl de reacción. 20 ng de ADN convertido.

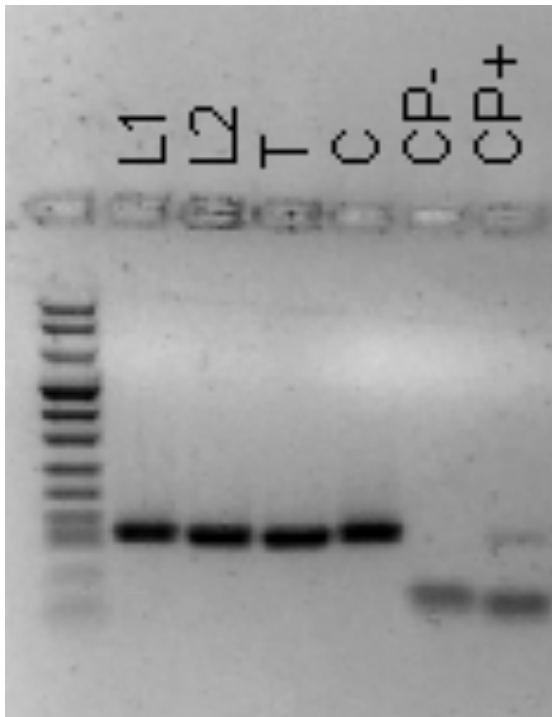


Figura 9. PCR específica de metilación *P16* no metilado. En esta figura se muestra la amplificación de 4 líneas celulares (pozos 2-4) con la secuencia no metilada de *P16*. En los 4 casos se observa amplificación. En los pozos 5 y 6 se muestran los controles positivo (CP+) y negativo (CP-). Tm 60°C. 10 µl de reacción. 20 ng de ADN convertido.

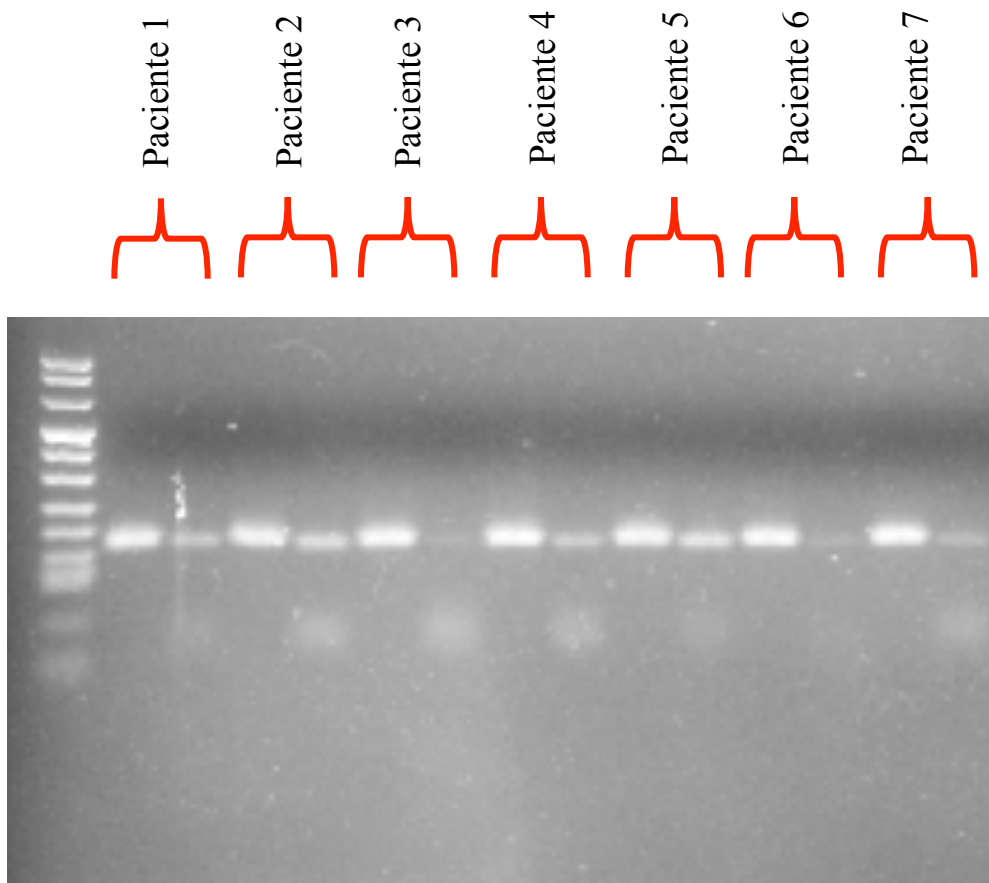


Fig. 10. PCR específica de metilación *SOCS-1* metilado y no metilado. En esta figura observamos la amplificación de muestras de ADN de los pacientes 1 a 7 con los oligonucleótidos para la secuencia metilada y no metilada, respectivamente. En los 7 casos la amplificación fue mayor para la secuencia metilada que para la no metilada. T_m 62°C. 10 μ l de reacción. 20 ng de ADN convertido.

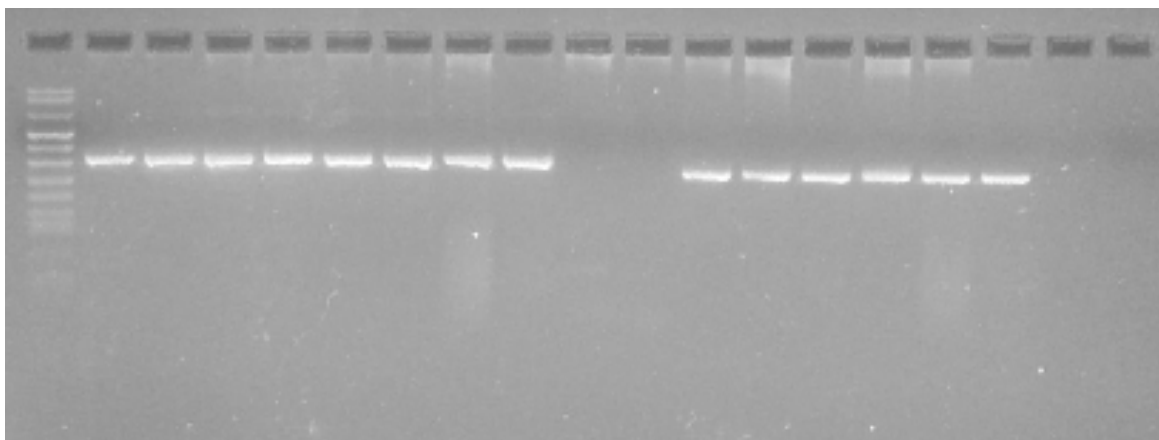


Figura 11. PCR de expresión de β actina y P73. En esta figura se muestra la amplificación del ADNc con los oligonucleótidos para β actina (pozos 2-11) y para P73 (pozos 12-19). En los pozos 10, 11, 18 y 19 se realizó la reacción con H₂O. T_m 60.2°C. 25 μ L de reacción. 3 μ L de ADNc.

Se comparó la proporción de pacientes en que los promotores de cada gen se encontraban metilados en los dos puntos de medición. Estos resultados se muestran en el cuadro 9. El comportamiento de ambas mediciones en estos dos diferentes estados de la enfermedad fueron similares excepto para el estado de metilación de *SOCS-1*. Este gen se encontró metilado en 9 pacientes (29%) durante la enfermedad activa y no metilado en remisión y en 1 paciente (3.2%) se encontró metilado en remisión pero no en enfermedad activa ($p = 0.021$). El estado de metilación de los promotores de los genes no correlacionó con su expresión ($p > 0.05$).

Asociación de variables clínicas con el estado de la metilación de genes o el estado de expresión.

Para evaluar la relevancia clínica del estado de metilación y expresión de los genes en estudio, se comparó las variables clínicas de los pacientes de acuerdo al estado de metilación y expresión. La presencia de amiloidosis se encontró en 4 pacientes (16.67%) sin expresión de *P16* durante la enfermedad activa y en ninguno de los pacientes que expresó *P16* durante la enfermedad activa ($p=0.031$). Se encontraron diferencias en el estado de metilación del promotor de *P16* y *SOCS-1* de acuerdo al grado del ISS. El porcentaje de pacientes con *P16* metilado en remisión incrementó de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad de acuerdo a este índice: ISS I, 0 pacientes (0%), ISS II, 5 pacientes (20%), ISS III, 6 pacientes (24%) ($p=0.027$). Además, el porcentaje de pacientes en que *SOCS-1* se encontró metilado en actividad con un estadio de la enfermedad avanzado, ISS III, fue 6 pacientes (16.67%). Este porcentaje duplica el observado en pacientes con un estadio de la enfermedad temprano, ISS I, 3 pacientes (8.33%; $p=0.037$). Se observó una tendencia en la probabilidad de supervivencia al momento del análisis del estudio con el estado de metilación de *P16*. *P16* no metilado, 8 pacientes (29.6%) y *P16* metilado, 2 pacientes (7.41%; $P=0.058$). La mediana de SG del grupo con *P16* metilado y no metilado fue 23 vs 35 meses, respectivamente ($0=0.04$) y la mediana de SLP fue 21 vs 36 meses, respectivamente ($p=0.003$). El estado de metilación de *SHP-1*

durante enfermedad activa se asoció con una menor probabilidad de supervivencia a los 39 meses de seguimiento, con una mediana de 52.5 vs 87.5% (p=0.025).

Cuadro 9. Porcentaje de pacientes con genes metilados y expresados en actividad y remisión.

Gen	Metilado en actividad	Metilado en remisión	Expresado en actividad	Expresado en remisión
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>P16</i>	17 (53)	12 (44)	13 (54)	8 (42)
<i>P73</i>	13 (33)	5 (16)	8 (38)	1 (6)
<i>E-cad</i>	36 (92)	29 (91)	9 (60)	10 (71)
<i>SOCS-1</i>	21 (55)	10 (32)	21 (100)	18 (100)
<i>SHP-1</i>	24 (60)	25 (71)	12 (80)	10 (71)

n, número de pacientes; *E-cad*, *E-CADERINA*; *SOCS-1*, supresor de señalización de citosinas; *SHP-1*, Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1.

VI.3 Metilación global.

El ensayo de metilación global se desarrolló en los pacientes en quienes se disponía de ADN una vez que los ensayos de MS-PCR habían concluido (15 pacientes). El 60% de los pacientes en enfermedad activa y 38% de los pacientes en remisión se encontraron con hipometilación global. El promedio del porcentaje de metilación global durante enfermedad activa y en remisión fue de 14.26 y 13.83%, respectivamente, con desviaciones estándar de 21.48 (95% CI, 2.814-25.713) y 10.72 (95% CI, 8.115-19.549), respectivamente. Hubo una tendencia

hacia una correlación positiva moderada entre ambas variables, con un coeficiente de relación de Spearman de 0.494 (P=0.051)(Fig 13). La mediana de metilación global fue 8.78% (rango 0.41-88.34%). La figura 12 muestra el porcentaje de metilación global durante la enfermedad activa y en remisión.

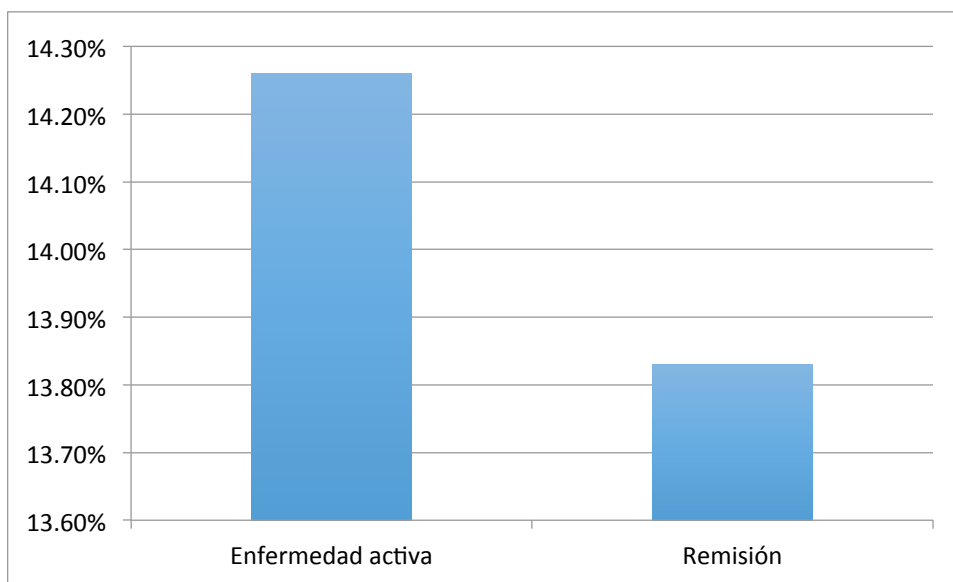


Figura 12. Porcentaje de metilación global durante enfermedad activa y en remisión.

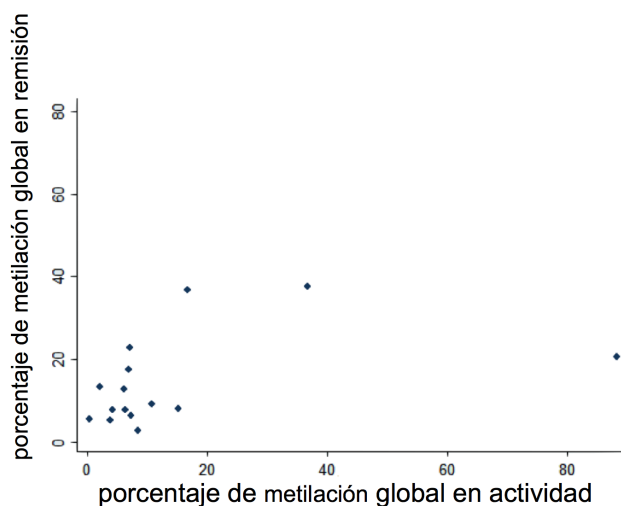


Figura 11. Correlación entre hipometilación global en actividad y en remisión. Esta gráfica muestra una tendencia hacia una correlación positiva moderada entre el porcentaje de metilación global en actividad y en remisión (coeficiente de relación de Spearman de 0.494, P=0.051).

VI.4 Supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

La mediana de supervivencia global de los pacientes fue 53 meses (95%IC, 43.55-62.44; Fig. 14). En el análisis univariado de supervivencia global, las variables que tuvieron un impacto en la supervivencia fueron la presencia hipercalcemia (HR 1.32 (95%IC 1.02-1.71) p=0.035), de lesiones líticas (HR 3.28 (95%IC 1.13-9.51) p=0.028), e hipometilación global durante la remisión (HR 3.86 (95%IC 1.11-13.37) p=0.033). En el análisis multivariado para supervivencia global, la hipometilación global durante la remisión permaneció como una variable significativa (HR 12.87 (95%IC 1.73-95.78) p=0.013). Al dividir a los pacientes de acuerdo a presencia de hipometilación global durante la remisión,

se observó un comportamiento diferente en cuanto a supervivencia global, la supervivencia global a los 100 días del grupo sin hipometilación global durante la remisión fue de 42% vs 17% para el grupo con hipometilación global en esta etapa de la enfermedad ($p=0.023$) (Fig.15). La mediana de supervivencia libre de progresión fue 19 meses (95% CI, 9.94-28.06; Fig. 16). El análisis univariado de supervivencia libre de progresión identificó hemoglobina baja (HR 0.83 (95%IC 0.72-0.97) $p=0.018$), deshidrogenasa láctica alta (HR 1.006 (95%IC 1.001-1.010) $p=0.013$), presencia de lesiones líticas (HR 4.79 (95%IC 1.37-16.75) $p=0.014$), e hipometilación global (HR 9.06 (95%IC 1.69-48.57) $p=0.010$), durante la remisión como factores relevantes. En el análisis multivariado para supervivencia libre de progresión ninguna de estas variables permaneció con valor estadístico. Cuadro 10.

Cuadro 10. Análisis univariado y multivariado de las variables asociadas con supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

Variable	Univariado			Multivariado		
	HR	IC 95%	Valor P-	HR	95% CI	Valor P-
	Supervivencia global					
Hipercalcemia	1.322	1.020-1.715	0.035 ^a	0.952	0.593-1.528	0.838
Lesiones líticas	3.285	1.135-9.512	0.028 ^a	5.992	0.837-42.890	0.075
Hipometilación global en remisión	3.866	1.117-13.374	0.033 ^a	12.873	1.730-95.781	0.013 ^a
	Supervivencia libre de progresión					
Hemoglobina	0.837	0.722-0.970	0.018 ^a	0.995	0.563-1.756	0.985
DHL ^b	1.006	1.001-1.010	0.013 ^a	1.017	0.961-1.077	0.557
Lesiones líticas	4.795	1.373-16.753	0.014 ^a	0.667	0.044-9.999	0.769
Hipometilación global en remisión	9.066	1.692-48.572	0.010 ^a	7.258	0.255-206.821	0.246

^aP<0.05; HR, hazards ratio; IC, intervalo de confianza.

^bDHL; deshidrogenasa láctica.

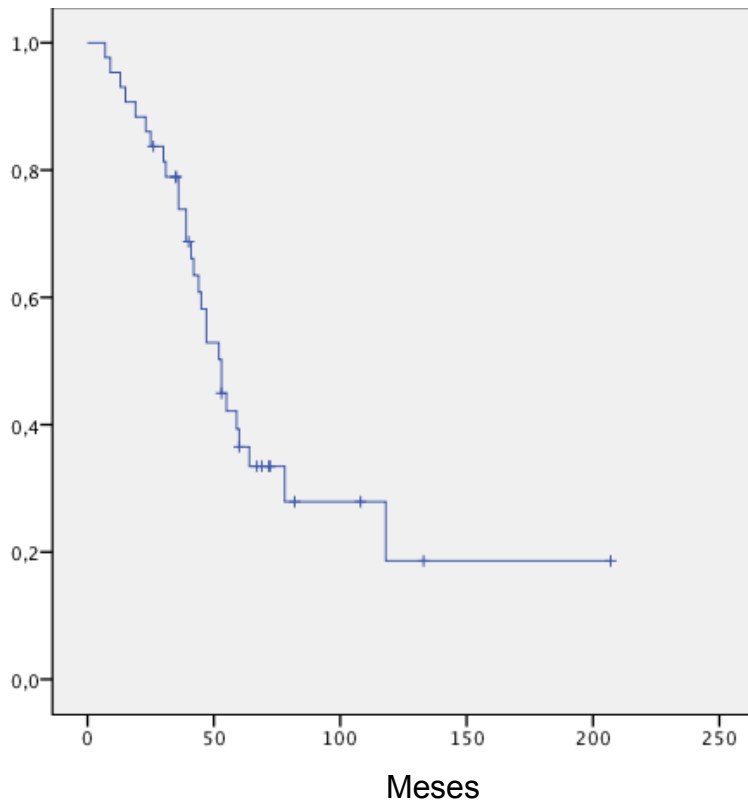


Figura 14. Curva de supervivencia global de todos los pacientes. La mediana de supervivencia global fue de 53 meses (95%IC, 43.55-62.44).

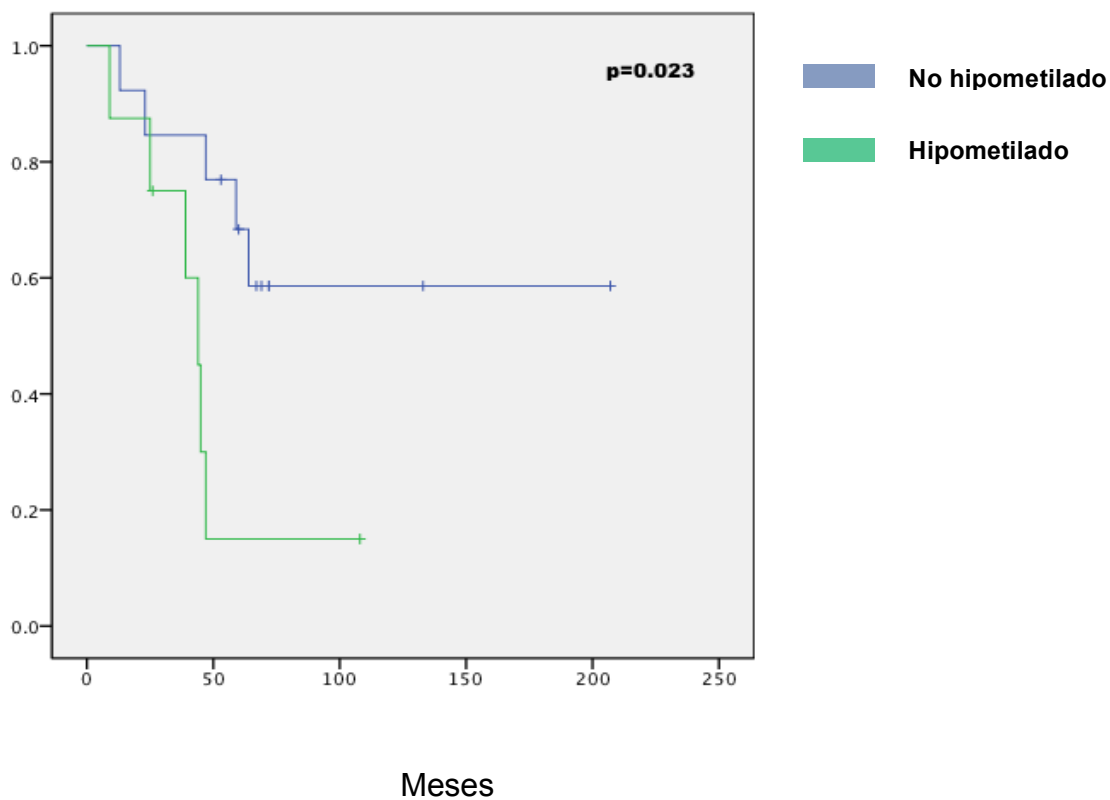


Figura 15. Curva de supervivencia global de acuerdo al estado de metilación global en remisión. Esta gráfica muestra que los pacientes que tenían hipometilación global durante la remisión fallecieron más temprano que los pacientes que no la tenían. Esta diferencia fue significativa.

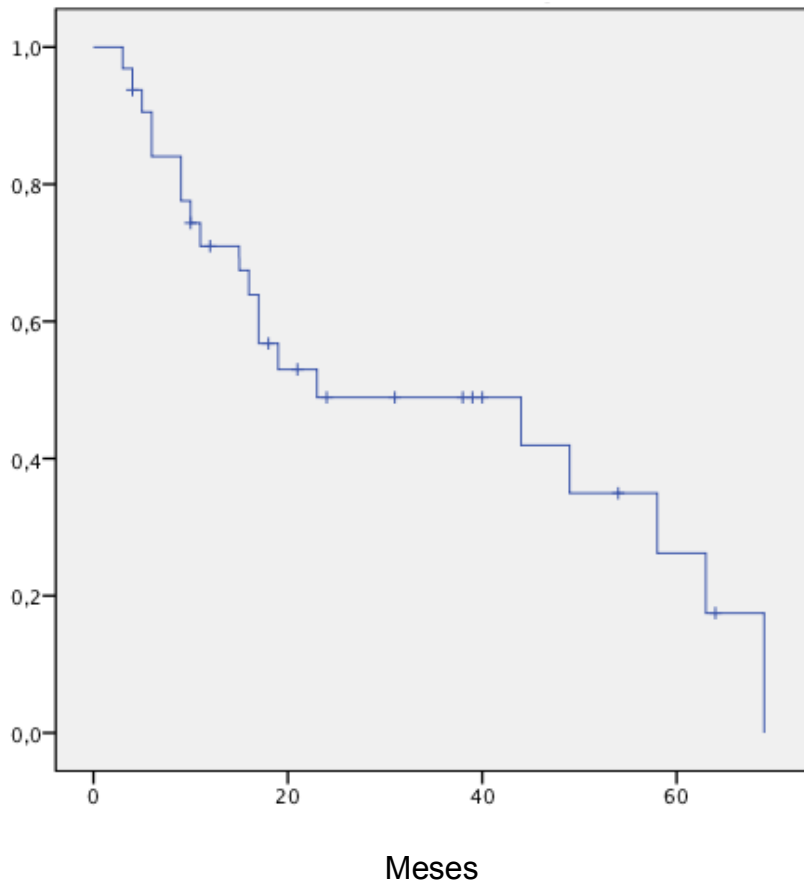


Figura 16. Curva de supervivencia libre de progresión. La mediana de supervivencia libre de progresión fue 19 meses (95% CI, 9.94-28.06).

VII. DISCUSIÓN

Con base en una búsqueda dirigida de la literatura médica publicada, este estudio es la primera cohorte de pacientes con MM en que se estudia metilación regional y global durante dos fases de la enfermedad: actividad y remisión. Los resultados indican que el estado de metilación de los promotores de los genes estudiados no tuvieron un impacto sobre la expresión de estos genes. El ensayo de MS-PCR utilizado es capaz de analizar dos sitios CpG en el extremo 3' de cada uno de los dos oligonucleótidos, por lo que se corre el riesgo de que se analicen regiones no cruciales del promotor esenciales para la transcripción (Deng 1999). La metilación de diferentes regiones en un promotor tiene potenciales diferentes para suprimir la actividad del promotor. Por lo tanto, algunos sitios pueden ser más informativos para predecir cambios en la expresión mediados por interacciones funcionales directas (Deng 2001). Adicionalmente fue un método cualitativo y observador dependiente. Otra posible explicación es que la PCR específica de metilación analiza las 5-metilcitosinas, que se comportan como metiladas, sin embargo se sabe que éstas pueden convertirse en 5-hidroximetil-citosina a través de la enzima TET2, lo que deriva en hipometilación.

En este estudio sólo se abordó la metilación de las islas CpG, que no es el único factor que impacta en la transcripción de genes. Otros factores que intervienen en la transcripción de los genes son:

1) Las modificaciones postraduccionales de las histonas, que pueden tener un papel activador o represor de la transcripción, como la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y sumolación. Estas modificaciones postraduccionales pueden a) cambiar la estructura de la cromatina, b) impedir la unión de factores asociados a la cromatina y c) formar un sitio específico de unión a factores asociados a la cromatina.

2) Los microRNAs que tienen una función negativa de la expresión génica mediante la represión de la traducción o la degradación del RNAm.

El estado de metilación de *SOCS-1* fue mayor durante la enfermedad activa que durante la remisión (29 vs 3.2%). Se observó una mayor proporción de *SOCS-1* metilado en pacientes en que al diagnóstico se encontraron con enfermedad más avanzada (ISS III). En contraste, Depil et al. (Depil 2003), que estudiaron el estado de metilación de *SOCS-1* en 51 pacientes con MM vírgenes a tratamiento, identificaron hipermetilación de *SOCS-1* en 74.5% de los pacientes, sin diferencias de acuerdo al estadio clínico. *SOCS-1* posee la capacidad de suprimir la señalización de diferentes citosinas incluyendo interleucina-6, que es un factor de crecimiento esencial para la diferenciación a célula plasmática y la supervivencia de las células del MM (Roman-Gomez 2004). Se ha demostrado la asociación entre *SOCS-1* hipermetilado y la patogénesis de diferentes tumores, incluyendo leucemia granulocítica crónica, melanoma y cáncer gástrico (Li 2004, Qu 2003, Mateos 2001). Un reporte

previo de Galm (Galm 2003), demostró que en pacientes con MM con enfermedad activa, SOCS-1 se encontraba hipermetilado en 62%. En contraste, esta frecuencia se encontró mucho más baja en linfoma (3.2%). Adicionalmente, no se observó metilación de SOCS-1 en células mononucleares de sangre periférica o células de la médula ósea no malignas. El estudio actual identificó que la hipermetilación de P16 durante la remisión fue más frecuente en pacientes con enfermedad avanzada (ISS más alto) y mostró una tendencia hacia mayor mortalidad de los pacientes al momento del corte del estudio. Ambos hallazgos sugieren un comportamiento más agresivo de la enfermedad en pacientes con *P16* hipermetilado. P16, un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 4, regula negativamente la proliferación celular, lo que sugiere un comportamiento de supresión tumoral. Un estudio previo reportado por Mateos (Mateos 2002), abordó el estado de metilación de P16 en una cohorte de pacientes con MM y encontró que la hipermetilación de P16 se correlacionó con un factores de pronóstico deletéreos como β 2-microglobulina alta, proteína-C reactiva alta, estadio avanzado de acuerdo a la clasificación de Durie-Salmon y un alto índice de de proliferación de células plasmáticas. El mismo estudio demostró que ninguno de los pacientes en estadio I Durie-Salmon tenía *P16* metilado. Este estudio también sugirió que la hipermetilación de *P16* tenía un efecto negativo sobre SG y SLP. Sin embargo, cuando se agregó al análisis multivariado el índice de proliferación de células

plasmáticas, los desenlaces de SG y SLP perdieron su valor predictivo. Otro estudio desarrollado por Guillermin (Guillermin 2003), reportó asociación entre *P16* metilado y SG ($P=0.035$; riesgo relativo 2.86, 1.076-7.60) y $\beta 2$ -microglobulina alta ($P=0.003$; riesgo relativo, 1.18, 1.08-1.3). Por el contrario, Gonzalez-Paz y colaboradores (Gonzalez-Paz 2007), no identificaron ninguna diferencia biológica o clínica en pacientes con MM de acuerdo al estado de metilación de *P16* a excepción de una mayor frecuencia de delección de *P17* en el grupo de *P16* hipermetilado (65% vs 35%, $P=0.003$) y una tendencia en SLP a favor del grupo no metilado (mediana 30.2 vs 27.4 meses, $P=0.71$).

El estudio de Ribas y colaboradores (Ribas 2005) descartó una correlación entre metilación de *P16* y factores de pronóstico. La hipermetilación de *P16* se ha asociado con progresión de la enfermedad, ya que la frecuencia de este fenómeno incrementa conforme la enfermedad progresa a través de sus diferentes estados de su historia natural, que inicia en un 0% en la fase preclínica o GMSI, 0% en el MM asintomático, 41.8% en MM sintomático y 80% en leucemia de células plasmáticas (González-Paz 2007, Mateos 2001, González 2000, Krämer 2002). En el estudio actual, la probabilidad de muerte antes del momento del análisis fue 56.2% (7 pacientes) si *SHP-1* no se encontraba metilado durante la enfermedad activa, mientras que 12% (5 pacientes) de los pacientes permanecían vivos si *SHP-1* se encontraba metilado en la misma etapa de la enfermedad ($P=0.025$). *SHP-1* codifica a un

miembro de la familia de proteínas tirosin fosfatasas (PTF) (Chim 2004). Las PTF se oponen a los efectos de las proteínas tirosin cinasas y mantienen la homeostasis de la fosforilación de las tirosinas. Se ha identificado que las PTF desfosforilan y por lo tanto inactivan al transductor de señales Janus cinasas y a la señalización del activador de transcripción 3 (STAT3). Regulan una variedad de procesos celulares que incluyen crecimiento y diferenciación celular, transformación oncogénica y el ciclo mitótico. *SHP-1* se expresa normalmente en células linfoides normales, pero no se expresa en algunas enfermedades hematológicas malignas a través de silenciamiento transcripcional (Esposito 2011, Valentino 2006). Se ha demostrado que la pérdida de *SHP-1* contribuye directamente con la activación constitutiva de STAT3 en MM, leucemia mieloide crónica y linfoma no hodgkin anaplásico de células grandes alk-positivo.

Un estudio reciente abordó la inactivación epigenética del clúster supresor de tumor miRmiR-194-2-192 y miR-203 que se había implicado en la patogénesis del MM por otros autores (Pichiorri, 2010, Bueno, 2008). En médula ósea enriquecida con CD138 de pacientes con MM y donadores sanos se identificó hipermetilación adjacente a miR-152,-10b-5p y miR-34c-3p. Al tratar las células de MM con 5-aza-2'-deoxicitidina se identificó una regulación a la alta de miRNAs. Al realizar experimentos de validación demostraron que miR-152, MiR-10b-5p y miR-34c-3p estaban altamente metilados, lo que podría explicar

al menos en parte su baja expresión en MM. Finalmente demostraron que estos 3 miRNAs actúan como supresores de tumores al modular algunos genes de MM (Zhang, 2014).

En el estudio actual la mediana de SG fue 53 meses (95% IC, 43.5-62.4). Después del análisis univariado para SG, la hipercalcemia, la presencia de lesiones líticas y la hipometilación global durante la remisión tuvieron un impacto negativo. La presencia de lesiones líticas en hueso reflejan una enfermedad más avanzada al momento del diagnóstico. La hipometilación global durante la remisión permaneció como un factor predictor negativo sobre SG en el análisis multivariado. Esto lleva a reflexionar si los pacientes con hipometilación global durante la remisión deberían de recibir más tratamiento que los pacientes sin hipometilación global. El ensayo que se utilizó es una prueba de ELISA disponible comercialmente, no tiene un costo elevado y es fácil de realizar, por lo tanto es factible realizar ensayos prospectivos que midan los niveles de metilación. Fernández de Larrea (Fernández de Larrea 2013), reportó el impacto de la metilación global en pacientes con MM en recaída tratados con bortezomib. El estudio demostró que los pacientes con más del 3.95% de metilación global del ADN lograron una mejoría en SG en comparación con niveles más bajos de hipometilación (mediana; 30 vs 15 meses, $P=0.004$). Sive (Sive 2015) realizó un estudio en células de 16 pacientes con mieloma múltiple y encontró que el grupo con hipometilación

global relativa tenía un comportamiento clínico diferente y adverso al compararlo con el otro grupo. La supervivencia libre de progresión fue de 7.2 vs 24.4 meses y la supervivencia global de 11.9 vs 61.7 meses. No se demostró significancia estadística, sin embargo esto pudiera deberse al número limitado de pacientes.

Finalmente, es importante enfatizar que la SG y SLP de los pacientes en el estudio actual fue menor que lo esperado de acuerdo a los reportes de otros estudios. En esta cohorte, sólo un 16% de los pacientes pudieron recibir bortezomib y ninguno recibió lenalidomida, ya que estos agentes son inaccesibles para la gran mayoría de los pacientes debido a su alto costo.

Consideramos que el número limitado de pacientes en que se realizó el ensayo de metilación global es una debilidad de este estudio.

VIII. CONCLUSIONES

La expresión de los genes *P16*, *SOCS-1*, *SHP1*, *E-caderina* y *p73* es independiente del estado de metilación de los los promotores que se analizaron en este estudio.

La metilación en las posiciones de los CpGs -473 a -347 del promotor de *p16*, de -693 a -554 del promotor de *SOCS-1* y de +221 a +333 del promotor de *SHP-1* se asocian con variables clínicas que tienen un impacto negativo sobre el pronóstico de la enfermedad, junto con la hipometilación global durante la remisión. En este estudio se determinó el estado de metilación regional y global en el mismo paciente en diferentes momentos de la enfermedad y se compararon: actividad vs inactividad, sin embargo el tratamiento de la enfermedad fue heterogéneo y el número de pacientes limitado. La reversibilidad de las marcas epigenéticas mediante agentes terapéuticos podría restablecer el equilibrio epigenético y favorecer el control de la enfermedad. El conocer el comportamiento de estos cambios epigenéticos en diferentes fases de la enfermedad es de suma importancia para poder delimitar el tiempo en que resultarían de utilidad. Se requiere de un estudio con un número mayor de pacientes que sean tratados de forma homogénea para responder a estas interrogantes.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amodio N, D'Aquila P, Passsarino G et al. Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation. *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21(1):91-101.

Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Cance Res* 1999;59:4546-4550.

Avet-Loiseau H, Facon T, Growbois B et al. Intergroupe Francophone du Myeloma. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185-91

Avet-Loiseau H, Li JY, Godon C, et al. P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;106:717-9.

Baylin S. DNA methylation and pigenetic mechanisms of carcinogenesis. *Dev Biol* 2001;106:143-160.

Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6333-8.

Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-2p3 enhances ABL1 and BDR-ABL1 oncogene expression. *Cancer cell* 2008;13:496-506.

Chang H, Qi C, Yi QL et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005;105:358-60.

Chang WJ, Kumar S, Vanwier S, Ahmann G, Price-Troska T, Henderson K et al. Molecular dissection of hyper-diploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* 2007; 67: 2982-9.

Checkhun VF. *Cancer Epigenetics. Exp Oncol* 2008;30:170.

Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998;91:4457-63.

Chesi M, Nardini E, Brents LA et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997;16:260-64.

Chim C, Fung T, Cheung W, Liang R, Kwong Y, SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* 103:4630,2004.

Conté G, Figueroa G, Lois V, Cabrera M, León A, García H, Rojas H. Mieloma múltiple en Chile. Características clínicas y sobrevida. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 1111-1117.

De Raeve. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol* (2005) 20: 1227-1250

Deculve GP, Rastegar M, Davier JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 2009;219:243-250.

Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS and Kim YS: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 59: 2029-2033, 1999.

Deng G, Chen A, Pong E and Kim YS: Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 20: 7120-7127, 2001.

Depil S, Saudemont A, Quesnel B: SOCS-1 gene methylation is frequent but does not appear to have prognostic value in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 17: 1678-1679, 2003.

Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 2014;4:e207.doi:10.1038/bcj.2014.29.

Dispenzieri A, Lacy M, Kumar S. Multiple myeloma. *Wolters Kluwer Health Adis (ESP) Wintrobe's Clinical Hematology*, 2013;2046-2097.

Durie B, Harousseau J, Miguel J, Bladé J, Barlogie, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-1473.

Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1409-1420.

Esposito N, Colavita I, Quintarelli C, Rodeo A, AL Peluso, Luciano L, Picardi M, Vecchio L, Buonomo T, Hughes T. SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome–positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118:3634-3644.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8:286-298.

Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta-2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001;97:1566-1571.

Fernández de Larrea C, Martín-Antonio B, Cibeira MT, Navarro A, Tovar N, Díaz T, Rosiñol L, Monzó M, Urbano-Ispizua A and Bladé J: Impact of global and gene-specific DNA methylation pattern in relapsed multiple myeloma patients treated with bortezomib. *Leuk Res* 37: 641-646, 2013.

Fonseca R, Harrington D, Oken M et al. Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities ($\Delta 13$) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study. *Cancer Res* 2002;62:715-720.

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and Cytogenetics of multiple myeloma: A Workshop Report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546-58.

Fonseca R, Harrington D, Oken M et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32) represents a uniquely defined biological subset of patients. *Blood* 2002;99:3735-41.

Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210-2221.

Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R and Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 101: 2784-2788, 2003.

Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):162-74. Review.

Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106:2837-40.

Gonzalez M, Mateos MV, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Lopez-Perez R, Chillon MC et al. *De novo* methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis. *Leukemia* 2000;14:183-187.

Gonzalez-Paz N, Chng WJ, McClure RF, Blood E, Oken MM, Van Ness B, James CD, Kurtin PJ, Henderson K, Ahmann GJ, et al.: Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood* 109: 1228-1232, 2007.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-3420.

Gronbaek K, Holther C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007;115:1039-1059.

Guillerm G, Depil S, Wolowiec D, Quesnel B. Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma. *Haematologica* 88: 476-478, 2003.

Harnicarová Horáková A, Galiová G, Legartová S, et al. Chromocentre integrity and epigenetic marks. *J Struct Biol* 2010 ;169 :124-133.

Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:824-842.

Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, et al. Observational study of multiple myeloma in Latin America. *Ann Hematol* 2017 ; 96(1):65-72.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001;293:1068-1070.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428.

Kang HC; Kim IJ, Park JK, et al. Promoter hypermethylation and silencing of CHFR mitotic stress checkpoint gene in human gastric cancers. *Oncol Rep.* 2004;12:129-133.

Kramer A, Schultheis B, Bergmann J, Willer A, Hegenbart U, Ho AD et al. Alterations of the cyclin D1/pRB/p16(INK4A) pathway in multiple myeloma. *Leukemia* 2002;16:1844-1851.

Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2:175-87.

Kyle RA, Rajkumar SV. Plasma cell disorders. In: Goldman L, Ausiello DA, eds. *Cecil textbook of medicine*. 22nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004:1184-95.

Kyle RA and Rajkumar SV: Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351: 1860-1873, 2004.

Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007 ;356 :2582-2590.

Li Z, Metze D, Nashan D, Müller-Tidow C, Serve HL, Poremba C, Luger TA and Böhm M: Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 123: 737-745, 2004.

Mateos MV, Garcia-Sanz R, López-Pérez R, Balanzategui A, González MI, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández J, Caballero MD, González M, et al.: p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol J* 2: 146-149, 2001.

Mateos MV, García-Sanz R, López-Pérez R, Moro MJ, Ocio E, Hernández J, Megido M, Caballero MD, Fernández-Calvo J, Báez A, et al.: Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol* 118: 1034-1040, 2002.

Mateos MV, González-Calle V: Smoldering multiple myeloma: who and when to treat. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017. Doi: 10.1016/j.clml.2017.06.022.

Morgan GJ, Walker BA, Davies FE: The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*; 2012;12(5):335-348.

Mungall AJ. Meeting review: Epigenetics in Development and Disease. *Comp Funct Genomics*. 2002;3:277-281.

Munshi NC, Tricot G, Barlogie B. Plasma cell neoplasms In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice on Oncology*. 6th ed. Philadelphia, PA. Lippincott Williams and Wilkins, 2001:2465-2499.

Muñoz-Pinedo C, González-Suárez E, Portela A, Gentilella A, Esteller M. Exploiting tumor vulnerabilities: epigenetics, cancer metabolism and the mTOR pathway in the era of personalized medicine. *Cancer Res* 2013;73:4185-4189.

Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD et al. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91:3366-3371.

Pichiorri F, Suh SS, Rocci A et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer cell* 2010;18:367-381.

Qu Y, Dang S and Hou P: Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta* 424: 53-65, 2013.

Ribas C, Colleoni GW, Felix RS, Regis Silva MR, Caballero OL, Brait M, Bordin JO. p16 gene methylation lacks correlation with angiogenesis and prognosis in multiple myeloma. *Cancer Lett* 2005; 26: 247-254.

Richelda R, Ronchetti D, Baldini L et al. A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 1997;90:4062-70.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Cervantes F, Barrios M, Colomer D, Heininguer A and Torres A: The suppressor of cytokine signaling-1 is constitutively expressed in chronic myeloid leukemia and correlates with poor cytogenetic response to interferon-alpha. *Haematologica* 2004;89: 42-48.

Secretaría de Salud y Asistencia. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio/Mortalidad/morbilidad/1999. Dirección General de Epidemiología.

Seidl S, Kaufmann H, and Drach J . New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* Vol 4 September 2003.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old changes. *Genes Dev* 2010;24:1967-2000.

Sive J, Feber A, Smith D, Quinn J, Beck S, Young K. Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis. *British Journal of Haematology* 2015;172:473-475.

Tagliaferri P, Rossi M, Di Martino MT, et al. Promises and challenges of Micro-RNA-based treatment of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12:838-846.

Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implications in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006;71:713-721.

Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer Statistics: 1995. *CA Cancer J Clin* 1995;45:8-13.

Zhang W, Wang Y, Zhang Y et al. Global epigenetic regulation of MicroRNAs in Multiple Myeloma. *PLoS One* 2014;9(10):e110973.

Zhao H, Chen T. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *Journal of Human Genetics* 2013;58:421-427.