



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA PERMETRINA EN LA GENERACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y
EPIGENÉTICAS ASOCIADAS A LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA), Y EN LA
DIFERENCIACIÓN DEL LINAJE LINFOIDE B**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. NAVARRETE MENESES MARÍA DEL PILAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., OCTUBRE, 2019.



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.

OFICIO CPCB/1000/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

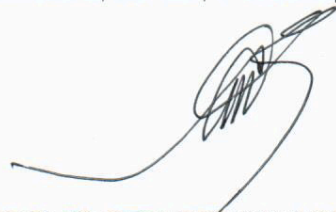
M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 27 de mayo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **NAVARRETE MENESES MARÍA DEL PILAR** con número de cuenta **301567822**, con la tesis titulada **“EFECTO DE LA PERMETRINA EN LA GENERACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS ASOCIADAS A LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA), Y EN LA DIFERENCIACIÓN DEL LINAJE LINFOIDE B”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
Secretario: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DRA. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ
Suplente: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de septiembre de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

A los apoyos económicos recibidos que permitieron la realización de este trabajo:

**Beca de Doctorado CONACYT (385279)
APOYOS PAEP 2015, 2017
Proyecto CONACYT CB-2012-01-183467
Fundación Miguel Alemán 2012
Fondos Federales del Instituto Nacional
de Pediatría 2013 Proyecto INP 001/13**

A los miembros del Comité Tutor por todo su apoyo y sus aportaciones:

**Dra. Silvia Patricia Pérez Vera
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Dr. Edmundo Bonilla González**

MUCHAS GRACIAS:

**Laboratorio de Genética y Cáncer del INP.
Departamento de Investigación en Genética y Cáncer del INP.
Personal del Bioterio del INP.**

**Dra. Patricia Pérez Vera, por su guía, sus enseñanzas,
su apoyo y por confiar en mi**

Dr. Ezequiel Fuentes, por sus aportaciones y asesoría.

Dra. Antonieta Chávez, por su apoyo para la realización de experimentos.

Dra Sandra Gómez, por su asesoría y consejos

Dr Emilio Córdova, por sus aportaciones, sus consejos y asesoría

**Por su apoyo, aportaciones, colaboración, asesoría,
y sobre todo por su amistad y cariño:**

Biól. Verónica Ulloa Avilés

Biól. Roberto Cruz Alcívar

Dra. Consuelo Salas Labadía

Dra. Dafné Moreno Lorenzana

Dra. Rocío Juárez Velázquez

Dra. Adriana Reyes León

**A los voluntarios sanos que aceptaron participar en el estudio como donadores de
muestras, gracias por su fundamental ayuda.**

**Dedicado con infinito amor y agradecimiento a mis padres
LAURA MENESES y TOMÁS NAVARRETE**

GRACIAS Diana y Sergio por su enorme apoyo y su invaluable compañía durante estos años. Gracias a toda mi familia Navarrete y Meneses

Recordando con todo mi amor, a quienes me vieron iniciar este proyecto y desde algún lugar del cielo me verán concluirlo.

Los amo eternamente.

A mi madre, LAURA MENESES

A mi abuela, SARA SOMOHANO

A mi abuelo, BERNARDO MENESES

A mi tío, LUIS ANTONIO MENESES

A mi tía, LOURDES NAVARRETE

ÍNDICE	PÁG
Lista de Tablas y Figuras	
Lista de Abreviaturas	
i. RESUMEN	1
ii. ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Insecticidas piretroides	5
1.2 Permetrina	6
1.3 Permetrina y cáncer hematopoyético	9
1.4 Leucemia Linfoblástica Aguda	10
1.5 Alteraciones genéticas en Leucemia Linfoblástica Aguda	11
1.6 Alteraciones epigenéticas y en la expresión génica en Leucemia Linfoblástica Aguda	13
1.7 Alteración en la diferenciación linfoide B en Leucemia Linfoblástica Aguda	17
1.8 Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda B pediátrica	20
1.9 Leucemia Linfoblástica Aguda pediátrica y plaguicidas piretroides	21
1.10 Efectos celulares y moleculares de los piretroides potencialmente asociados a carcinogénesis	23
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 Experimentos para evaluar el efecto de la permetrina <i>in vitro</i>	29
5.1.1 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a permetrina en la generación de rearrreglos génicos por citogenética y biología molecular	29
5.1.1.1 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a permetrina en la generación de alteraciones genéticas: Análisis de los genes <i>KMT2A</i> , <i>IGH</i> , <i>ETV6-RUNX1</i> y de aneuploidía mediante citogenética	29
5.1.1.1.1 Cultivo celular y tratamiento	29
5.1.1.1.2 Viabilidad Celular	30
5.1.1.1.3 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para el análisis de los genes y de aneuploidía.	30
5.1.1.1.4 Análisis estadístico	32
5.1.1.2 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a permetrina en la generación de fusiones génicas: Análisis de <i>KMT2A-AFF1</i> , <i>ETV6-RUNX1</i> e <i>IGH-BCL2</i> mediante técnicas moleculares	32
5.1.2.1 Cultivo y tratamiento de células de la línea K562	33
5.1.2.2 PCR anidada para detección de fusiones génicas	33
5.1.2 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a permetrina en la generación de cambios en la expresión y metilación génica	35
5.1.2.1 Cultivo celular de PBMCs y BMNCs y tratamiento	35
5.1.2.2 Extracción de ácidos nucleicos y microarreglos	35
5.1.2.3 Análisis de datos	36
5.1.2.4 Validación por qPCR	37
5.2 Experimentos para evaluar el efecto de la permetrina <i>in vivo</i>	38
5.2.1. Obtención de ratonas gestantes y tratamiento con permetrina durante la gestación.	38

5.2.2. Obtención de médula ósea de las crías expuestas	39
5.2.3 Establecimiento de líneas celulares de linfocitos proB y ensayo de diferenciación	39
5.2.4 Evaluación de daño al DNA	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Evaluación del efecto de la permetrina <i>in vitro</i>	41
6.1.1 Efecto de la permetrina en la generación de alteraciones genéticas	41
6.1.1.1 Evaluación del efecto de la permetrina en la generación de aneuploidía y daño en los genes <i>KMT2A</i> , <i>IGH</i> y <i>ETV6-RUNX1</i> por citogenética	41
6.1.1.1.1 Efecto de la exposición aguda a insecticidas	41
6.1.1.1.2 Efecto de la exposición crónica a insecticidas	49
6.1.1.2 Evaluación del efecto de la permetrina en la generación de fusiones oncogénicas por técnicas moleculares.	57
6.1.2 Efecto de los insecticidas en la expresión y metilación génica	59
6.1.2.1 Efecto en la expresión génica	59
6.1.2.2 Efecto en la metilación génica	82
6.2 Efecto de la permetrina <i>in vivo</i>	84
6.2.1. Características de las crías expuestas <i>in utero</i> a permetrina	85
6.2.2. Efecto <i>in utero</i> de la permetrina en el potencial de diferenciación de linaje linfoide B	87
6.2.3 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a permetrina en el daño al DNA de linfocitos proB murinos	91
6.2.4 Efecto de la exposición <i>in utero</i> a permetrina en el daño al DNA en médula ósea y linfocitos B	92
7. DISCUSIÓN	94
7.1 Efecto de la permetrina en la generación de alteraciones genéticas <i>in vitro</i>	94
7.2 Efecto de la exposición a insecticidas en la expresión y metilación génicas.	101
7.2.1 Represión de genes en BMMCs por efecto de malatión	103
7.2.2 Sobreexpresión de genes en BMMCs por efecto del malatión	104
7.2.3 Desregulación de la expresión de genes en PBMCs por efecto del malatión	106
7.2.4 Represión de la expresión de genes en BMMCs por efecto de la exposición a permetrina	108
7.2.5 Sobreexpresión de genes en BMMCs por efecto de la exposición a permetrina	109
7.2.6 Represión de la expresión de genes en PBMCs por efecto de la exposición a permetrina	110
7.2.7 Sobreexpresión de genes en PBMCs por efecto de la exposición a permetrina	112
7.2.8 Alteración en la metilación génica en BMMCs por efecto de la exposición a insecticidas	113
7.3 Efecto <i>in vivo</i> de la permetrina en el daño al DNA y en la diferenciación de linfocitos B	114
7.4 Posibles mecanismos de acción de la permetrina en la inducción de daño genotóxico, en la generación de cambios en la expresión y metilación génica y en la disrupción del potencial de diferenciación linfoide B	117
8. CONCLUSIONES	126
9. LITERATURA CITADA	129
ANEXO 1 Carta de Consentimiento Informado	144
ANEXO 2 Criterios del análisis de la FISH	145
ANEXO 3 Secuencia de cebadores utilizados para la detección de fusiones por RT PCR anidado	147
ANEXO 4 Secuencia de cebadores utilizados para la detección de la fusión <i>IGH-BCL2</i> por PCR anidado	148
ANEXO 5 Secuencia de cebadores utilizados para el análisis de expresión génica por qPCR	149
ANEXO 6 Resultados de la prueba de sobre representación del total de genes con expresión alterada en células expuestas a malatión	150

ANEXO 7 Resultados de la prueba de sobre representación del total de genes con expresión alterada en células expuestas a permetrina	162
ANEXO 8 Resultados del análisis con Genemania	169
ANEXO 9 Lista de genes en los que se realizó el análisis de metilación	175
APÉNDICE 1: Artículo de requisito. Navarrete-Meneses, et al. Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations in vitro. Toxicol In Vitro. 2017. 44:17-26	176
APÉNDICE 2: Navarrete-Meneses, et al. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017. 74(4):243-264	186
APÉNDICE 3: Navarrete-Meneses, et al. Low concentrations of permethrin and malathion induce numerical and structural abnormalities in KMT2A and IGH genes in vitro. J Appl Toxicol. 2018. 38(9):1262-1270	208
APÉNDICE 4: Navarrete-Meneses, et al. Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence. Rev Environ Health. 2019. 34 (2):197-210	217

TABLAS Y FIGURAS	PÁG
Figura 1 Fórmula estructural de la permetrina.	6
Figura 2 Procesos celulares y genes comúnmente afectados en LLA.	16
Figura 3 Funciones moleculares, vías y procesos celulares comúnmente afectados por alteraciones epigenéticas en LLA.	16
Figura 4 Desarrollo de linfocitos B en ratón	19
Figura 5 Diseño de sondas de hibridación <i>in situ</i> utilizadas	32
Figura 6 Efecto de altas concentraciones de permetrina y malatión en el gen <i>IGH</i>	44
Figura 7 Daño en el gen <i>KMT2A</i> por efecto de la exposición a altas concentraciones de insecticidas	45
Figura 8 Frecuencia de daño en el gen <i>KMT2A</i> por efecto de exposición a altas concentraciones de insecticidas	46
Figura 9 Efecto de altas concentraciones de insecticidas en los genes <i>ETV6</i> y <i>RUNX1</i>	47
Figura 10 Análisis de aneuploidía inducida por la exposición a alta concentración de insecticidas	48
Figura 11 Índice Mitótico de PBMCs expuestas a concentraciones bajas de insecticidas.	51
Figura 12 Daño en el gen <i>IGH</i> por efecto de bajas concentraciones de insecticidas	52
Figura 13 Efecto de bajas concentraciones de insecticidas en el gen <i>IGH</i>	53
Figura 14 Daño en el gen <i>KMT2A</i> por efecto de bajas concentraciones de insecticida.	54
Figura 15 Frecuencia de daño en el gen <i>KMT2A</i> por exposición a concentraciones bajas de insecticidas	55
Figura 16 Metafasas con alteraciones en <i>KMT2A</i> e <i>IGH</i> por efecto de bajas concentraciones de insecticidas	56
Figura 17 Detección de fusiones oncogénicas inducidas por la exposición a insecticidas	58
Figura 18 Distribución de genes con sobreexpresión y con baja expresión en cada microarreglo	60
Figura 19 Mapa de calor de genes representativos	61
Tabla 1 Resumen del análisis de sobre representación con el total de genes alterados en BMMCs expuestas a malatión	62
Tabla 2 Resumen del análisis de sobre representación con el total de genes alterados en PBMCs expuestas a malatión	63
Tabla 3 Resumen del análisis de sobre representación con el total de genes alterados en BMMCs expuestas a permetrina	64
Tabla 4 Resumen del análisis de sobre representación con el total de genes alterados en PBMCs expuestas a permetrina	65
Figura 20 Funciones celulares alteradas en BMMCs y PMBCs expuestos a malatión derivado del análisis de sobre representación	66
Figura 21 Funciones celulares alteradas en BMMCs y PMBCs expuestos a permetrina derivado del análisis de sobre representación	67
Figura 22 Funciones celulares alteradas en común	70
Tabla 5 Resumen del análisis ontológico con los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión en BMMCs expuestas a malatión	73
Tabla 6 Resumen del análisis ontológico con los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión en PBMCs expuestas a malatión	74
Tabla 7 Resumen del análisis ontológico con los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión en BMMCs expuestas a permetrina	75
Tabla 8 Resumen del análisis ontológico con los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión en PBMCs expuestas a malatión	76
Figura 23 Genes dentro de los 100 con mayor y 100 con menor expresión alterada compartidos	77
Tabla 9 Resumen de resultados del análisis ontológico con GENEMANIA Tabla 8a	79

Análisis ontológico de los cien genes con mayor represión en la expresión por efecto de la permetrina en PBMCs	
Figura 24 Validación de microarreglos por qPCR	81
Tabla 10 Análisis de metilación	83
Figura 25 Análisis de daño al DNA y del potencial de diferenciación linfoide B en crías BalbC expuestas <i>in utero</i> a permetrina	84
Figura 26 Características de las crías expuestas <i>in utero</i> a permetrina	86
Figura 27 Viabilidad en ausencia y presencia de IL7 de linfocitos proB de ratones neonatos expuestos y no expuestos	88
Figura 28 Gráficas de citometría de flujo representativas del ensayo de diferenciación linfoide B	89
Figura 29 Análisis del potencial de diferenciación de linfocitos proB de ratones expuestos <i>in utero</i> a permetrina	90
Figura 30 Efecto de la permetrina en el daño al DNA en linfocitos proB expuestos <i>in vitro</i>	91
Figura 31 Gráficas de citometría de flujo representativas del análisis del daño al DNA en linfocitos de ratones neonatos expuestos a permetrina <i>in utero</i>	92
Figura 32 Efecto de la permetrina en el daño al DNA en linfocitos de ratón expuestos <i>in utero</i>	93
Figura 33 Posibles mecanismos de acción de la permetrina	118

LISTA DE ABREVIATURAS

US EPA	United States Environmental Protection Agency
IARC	International Agency for Research on Cancer
US FDA	United States Food and Drug Administration
OMS	Organización Mundial de la Salud
RfD	Dosis de Referencia
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA B	Leucemia Linfoblástica Aguda de linaje B
LLA T	Leucemia Linfoblástica Aguda de linaje T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
HSC	Célula troncal hematopoyética
MPP	Progenitor Multipotente
LMPP	Progenitor Multipotente Predispuesto a Linaje Linfóide
ELP	Progenitor Linfóide Temprano
CLP	Progenitor Linfóide Común
BCR	Breakpoint Cluster Region
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
PBMCs	Células Mononucleares de Sangre Periférica
BMMCs	Células Mononucleares de Médula Ósea
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia
RT PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
PCR	Polymerase Chain Reaction
PB	Pares de Bases
SFB	Suero Fetal de Bovino
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DSB	Double Strand Breaks

i. RESUMEN

ANTECEDENTES. En las últimas décadas, el uso de insecticidas ha aumentado dramáticamente, siendo uno de los más extendidos la permetrina. Los humanos usan permetrina en innumerables situaciones, y este uso excesivo significa que cualquier persona está potencialmente expuesta. La exposición global a la permetrina ha sido preocupante porque se ha asociado con un mayor riesgo de leucemia pediátrica a nivel epidemiológico. A pesar de esta correlación epidemiológica aparentemente fuerte, existe evidencia biológica limitada derivada de estudios in vivo e in vitro que demuestran si la permetrina induce alteraciones asociadas con la etiología de la leucemia linfoblástica aguda B (LLA B), el tipo más común de leucemia en niños. Se ha sugerido que esta enfermedad se origina prenatalmente, a partir de alteraciones genéticas específicas que junto con eventos genéticos y epigenéticos postnatales adicionales conducen a un arresto en la diferenciación de linfoides B, y estas alteraciones pueden ser inducidas potencialmente por la exposición materna a permetrina. Por lo tanto, es importante evaluar si la permetrina induce estas alteraciones que se sabe que son la base de la etiología de LLA B. **OBJETIVO.** evaluar in vitro si la exposición a permetrina induce alteraciones genéticas asociadas con LLA B y si altera la expresión génica y metilación en células de origen hematopoyético, e in vivo si induce daño en el ADN, así como cambios en el potencial de diferenciación en linajes linfoides B en ratones expuestos durante el desarrollo embrionario. **MÉTODOS.** El efecto de la permetrina en la inducción de reordenamientos genéticos se evaluó in vitro en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos y células K562. Las células fueron expuestas a 200 μM de permetrina durante 24 h de cultivo. DMSO y etopósido se incluyeron como controles. La aneuploidía y el daño en los genes KMT2A, IGH y ETV6-RUNX1 se analizaron mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). RT PCR se llevó a cabo para evaluar si la permetrina induce fusiones oncogénicas en las que se sabe que participan estos genes. Para estudiar el efecto de la exposición continua a bajas concentraciones de permetrina, se incluyeron cultivos de PBMC expuestos a 72 h a 0,1 μM , y se realizó un análisis de daños en los genes KMT2A e IGH en interfases y metafases. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba U-Mann Whitney, con diferencias consideradas significativas cuando $p < 0.05$. El efecto de la permetrina en la expresión génica se estudió in vitro en sangre periférica (PBMC) y células mononucleares de médula ósea (BMMC) de individuos sanos. Las células fueron expuestas a 0.1 μM de permetrina o DMSO durante 72 h. El efecto sobre la metilación del DNA se estudió en BMMC expuestos a las mismas condiciones. Los cambios en la expresión génica y la metilación del DNA inducida por permetrina se analizaron mediante microarrays (Agilent). El software Agilent Gene Spring se usó para el análisis de datos de expresión y Workbench se usó para el análisis de datos de metilación. El análisis ontológico se realizó con los programas Genemania y Panther Pathways, y con este último se realizó una prueba de sobrerrepresentación utilizando una prueba exacta de Fisher, considerando un valor de p significativo < 0.05 . El efecto de la permetrina sobre el daño del DNA linfocitario y sobre el potencial de diferenciación del linaje linfocitario B se evaluó in vivo en ratones BALBc neonatales expuestos en el útero. Las comparaciones estadísticas entre los controles y los tratamientos con permetrina se realizaron mediante la prueba de ji cuadrado, con un nivel de

significación $p < 0.05$. RESULTADOS. Se descubrió que la exposición in vitro a altas y bajas concentraciones de permetrina induce daño estructural en los genes *KMT2A* e *IGH*, y aneuploidía. Se detectó daño a estos genes en las células de interfase y metafase. En la línea celular K562, el tratamiento con permetrina indujo fusiones oncogénicas. Se observó que la exposición in vitro a permetrina altera la expresión génica en PBMC y BMMC. En este último, se encontró una mayor representación de genes que codifican citocinas, quimiocinas, receptores transmembrana y canales iónicos, y se detectó la desregulación de genes asociados con interferón tipo I. Las PBMC mostraron principalmente desregulación en cadherinas y canales iónicos, y también se detectó la sobreexpresión de genes asociados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, así como genes que codifican tirosina quinasas. Se descubrió que la permetrina induce la desmetilación del DNA, que fue un evento frecuente y que se asoció con una sobreexpresión de los genes estudiados. Además, se detectó que la exposición en el útero a la permetrina se asocia con un mayor daño en el DNA en los linfocitos B de ratones neonatales expuestos prenatalmente. Es importante destacar que se detectó que el tratamiento en el útero con permetrina afecta el potencial de diferenciación del linaje linfocitoide B, ya que disminuyó la frecuencia de linfocitos B premaduros e inmaduros generados a partir de linfocitos proB inmortalizados de ratones expuestos a permetrina. DISCUSIÓN / CONCLUSIÓN. Los resultados muestran que la permetrina es capaz de inducir aneuploidía y daño estructural en los genes *KMT2A* e *IGH*, que son eventos implicados en la etiología de la leucemia pediátrica. Se detectó que la permetrina induce cambios en la expresión génica y la metilación, que también son eventos que promueven la leucemogénesis. Encontramos desregulación de genes que participan en varios procesos celulares asociados con el estrés oxidativo. Anteriormente, se informó que la permetrina induce estrés oxidativo, y esto podría conducir a eventos como daño en el DNA, desregulación de las vías de señalización, alteración de la expresión génica y defectos en la diferenciación celular. Encontramos una representación excesiva de genes que codifican citocinas y quimiocinas, lo que sugiere que la permetrina causa inmunotoxicidad, lo que también se ha informado anteriormente. Además, los genes desregulados de permetrina se asocian con tirosina quinasas, que se asocian de manera importante con procesos de cáncer. A nivel in vivo, los ratones expuestos en el útero a la permetrina habían aumentado el daño del DNA en las células de la médula ósea, incluidos los linfocitos proB y preB, que son células diana de la etiología de la leucemia. Además, se observó que la exposición en el útero a la permetrina afecta la diferenciación de los linfocitos proB, que mostraron menos potencial para progresar a células B inmaduras. Las alteraciones observadas in vivo también podrían estar asociadas con el efecto genotóxico, prooxidante e inmunotóxico de la permetrina. Este trabajo proporciona evidencia biológica que respalda las observaciones epidemiológicas que asocian la exposición a permetrina con un mayor riesgo de leucemia pediátrica. Los esfuerzos futuros para definir con mayor precisión los mecanismos por los cuales la permetrina ejerce los efectos observados en este trabajo son de gran importancia.

ii. ABSTRACT

BACKGROUND. In recent decades, insecticide use has increased dramatically, with one of the most widespread being permethrin. Humans use permethrin in countless situations, and this excessive use means that any individual is potentially exposed. The global exposure to permethrin has been of concern because it has been associated with an increased risk of pediatric leukemia at an epidemiological level. Despite this apparently strong epidemiological correlation, there is limited biological evidence derived from *in vivo* and *in vitro* studies demonstrating whether permethrin induces alterations associated with the etiology of acute lymphoblastic leukemia B (LLA B), the most common type of leukemia in children. It has been suggested that this disease originates prenatally, from specific genetic alterations that together with additional postnatal genetic and epigenetic events lead to an arrest in B lymphoid differentiation, with these alterations potentially being induced by maternal permethrin exposure. Thus, it is of importance to assess whether permethrin induces these alterations that are known to be the basis of the etiology of LLA B. **PURPOSE.** To evaluate *in vitro* whether permethrin exposure induces genetic alterations associated with LLA B, and whether it alters gene expression and methylation in cells of hematopoietic origin, and *in vivo* whether it induces DNA damage, as well as changes in the potential for differentiation into B lymphoid lineages in mice exposed during embryonic development. **METHODS.** The effect of permethrin on the induction of genetic rearrangements was assessed *in vitro* on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy volunteers and K562 cells. The cells were exposed to 200 μM of permethrin for 24 h of culture. DMSO and etoposide were included as controls. Aneuploidy, and damage on *KMT2A*, *IGH* and *ETV6-RUNX1* genes was analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). RT PCR was carried out to assess whether permethrin induces oncogenic fusions in which these genes are known to participate. To study the effect of continuous exposure to low concentrations of permethrin, PBMCs cultures exposed 72 h to 0.1 μM were included, and analysis of damage on *KMT2A* and *IGH* genes was performed on interphases and metaphases. Statistical comparisons were done by U-Mann Whitney test, with differences considered significant when $p < 0.05$. The effect of permethrin on gene expression was studied *in vitro* on peripheral blood (PBMCs) and bone marrow mononuclear cells (BMMCs) of healthy individuals. The cells were exposed to 0.1 μM of permethrin or DMSO for 72 h. The effect on DNA methylation was studied on BMMCs exposed to the same conditions. The changes in gene expression and DNA methylation induced by permethrin were analyzed by microarrays (Agilent). The Agilent software Gene Spring was used for expression data analysis and Workbench was used for methylation data analysis. The ontological analysis was carried out with the programs Genemania and Panther Pathways, and with the latter an overrepresentation test was performed using an exact Fisher test, considering significant a p value < 0.05 . The effect of permethrin on lymphocyte DNA damage and on potential of B lymphoid lineage differentiation was assessed *in vivo* in neonatal BALBc mice exposed *in utero*. Statistical comparisons between controls and permethrin treatments were performed using the chi-squared test, with a significance level $p < 0.05$. **RESULTS.** *In vitro* exposure to high and low concentrations of permethrin were found to induce structural damage in the *KMT2A* and *IGH* genes, and aneuploidy. Damage to these genes was detected in interphase and metaphase cells. In the K562 cell line, treatment with permethrin induced oncogenic fusions. It was observed that *in vitro* exposure to permethrin alters

gene expression in PBMCs and BMDCs. In the latter, greater representation of genes encoding cytokines, chemokines, transmembrane receptors and ion channels was found, and deregulation of genes associated with type I interferon was detected. PBMCs mainly showed deregulation in cadherins and ion channels, and overexpression of genes associated with the metabolism of reactive oxygen species as well as genes encoding tyrosine kinases was also detected. It was found that permethrin induces DNA demethylation, which was a frequent event and that was associated with over expression of the genes studied. Also, it was detected that *in utero* exposure to permethrin is associated with greater DNA damage in B lymphocytes of neonatal mice exposed prenatally. Importantly, it was detected that the *in utero* treatment with permethrin affects the B lymphoid lineage differentiation potential, since the frequency of preB and immature B lymphocytes generated from immortalized proB lymphocytes from mice exposed to permethrin was decreased. DISCUSSION / CONCLUSION. The results show that permethrin is capable of inducing aneuploidy and structural damage in the *KMT2A* and *IGH* genes, which are events implicated in the etiology of pediatric leukemia. It was detected that permethrin induces changes in gene expression and methylation, which are also events that promote leukemogenesis. We found deregulation of genes that participate in various cellular processes associated with oxidative stress. Previously, it has been reported that permethrin induces oxidative stress, and this could lead to events such as DNA damage, deregulation of signaling pathways, alteration of gene expression, and defects in cell differentiation. We found overrepresentation of genes that encode cytokines and chemokines, suggesting that permethrin causes immunotoxicity, which has also been previously reported. In addition, permethrin deregulated genes associated with tyrosine kinases, which are importantly associated with cancer processes. At the *in vivo* level, mice exposed *in utero* to permethrin had increased DNA damage in bone marrow cells, including proB and preB lymphocytes, which are target cells of the etiology of leukemia. Additionally, it was observed that the *in utero* exposure to permethrin affects the differentiation of proB lymphocytes, which showed less potential to progress to immature B cells. The alterations observed *in vivo* could also be associated with the genotoxic, prooxidant, and immunotoxic effect of permethrin. This work provides biological evidence that supports the epidemiological observations that associate permethrin exposure with an increased risk of pediatric leukemia. Future efforts to define more precisely the mechanisms by which permethrin exerts the effects observed in this work are of great importance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Insecticidas piretroides

Los insecticidas son agentes químicos utilizados para matar, repeler, dañar o mitigar una o varias especies de insectos (1). Existen numerosos tipos de insecticidas, y entre los más ampliamente utilizados se encuentran los del grupo de piretroides (2). Esta clase de insecticidas sintéticos se derivó de la modificación de las piretrinas, las cuales son insecticidas naturales que se encuentran en la flor del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). La modificación de las piretrinas dio como resultado moléculas con una mejor actividad insecticida y con mayor resistencia a la humedad, al calor y a la luz (2,3). Estos actúan como neurotóxicos, interrumpiendo la propagación de la señal neuronal al unirse a canales de sodio dependientes de voltaje presentes en los axones, lo que resulta en despolarización repetida, causando síntomas como temblores, movimientos involuntarios, salivación y parálisis (3,4).

Los piretroides han sido clasificados en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química y a sus efectos neurológicos. Los piretroides de primera generación (tipo 1), tales como permetrina, aletrina, bifentrina y tetrametrina, carecen de un grupo ciano en la posición alfa, y son poco estables a la exposición en el ambiente, por lo que se aplican más comúnmente en interiores (2,3). Los piretroides de segunda generación, presentan un grupo ciano en la posición alfa y tienen una excelente actividad insecticida y una gran estabilidad a condiciones ambientales, por lo que son mayormente usados en aplicaciones exteriores, como en la agricultura. Ejemplos de piretroides de segunda generación son la cipermetrina, deltametrina y el fenvalerato (2,4). Aunque existen más de 30 distintos piretroides, los más comunes son la deltametrina, la cipermetrina y la permetrina (3).

1.2 Permetrina

La permetrina (*3-fenoxibencil (1R,3R,1R,3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-Dimetilciclopropancarboxilato*) (CAS 52645-53-1), fue desarrollada en 1967 por Elliott (**Figura 1**) (3). Algunos nombres comerciales son Ambush, Agniban, Sanathrin, Dragnet y Talcord. La permetrina consiste en una mezcla de diastereoisómeros, cada uno compuesto por una mezcla racémica de enantiómeros (1R cis, 1S cis, 1R trans, 1S trans), presente en diferentes proporciones, comúnmente 25:75 o 40:60 (cis:trans). La permetrina es un líquido de color amarillo-café pálido que presenta poca solubilidad en agua (180µg/L, a 20°C con radio 25:75), pero es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos. Es mayormente estable en medios ácidos (2,5). Debido a su alta efectividad insecticida, y su considerada baja toxicidad para el ser humano, el uso de piretroides como la permetrina ha incrementado en las últimas décadas.

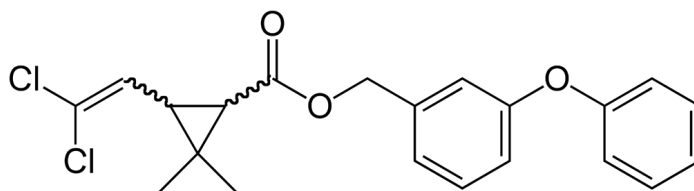


Figura 1 Fórmula estructural de la permetrina.

La permetrina es uno de los piretroides más ampliamente utilizado en múltiples actividades en todo el mundo (3). De acuerdo con la U.S. EPA (del inglés United States Environmental Protection Agency), aproximadamente 2 millones de libras de permetrina se aplican anualmente en agricultura, en el hogar y en salud pública (6). De acuerdo a la IARC (del inglés, International Agency for Research on Cancer), anualmente se utilizan más de 600 toneladas de permetrina alrededor del mundo, y los países en donde mayor uso se ha registrado son: Estados Unidos de América, México, Brasil, y Centroamérica (7). El 70% de la permetrina se utiliza en actividades no agropecuarias, y de éste, el 55% es aplicado por profesionales, 41% es empleado en el hogar y 4% se usa en áreas para combatir mosquitos.

En agricultura, se aplica en diversos tipos de cultivos que incluyen alfalfa, manzanas, aguacate, brócoli, tomate, lechuga, cebolla y papa, entre otros (6). La permetrina se encuentra en múltiples productos para el hogar; de acuerdo con la U.S. FDA (del inglés, United States Food and Drug Administration), existen más de 1400 marcas registradas que contienen permetrina (8). Este insecticida se utiliza ampliamente para combatir pediculosis en niños, en los cuales se aplica directamente (9). La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda su uso para impregnar mosquiteros en zonas en donde la malaria es endémica, así como para la desinsectación de aeronaves (10,11). Adicionalmente, en algunos países se utiliza para impregnar uniformes del personal militar (12). El amplio uso de permetrina y otros insecticidas piretroides en distintas actividades alrededor del mundo, implica que cualquier individuo está potencialmente expuesto a este agente.

El ser humano está en contacto con agentes piretroides a través de diferentes rutas de exposición, que pueden ser ocupacionales, en el caso de agricultores (13), o no ocupacionales, a través de la dieta o de productos para el hogar (14,15). Las principales rutas de exposición a permetrina son por inhalación, ingesta a través de alimentos o por contacto dérmico (15). En particular, los niños están en contacto directo con este agente a través de *shampoos* o cremas para tratar pediculosis (16). Adicionalmente, la exposición en niños puede ocurrir a través del contacto con pisos contaminados, y a través de la ingesta de alimentos o agua contaminada (14,17). La OMS ha establecido un límite de ingesta diario de 0.05 mg/Kg/día de permetrina (10), y la U.S. EPA ha establecido una dosis de referencia (RfD) de 0.25 mg/Kg/día (18). Posterior al contacto con permetrina, se distribuye en todos los tejidos y órganos del cuerpo, por lo que en individuos expuestos se han podido monitorear cantidades considerables del agente así como de sus metabolitos (15).

La detección de permetrina y de sus metabolitos en muestras de individuos, refleja que la exposición a este insecticida es global. Se han detectado metabolitos de piretroides como la permetrina en orina de adultos y de niños (14,15,19,20). En 2010 se estudiaron 5,046 muestras de orina de población civil no institucionalizada de Estados Unidos de América que incluyó individuos blancos no hispanos, negros no hispanos y mexico-americanos, y se reportó que el 70% presentaron metabolitos de piretroides (ácido 3 fenoxi benzoico, 3PBA);

los niveles de metabolitos detectados en este estudio fueron significativamente más altos en niños (15). Adicionalmente, se han detectado metabolitos de permetrina y otros piretroides en mujeres embarazadas, en leche materna y en cordón umbilical (21–23). La exposición a permetrina durante el embarazo ha sido de especial preocupación ya que este agente es capaz de atravesar la barrera placentaria (23). La detección de metabolitos de piretroides ha correlacionado con exposición a permetrina y a otros piretroides a través de comida contaminada, polvo, agua, aire y suelo (14). Derivado de estos estudios, se ha estimado una dosis acumulada diaria de 0.002 mg/Kg/día (14). Debido a que constantemente se han detectado metabolitos de piretroides en numerosas muestras, ha sido de interés el metabolismo de estos agentes.

Posterior a la entrada de la permetrina al organismo, ésta es metabolizada y eliminada. En mamíferos, el metabolismo de los piretroides en general ocurre rápidamente, por lo que son eliminados casi completamente a través de la orina y las heces en días posteriores a la exposición (2). Las rutas metabólicas más importantes de los piretroides ocurren en el hígado y son la hidrólisis y oxidación de ésteres, las cuales son mediadas por las carboxil esterases 1 y 2 y varias isoformas de la familia Citocromo P450 (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 CYP3A4). Los principales metabolitos de la permetrina son el ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA), y los ácidos carboxílicos cis-/trans-3-(2,2-dicloro-vinil)-2,2-dimetilciclopropano-1 (cis- y trans-DCCA) (24) Los metabolitos generados son posteriormente conjugados principalmente con glucurónidos, sulfatos y glicina, y excretados principalmente por orina en pocos días (2,24). En seres humanos, los metabolitos de la permetrina alcanzan un pico de concentración en plasma 7 horas después de una exposición oral, con un tiempo de vida media de eliminación de 7 horas en promedio, observándose eliminación casi completa a las 84 horas (24). En general, los piretroides no dejan residuos en tejidos, dado que son biodegradables y no se bio-acumulan. A pesar de que la eliminación de piretroides es relativamente rápida, en comparación con otros plaguicidas, existe preocupación por los posibles efectos crónicos adversos que puedan tener, incluyendo cáncer.

1.3 Permetrina y cáncer hematopoyético

El cáncer comprende un grupo de enfermedades fuertemente asociadas con la exposición ambiental y el estilo de vida, por lo que es importante en el campo de la prevención la identificación de factores ambientales capaces de promover el desarrollo de esta enfermedad (25–27). Diferentes factores ambientales han sido asociados con cáncer, por ejemplo el tabaco, el alcohol y la radiación ultravioleta, cuyos efectos carcinogénicos han sido demostrados en diversos modelos experimentales y estudios epidemiológicos, y por lo tanto clasificados como carcinógenos por la IARC (28). Sin embargo, otros factores ambientales, como ciertos plaguicidas, son considerados como no clasificables como carcinogénicos por dicho organismo, debido a que hay evidencia insuficiente y sus efectos aún son controversiales (7,28). Por ello, es relevante investigar si los plaguicidas tienen potencial de contribuir al desarrollo del cáncer. Adicionalmente, contrario a otros factores ambientales cuyo uso ha sido regulado o prohibido (DDT, tabaco), el empleo de ciertos agentes, incluyendo a los insecticidas piretroides, ha incrementado mundialmente en las últimas décadas (29).

El aumento en el uso de piretroides ha causado preocupación por su posible potencial carcinogénico. La OMS, a través de la IARC, ha identificado ciertos plaguicidas como agentes carcinogénicos, por ejemplo el DDT (27). Sin embargo, existe un gran número de plaguicidas cuya clasificación no ha sido posible debido a la falta de evidencia derivada de experimentos *in vivo* e *in vitro*. Este es el caso de la permetrina, la cual ha sido clasificada dentro del grupo 3, como “no clasificable como carcinógeno”, ya que se cuenta con evidencia limitada, y los efectos han resultado controvertidos (7). Sin embargo, la EPA ha clasificado a la permetrina como probable carcinógeno para el ser humano (6). Adicionalmente, existen estudios a nivel epidemiológico que sugieren que la permetrina está asociada con cáncer (30,31).

Los estudios epidemiológicos han investigado la asociación entre la exposición a piretroides con cáncer en adultos y en niños (13,19,32,33). Se han evaluado diversos tipos de cáncer incluyendo colón, pulmón, melanoma, mama y próstata (30,31). En una reciente revisión

sistemática que incluyó 18 artículos donde se evaluó la asociación de permetrina con cáncer a nivel epidemiológico, se concluyó que no existe evidencia de un mayor riesgo de la mayoría de los cánceres (colon, recto, páncreas, pulmón, melanoma, mama, próstata, vejiga y linfoma no Hodgkin) analizados con la exposición a piretroides. Sin embargo, el incremento en el riesgo de mieloma múltiple en adultos y de leucemia en niños, asociado a la exposición a piretroides, no se descartó por completo, y se sugirieron mayores estudios (30). En conjunto, esto sugiere, que la exposición a piretroides como la permetrina, está posiblemente asociada con cáncer de tipo hematopoyético.

La probable relación entre la exposición a piretroides con cáncer hematopoyético es de gran relevancia ya que este tipo de enfermedad es de alta incidencia y mortalidad en adultos y niños a nivel mundial (34). Se prevee que los nuevos casos de leucemia, linfoma y mieloma representen el 10% del estimado de 1,735,350 casos nuevos de cáncer diagnosticados en Estados Unidos; y se estima que causen la muerte de 58,100 personas, que representan el 9.5% de muertes por cáncer, calculando un total de 609,640 muertes por esta causa (34). Adicionalmente, la leucemia es el cáncer más común en niños, particularmente la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), cuya incidencia ha incrementado en los últimos años (35,36). Debido a esto, resulta de gran interés estudiar si la exposición a plaguicidas como los piretroides está asociada con la etiología de enfermedades como la LLA.

1.4 Leucemia Linfoblástica Aguda

Las leucemias agudas comprenden 31% del total del cáncer pediátrico, y son la neoplasia más común en niños (34). Sólo en Estados Unidos de América, se diagnostican más de 3000 nuevos casos cada año (26,36). En diversos países, la incidencia de las leucemias agudas ha incrementado en los últimos años (19,37). Las leucemias agudas pueden ser de tipo linfocítico (LLA) o mielocítico (LMA); particularmente en niños, la LLA representa el 80% de las leucemias agudas. La LLA es una enfermedad hematológica maligna que se caracteriza por la proliferación desordenada de células linfocíticas inmaduras que predominan en la médula ósea y alteran la hematopoyesis normal (36,38). El subtipo de LLA más frecuente es el que

se presenta en células con inmunofenotipo precursor B, constituyendo aproximadamente el 85% de todas las LLA (36,37,39).

La LLA se origina a partir de progenitores hematopoyéticos comprometidos a diferenciarse en linaje T (LLA T) o B (LLA B), los cuales presentan lesiones genéticas y alteraciones epigenéticas que les confieren capacidades como la auto renovación ilimitada y arresto en la diferenciación linfoide (36,38). Existe evidencia sólida que muestra que la adquisición de estos cambios genéticos y epigenéticos es necesaria en el desarrollo de la leucemia, y estas modificaciones están directamente asociadas con la biología de la enfermedad, por lo que confieren un valor pronóstico específico para el paciente y pueden ser utilizados para la estratificación de riesgo (38). De hecho aproximadamente el 75-80% de los pacientes con LLA presentan algún rearrreglo cromosómico relevante para el pronóstico (40–42). Además se han identificado alrededor de 200 genes que se ven afectados a consecuencia de las alteraciones cromosómicas, de los cuales algunos predominan por la frecuencia con la que se alteran y porque han sido encontrados en rearrreglos asociados con el pronóstico (43).

1.5 Alteraciones genéticas en Leucemia Linfoblástica Aguda

Los rearrreglos cromosómicos pueden afectar el número (aneuploidía con la hiperdiploidía) y/o la estructura de los cromosomas, y potencialmente conducen a la transformación leucémica. El cambio numérico o aneuploidía más común en LLA es la ganancia de cromosomas (hiperdiploidía), la cual se ha planteado que puede generarse desde la etapa prenatal y conducir a la transformación leucémica si se adquieren eventos adicionales (44). Por otro lado, los rearrreglos cromosómicos estructurales observados en LLA conducen a daño en genes que generalmente codifican factores de transcripción, y que al verse alterados, desregulan las vías transcripcionales que mantienen la homeostasis de la célula hematopoyética (38). Entre los cambios estructurales se encuentran las inversiones, deleciones y translocaciones, éstas últimas son las más frecuentes en LLA y conllevan a: a) Reubicación de regiones regulatorias de genes hacia sitios en los que se yuxtaponen con regiones codificantes de otros genes, en este caso uno de los genes dona su región potenciadora que activa la expresión del segundo gen, que en su sitio original se encontraba

regulado. Este es el caso de los oncogenes *MYC* y *BCL2*, que se sobreexpresan bajo la influencia del potenciador transcripcional del gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*). b) Con mayor frecuencia se originan fusiones entre dos regiones codificantes de diferentes genes que conducen a la expresión de proteínas quiméricas, que generalmente resultan en la alteración de la actividad de cinasas o de factores de transcripción. Un ejemplo es la proteína codificada por la fusión *ETV6-RUNX1*, en la que *RUNX1* pierde su capacidad de reclutar factores de transcripción necesarios para la expresión de genes requeridos en la hematopoyesis normal (43,45).

Las translocaciones en LLA han sido estudiadas y se ha identificado una gran diversidad de genes alterados. Las translocaciones más frecuentemente observadas en LLA y con valor en el pronóstico a nivel clínico son: a) La translocación $t(12;21)(ETV6-RUNX1)$, detectada en el 20% de los pacientes; b) la translocación $t(1;19)(TCF3-PBX1)$, descrita en el 3% de los casos; c) la $t(9;22)(BCR-ABL)$, en el 2% de los casos; d) $t(X \text{ ó } Y;14)(IGH-CRLF2)$, encontrado en 1% de pacientes pediátricos y principalmente observada en pacientes adolescentes con tipo de leucemia similar a *BCR-ABL*; y e) los rearrreglos en 11q23, que involucran al gen *KMT2A* (*rKMT2A*), observadas en el 5% de los casos (42,44). Los rearrreglos en 11q23 son particularmente frecuentes (80%) en niños que desarrollan la enfermedad antes del primer año de edad (leucemia neonatal), y se ha sugerido que puedan generarse por exposición a ciertos agentes.

El gen *KMT2A* (OMIM: 159555, *MLL*, *MLL1*, *ALL1*, *TRX* o *HTRX*), forma rearrreglos con diversos genes, los cuales se presentan en leucemia neonatal, pediátrica, y en adultos. Se han encontrado más de cien diferentes parejas génicas con las que se rearregla *KMT2A*, son particularmente frecuentes los rearrreglos que involucran a los genes *AF4*, *AF9*, *AF6*, *ENL* y *AF10* (46). Los rearrreglos en *KMT2A* se han identificado en el 10% de las leucemias *de novo* en adulto, y en el 33% de los pacientes con leucemias secundarias a tratamiento con inhibidores de la DNA topoisomerasa II, por un cáncer previo. Por otro lado, los rearrreglos en este gen se presentan en el 80% de los casos de leucemia neonatal, y en el 3-5% de los niños mayores (47). Aunque se sabe que las alteraciones genéticas son necesarias para el desarrollo de la LLA, generalmente no son suficientes, y se requieren mutaciones

secundarias y/o alteraciones epigenéticas adicionales, que contribuyan a la transformación leucémica (44).

1.6 Alteraciones epigenéticas y en la expresión génica en Leucemia Linfoblástica Aguda

Además de las alteraciones genéticas, las alteraciones epigenéticas son eventos fundamentales en el desarrollo de la LLA. Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se encuentran la metilación del DNA, la modificación de histonas, la remodelación de nucleosomas y la regulación de la expresión por RNAs no codificantes (48). La metilación del DNA es el mecanismo epigenético más ampliamente estudiado en LLA. Esta modificación involucra la adición covalente de grupos metilo al carbono 5 de la citosina de DNA. En mamíferos, la metilación del DNA ocurre principalmente en regiones enriquecidas por repetidos de guaninas y citocinas, conocidas como islas CpG (5'-CpG-3') (49). La metilación del DNA puede ocurrir en cualquier sitio del genoma pero principalmente en regiones centroméricas, teloméricas, cromosomas X inactivos y en secuencias repetidas. Puede presentarse metilación del DNA en el cuerpo del gen, o en regiones promotoras, de hecho aproximadamente el 70% de las regiones promotoras en mamíferos presentan islas CpG (50). La metilación del DNA en regiones promotoras generalmente correlaciona con el silenciamiento en la expresión génica, y por el contrario, la metilación de CpG a lo largo del cuerpo del gen promueve la elongación durante la transcripción (51).

En el cáncer en general, las células tumorales muestran una hipometilación global del DNA, que se asocia con inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones y pérdida de la impronta genómica (51,52), en contraste, presentan hipermetilación del DNA en regiones promotoras. Se ha reportado que en el 5-10% de los promotores normalmente desmetilados presentan metilación anormal en diversos tipos de cáncer (51). Esta hipermetilación anormal puede conducir al silenciamiento de genes supresores de tumor, y en consecuencia al proceso carcinogénico (53). En células normales, los promotores génicos ricos en islas CpG usualmente se encuentran desmetilados, manteniendo una estructura eucromática, que es la conformación transcripcionalmente activa, que permite el acceso de factores de transcripción

y por lo tanto la expresión génica. Durante el desarrollo de cáncer por el contrario, muchos de los genes sufren hipermetilación en los promotores ricos en islas CpG, cambiando la estructura a heterocromatina, la cual no es permisiva a la unión de factores de transcripción y por lo tanto hay represión de la transcripción. Aunque se ha establecido la asociación de la metilación en promotores con la expresión génica, la asociación entre la metilación en el cuerpo del gen y la expresión génica no es tan clara; se ha planteado que la metilación en el cuerpo del gen podría favorecer la expresión génica (50). La alteración en la metilación del DNA es un evento altamente prevalente en diversos tipos de cáncer, incluyendo la LLA (49).

En numerosos estudios se ha establecido que la alteración en la metilación del DNA tiene un papel fundamental en el desarrollo de LLA de estirpes B y T en adultos y niños (54). La investigación de alteraciones en la metilación génica en la LLA se ha abordado mediante el análisis dirigido de genes específicos preseleccionados por su importancia en esta leucemia, y más recientemente se ha hecho a través de herramientas globales de gran cobertura del genoma en los que el análisis no sólo se limita a ciertos genes (55). En muchos de los casos, el estado de la metilación génica se ha empatado con estudios de expresión génica. En conjunto, estos trabajos han revelado metilación y expresión aberrante, principalmente hipermetilación en múltiples genes de manera simultánea, lo que se ha definido como “fenotipo metilador”. Esto conduce al silenciamiento génico, y es una característica común en LLA y en otras leucemias de adultos y niños (52,55,56).

Se han encontrado diversos genes donde su hipermetilación conduce a la pérdida de la expresión en pacientes con LLA a través de estudios dirigidos (54). Algunos de estos genes son: *TP53*, *FHIT*, *CD10*, *TET2*, *sFRP2*, *EFNA5*, *ESR1*, *THBS2*, *CDKN1A* (*p21*), *ABCB1*, *EPHB4*, *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *SYK*, *DAPK1*, *BRINP1* (*DBC1*), *ABL1*, *PTEN*, *sFRP5*, *BNIP3*, *MYOD1*, *CALCA* (*calcitonina*), *CDKN1C* (*p57*), *DKK3*, *WIF1*, *LATS2*, *EFNB2*, *PPP1R13B* (*ASPP1*), *THBS1*, *CDH1*, *TP53* y *HCK* (54,55,57–61). La mayoría de estos genes son supresores de tumor y están involucrados en funciones celulares y vías de señalización fundamentales. Además de los análisis dirigidos, se han hecho estudios de cobertura amplia que han incluido un análisis extenso del genoma, así como mayor número de pacientes (49,54,55). Derivado de estos trabajos se han podido establecer firmas de expresión y

metilación génica, que son comunes a todos los subtipos de LLA y algunas firmas que son exclusivas de cada subtipo (54). Adicionalmente, ha sido posible identificar los procesos y vías celulares con mayor representación de genes con metilación y expresión aberrante en LLA.

Los procesos celulares más comúnmente afectados en LLA por alteración epigenética son la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la regulación transcripcional y la adhesión celular (**Figura 2**) (54). Algunos ejemplos de genes con alteración en la metilación que participan en estas funciones son *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *SFRP*, *CDK6*, que regulan la proliferación y ciclo celular (62–66); *GATA4*, *HLF*, *TCF3*, *FOXF2*, *PAX2*, *PAX5*, *PAX6*, *TFAP2A*, *TWIST2*, *TP73*, *HOXA4*, *HOXA5* y *HOXA6*, que participan en la transcripción génica y en diferenciación celular (62,67–71); y *DAPK1*, *APC*, *EPHA2*, *RASSF1*, *PTEN*, *APAF1*, *DBC1*, *DCC*, *EPHA2*, *EYA2*, *miRNA34*, *miRNA34C*, *NOXA*, *ASPP1*, *PTPN6*, *RASSF6*, *SFRP1*, *WDR35*, *PAR4*, *ERBB4*, implicados en apoptosis (52,55,59,67,72–74). La alteración en la metilación de estos genes confiere a las células leucémicas ventajas de supervivencia, previniendo apoptosis y promoviendo proliferación. Por otro lado, algunas de las vías de señalización mayormente representadas por genes con alteración en la metilación en LLA son P53, WNT, EPHR, MAPK y PI3K-AKT, las cuales están estrechamente relacionadas a procesos celulares como los ya mencionados (52,58,59,72,75–77) (**Figura 3**). Las alteraciones genéticas y epigenéticas conducen potencialmente a la transformación leucémica, impidiendo la correcta diferenciación linfoide.

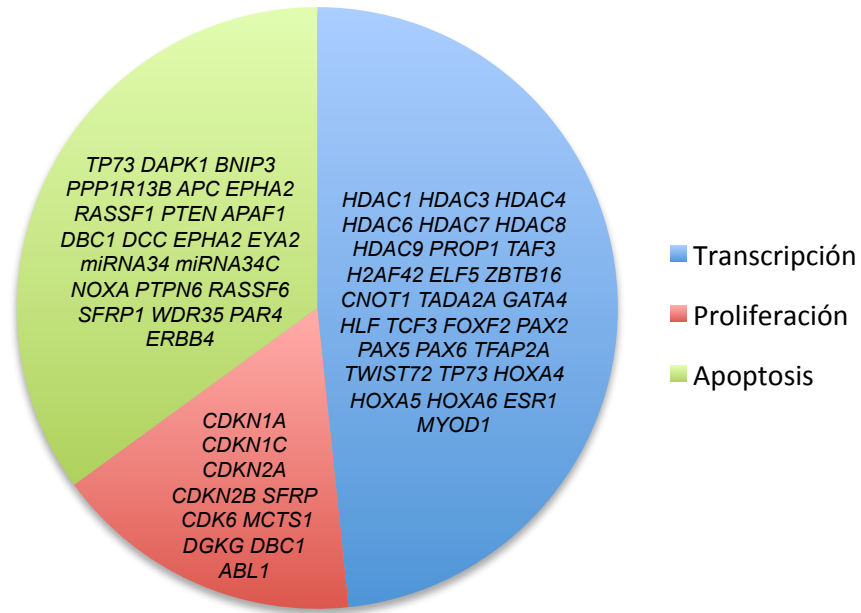


Figura 2 Procesos celulares y genes comúnmente afectados en LLA.

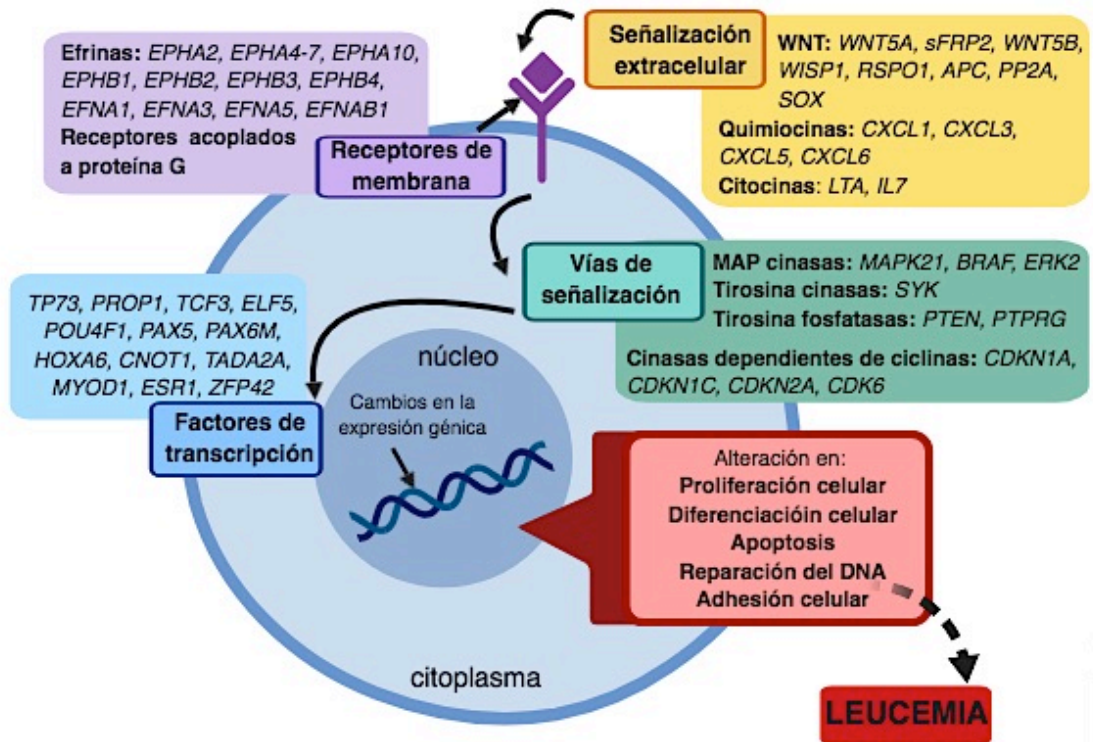


Figura 3 Funciones moleculares, vías y procesos celulares comúnmente afectados por alteraciones epigenéticas en LLA.

1.7 Alteración en la diferenciación linfoide B en Leucemia Linfoblástica Aguda

El desarrollo normal de células B maduras capaces de producir anticuerpos consiste en un proceso de múltiples pasos ordenados y altamente regulados. Este proceso empieza en la médula ósea en adultos y en el hígado en la etapa embrionaria, a partir de un grupo de células troncales hematopoyéticas (HSCs, del inglés Hematopoietic Stem Cells), las cuales pueden auto renovarse y dar origen a células de múltiples linajes diferentes (multipotentes). Dichas células adquieren gradualmente el compromiso hacia el linaje linfoide, por lo que progresivamente avanzan por la vía de diferenciación linfoide, hasta la formación de células B maduras y funcionales (78); este proceso ha sido mayormente estudiado en modelos murinos. Al entrar las HSCs en la vía de diferenciación, gradualmente van perdiendo la capacidad de dar origen a múltiples linajes, y van adquiriendo funciones específicas de linaje. De esta forma, las HSCs dan lugar entonces a progenitores multipotentes (MPPs, del inglés multipotent progenitor cells), que poseen potencial tanto linfoide como mieloide, éste a su vez da origen al progenitor multipotente predispuesto a linaje linfoide (LMPP, del inglés Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor) y posteriormente al progenitor linfoide temprano (ELP, del inglés Early Lymphoid Progenitor), que poseen progresivamente programas linfoides cada vez más restrictivos (78). La vía progresa, desde progenitores multipotenciales hacia los progenitores oligopotenciales, capaces de originar células sólo de ciertos linajes. En ratón, el progenitor identificado que preferentemente da origen a las células B es el progenitor linfoide común (CLP, del inglés, Common Lymphoid Progenitor), el cual presenta una mayor capacidad de proliferación pero una menor capacidad de diferenciación (78–80).

La vía del desarrollo de células B está definida por la expresión y ensamblaje secuencial del receptor de células B (BCR, del inglés B cell receptor) y de sus componentes. Las células B expresan receptores (BCRs) excepcionalmente especializados, capaces de reconocer e interactuar con un antígeno particular que sea nuevo o recurrente; y el principal objetivo de la linfopoyesis B es el de generar un repertorio diverso de BCRs, que identifiquen de manera específica una gran variedad de antígenos (80,81). Esta gran diversidad de BCR específicos, está dada por el proceso de recombinación VDJ que ocurre en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (IgH, IgL), las cuales conforman al BCR.

En la recombinación VDJ, los segmentos V (variable), D (diversity) y J (joining), presentes en la región variable de los genes IgH, son rearrreglados mediante un proceso altamente ordenado (80,81). Primero, los segmentos D y J son rearrreglados, y posteriormente el segmento V es unido al fragmento DJ; este proceso ocurre primero en los loci de las cadenas pesadas IgH, en el linfocito proB, en el cual las proteínas de señalización Ig α e Ig β permanecen en la superficie unidas a proteínas chaperonas como la calnexina (proBCR). Estas proteínas Ig α e Ig β , permiten que se desencadenen señales que disparen respuestas biológicas después de la unión al antígeno, ya que por sí solo el heterodímero de IgH e IgL no genera señales. En ratones se ha observado que el principal receptor que controla la etapa proB es el de la interleucina 7 IL7R. En la siguiente etapa de diferenciación, conocida como linfocito preB, ocurre recombinación de los segmentos variables V y J de las cadenas ligeras IgL; en esta etapa, las IgH que fueron exitosamente rearrregladas, se ensamblan junto a Ig α e Ig β y junto a las cadenas ligeras subrogadas λ 5 y VpreB, dando lugar al preBCR. Los rearrreglos no exitosos, en los que la recombinación de los segmentos VDJ de las IgH no ocurrió dentro de marco de lectura, o no se ensamblaron adecuadamente los componentes del preBCR, provocan que el linfocito proB sea incapaz de progresar hacia preB, y deba entrar a apoptosis. Una vez que se han recombinado las IgL, se ensamblan con las IgH exitosamente rearrregladas y con Ig α e Ig β , dando lugar al BCR maduro, formando al linfocito B inmaduro (médula ósea) y transicional (periferia). Finalmente, la transición hacia linfocito B maduro ocurre después de la activación de los mecanismos de auto-tolerancia, que permiten el reconocimiento de antígenos propios y no propios. Si después de varios días el linfocito B no encuentra a su antígeno cognado, entonces progresa hacia célula B madura (78,80,81).

Cada etapa del desarrollo del linfocito B ha sido caracterizada a través de sus patrones particulares de marcadores de superficie y de su estado de proliferación (**Figura 4**). Los procesos de recombinación y proliferación en la célula B son mutuamente excluyentes, para asegurar que los eventos de recombinación no homóloga ocurran durante la replicación del DNA, evitando así que se incremente la tasa de mutaciones (78). Sin embargo, si durante el desarrollo de los linfocitos B ocurren fallas que conducen al establecimiento de programas de transcripción y señalización aberrantes, el desarrollo es incapaz de proceder, llevando a un arresto en alguna etapa de la diferenciación, como sucede en la LLA B (80,81).

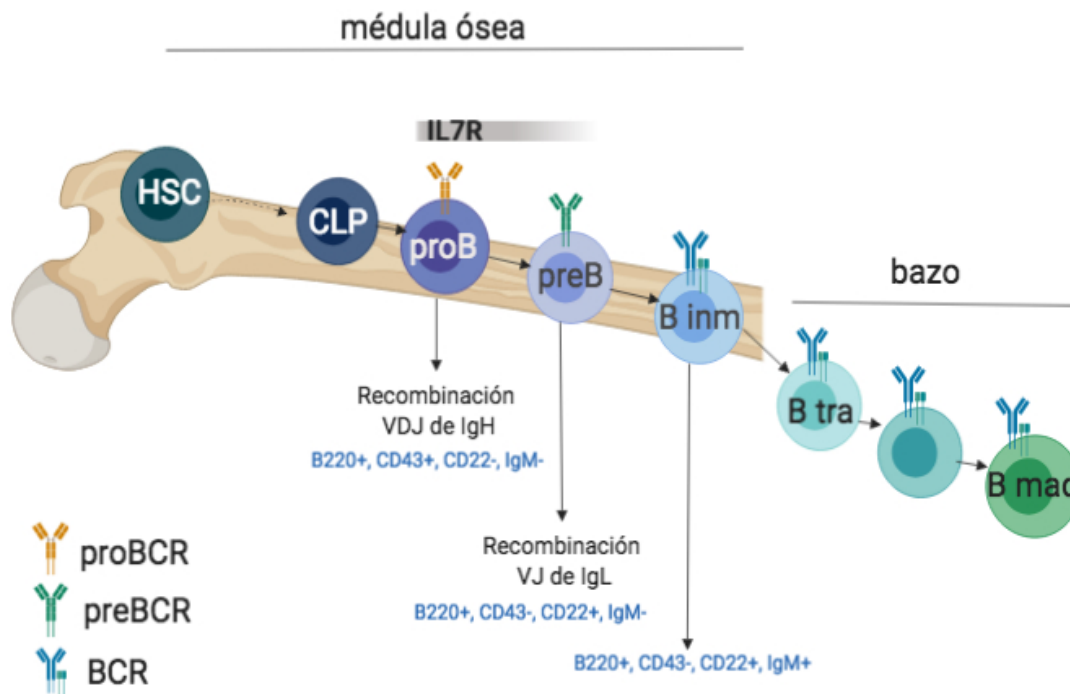


Figura 4 Desarrollo de linfocitos B en ratón

La LLA B se caracteriza por presentar fallas en el desarrollo de los linfocitos B tempranos, en los que existe una alteración en las vías de señalización que son cruciales para este proceso. En el desarrollo de las células B hay un riguroso control que separa los mecanismos de proliferación de los de diferenciación, haciéndolos mutuamente excluyentes, lo cual explica el hecho de que en la LLA B pediátrica se observan generalmente comprometidos los sub estadios proliferativos de los linfocitos proB y preB, y que se arrestan durante la diferenciación. Se han identificado factores de transcripción que son indispensables para regular la entrada hacia el linaje B, y para regular el compromiso hacia este linaje; algunos de estos factores de transcripción que regulan el desarrollo de células B son STAT5, E2A/TCF3, E12/E47, EBF1 y PAX5 (78,81). En la LLA, la generación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas en células tempranas, potencialmente conduce a la desregulación de estos

factores de transcripción y/o de sus programas transcripcionales, provocando un arresto en la diferenciación junto con un aumento en la proliferación y auto renovación, así como disminución en la apoptosis y en el mantenimiento de telómeros (81). Estas alteraciones en conjunto pueden generar clones de blastos leucémicos inmaduros altamente proliferativos, con ventaja en supervivencia y con potencial de replicación ilimitado (78). Aunque se conoce que ciertas alteraciones genéticas acompañadas de alteraciones secundarias genéticas y epigenéticas, son la base de la etiología de la LLA, aún falta claridad en los mecanismos específicos que conducen al establecimiento de la enfermedad, así como en definir la célula en la que se origina.

1.8 Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda B pediátrica

A pesar de los grandes avances que se han logrado en cuanto al tratamiento de la LLA B en niños, el origen de esta enfermedad aún no se conoce con certeza (44). Aunque se sabe que es una enfermedad con gran heterogeneidad genética, en la actualidad se han delineado las principales alteraciones genéticas (hiperdiploidía y translocaciones) que constituyen la base de la etiología de la LLA B. Se ha sugerido que en la mayoría de los casos, la primera alteración genética se origina *in utero*, con subsecuentes alteraciones secundarias que se dan después del nacimiento y que promueven el desarrollo de la leucemia. Se ha propuesto también que estas alteraciones secundarias son disparadas por una respuesta inmune anormal (44); sin embargo, aún se desconocen los factores que originan las alteraciones genéticas iniciales o primarias.

Se ha planteado que las alteraciones génicas que conducen al desarrollo de la leucemia pediátrica tienen un origen intrauterino, a partir de dos grandes evidencias. Primero, se ha detectado que en gemelos monocigotos con LLA B hay 100% de concordancia, por lo que ambos desarrollan la leucemia aunque en momentos diferentes (45). Adicionalmente, los dos gemelos comparten exactamente la misma alteración leucemogénica. La segunda evidencia es que se ha identificado tanto la hiperdiploidía (ganancia de ciertos cromosomas), como las fusiones oncogénicas *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *rKMT2A* en sangre del tamiz neonatal de niños en los que posteriormente se presentó la LLA B (44); lo que refleja que las alteraciones

estaban presentes antes del nacimiento y por lo tanto fueron adquiridas *in utero*. Sin embargo, estas alteraciones también han sido detectadas en niños en los que no se desarrolló la LLA B, lo que muestra que aunque estas alteraciones son necesarias para el establecimiento de la enfermedad no son suficientes, por lo que generalmente se requieren eventos mutacionales adicionales durante la etapa posnatal. Es común que ciertas alteraciones coexistan, como es el caso de las alteraciones en el gen *IGH*, que se ha observado que pueden acompañar a otras alteraciones primarias (82). Aunque no se conocen los factores que promueven la formación de alteraciones genéticas *in utero*, se ha sugerido que la exposición a ciertos agentes puede contribuir; sin embargo en la mayoría de los casos esta relación no se ha logrado establecer con claridad, y se carece de plausibilidad biológica en la asociación entre exposición ambiental y la LLA B (44). A nivel epidemiológico, entre los agentes ambientales que se sugiere que están asociados a LLA B se encuentran los plaguicidas (33,35,83,84). Una clase de plaguicidas que ha sido asociada con el desarrollo de LLA B en niños son los piretroides (19).

1.9 Leucemia Linfoblástica Aguda pediátrica y plaguicidas piretroides

Se ha asociado el riesgo de desarrollar LLA B pediátrica con la exposición a piretroides a nivel epidemiológico en diversos países. En población francesa se realizó un estudio que incluyó 280 casos de leucemia aguda pediátrica y 288 controles sanos, se determinó que el uso de shampoos a base de piretroides y otros compuestos químicos también usados como insecticidas, para tratar la pediculosis, está asociado con un mayor riesgo de presentar LLA (16). Un estudio independiente de casos y controles en población de Brasil, que incluyó 252 casos de leucemia aguda pediátrica y 423 controles, reportó una asociación significativa entre la exposición *in utero* a plaguicidas, particularmente piretroides (permetrina), y mayor riesgo de leucemia en niños menores a dos años de edad (83). Sin embargo, los estudios epidemiológicos se basan en cuestionarios para estimar la exposición, por lo que los niveles y tipos de exposición podrían ser incorrectamente estimados (35). En 2012 en Shanghai se realizó otro estudio de casos y controles que incluyó 176 niños con LLA y 180 controles, y se determinó que existe asociación entre los niveles de metabolitos de piretroides en orina de pacientes y un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (19). Este estudio tiene especial

relevancia ya que, en contraste con estudios epidemiológicos basados sólo en cuestionarios, se midieron los niveles de metabolitos de piretroides en orina, por lo que el grado de exposición a piretroides se determinó con mayor precisión.

Aunque a nivel epidemiológico se ha sugerido que la exposición a piretroides está asociada con el desarrollo de la LLA, son muy escasos los estudios que han investigado la plausibilidad biológica de esta relación a través de estudios *in vivo* e *in vitro*, por lo que se requiere mayor investigación en este campo. En un reporte de caso único, se describió a una mujer con aracnofobia, que durante el embarazo estuvo sobre expuesta a permetrina, y que tuvo un neonato con leucemia congénita positiva para un rearrreglo en el gen *KMT2A*. En este trabajo se sugirió una relación causal entre la exposición *in utero* a permetrina y el desarrollo de leucemia mieloide aguda. En este trabajo se incluyó un ensayo adicional *in vitro*, en el que se mostró con la técnica de Southern blot que la exposición a permetrina induce rupturas en el gen *KMT2A* en la línea celular BV173 (85). Otro estudio que destacó la asociación entre piretroides y leucemia pediátrica a nivel molecular se realizó en una población de agricultores de arroz de las Filipinas. En este estudio se encontró que la incidencia de la fusión oncogénica *RUNX1-RUNX1T1* en sangre de cordón umbilical de neonatos expuestos *in utero* a propoxur y cipermetrina se asoció con la detección de mayores niveles de plaguicidas en meconio de los recién nacidos. Adicionalmente, se ha reportado en individuos expuestos a mezclas de plaguicidas una alta recurrencia de la fusión *IGH-BCL2*, sin embargo no se ha definido con certeza el tipo particular de plaguicida que pueda genera esta fusión oncogénica (86). Aunque esta fusión es característica de linfoma en adultos, se sabe que el gen *IGH* también sufre alteraciones en LLA B; fusionándose con distintos genes, los cuales quedan bajo la regulación de su potenciador y provocando así desregulación en el gen pareja (87). Estos resultados mostraron que la exposición a plaguicidas puede ser un factor causal para la generación de rearrreglos genéticos, que representan el primer paso en el desarrollo de leucemia (88). A pesar de que son muy pocos los estudios que muestran la asociación entre piretroides y la generación de alteraciones leucemogénicas específicas, diversos trabajos han estudiado la capacidad genotóxica de estos agentes; adicionalmente, sus diversos efectos a nivel celular y molecular han sido abordados.

1.10 Efectos celulares y moleculares de los piretroides potencialmente asociados a carcinogénesis

A través de estudios *in vitro* se ha sugerido que los piretroides tienen diversos efectos genotóxicos en diferente grado. Sin embargo, el número de estos trabajos es limitado y los resultados no son completamente concordantes. A través de ensayos de genotoxicidad como micronúcleos, ensayo cometa, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas, se ha sugerido que los piretroides pueden inducir daño y rupturas en el DNA, aberraciones cromosómicas estructurales así como aneuploidía en linfocitos de sangre periférica y en otros sistemas (89–91,91–100). Sin embargo, en algunos trabajos no se ha encontrado que los piretroides tengan un efecto genotóxico, o se ha detectado daño sólo con algunas concentraciones o dosis (96,97,101,102). Esto ha hecho difícil que se puedan clasificar como carcinógenos, o que se descarte por completo esta posibilidad. Adicionalmente, *in vivo* a través de modelos murinos, se ha sugerido que los piretroides pueden generar pérdidas o ganancias de cromosomas (aneuploidía) y aberraciones cromosómicas estructurales (103–105). El potencial de los piretroides de inducir daño al DNA ha sido estudiado desde hace varios años; sin embargo, hasta hace poco se demostró su capacidad de interactuar directamente con el DNA (106,107). La permetrina interactúa con el DNA a través de intercalación parcial y por unión directa a los surcos mayor y menor del DNA y se ha observado que este agente tiene mayor afinidad por regiones ricas en pares de bases GC, que se caracterizan por estar localizados en regiones de alta densidad génica. Además del posible efecto genotóxico, la capacidad de los piretroides de inducir cambios epigenéticos y en la expresión génica, ha sido un tema de interés.

Se ha mostrado que los piretroides tienen la capacidad de modificar la metilación y la expresión génica. En estudios *in vivo* se reportó que estos agentes pueden alterar la metilación del DNA, llevando a alteraciones a nivel reproductivo (108,109). Sin embargo, la capacidad de los piretroides de producir cambios en la metilación del DNA, con un enfoque en cáncer hematológico, debe investigarse. La modificación de los patrones epigenéticos es de gran importancia, ya que pueden llevar a la sobreexpresión de oncogenes o al silenciamiento de genes supresores de tumores, contribuyendo al proceso carcinogénico

(25). En líneas celulares de cáncer de mama se reportó que algunos piretroides son capaces de alterar la expresión del gen *pS2*, llevando a disrupción estrogénica (110). Adicionalmente, en un estudio *in vitro* independiente se demostró que los piretroides modifican la expresión del gen *WNT10B*, el cual, junto con otros genes de la vía WNT, ha sido implicado en el desarrollo de leucemia (111,112). Además del efecto genético y epigenético de los piretroides, sus efectos a nivel de la función celular han sido abordados.

Se ha descrito que los piretroides también poseen la capacidad de actuar a nivel de la diferenciación celular; por ejemplo, se ha determinado que tienen efecto en la hematopoyesis. En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha mostrado que piretroides como la cipermetrina pueden inhibir la proliferación y diferenciación de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (113,114). Este efecto es importante porque las células troncales y progenitoras son las que producen todas las células de la sangre, incluyendo la serie linfoide. Más aún, el arresto en la diferenciación de estas células o de sus precursores es una característica de la leucemia. Estos hallazgos proveen evidencias mostrando que los piretroides son capaces de afectar el sistema hematopoyético. Adicionalmente, se ha reportado que los piretroides pueden afectar el sistema inmune a nivel celular, inhibiendo la producción de citocinas y de anticuerpos, así como alterando la función de los macrófagos (115–118). La disrupción del sistema inmune podría contribuir aún más al desarrollo del cáncer, y de hecho es un rasgo característico de esta enfermedad (25).

Además de las alteraciones a nivel celular mencionadas, otros efectos asociados a los piretroides han sido investigados. Se ha mostrado que los piretroides pueden actuar como disruptores endócrinos, como agonistas o antagonistas de los receptores de estrógenos, andrógenos y de hormonas tiroideas (119–121). El efecto a nivel de receptores endócrinos es importante ya que puede asociarse a cambios en la proliferación celular, en la remodelación de la cromatina y en la expresión génica (122,123). Por otro lado, se ha demostrado que los piretroides pueden inducir daño en el DNA a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), lo cual está asociado con el desarrollo de cáncer (92,124–127).

En resumen, los diversos efectos celulares y moleculares de los piretroides, podrían asociarse con el proceso carcinogénico. Efectos como la inestabilidad cromosómica, las modificaciones epigenéticas, cambios transcripcionales, así como cambios en la proliferación y diferenciación celular entre otros, son rasgos característicos de la leucemia y otros tipos de cáncer (25). A pesar de la evidencia a diferentes niveles sugiriendo que la exposición a piretroides podría estar asociada con el desarrollo de leucemia, aún se considera que esta evidencia es insuficiente y controvertida, y se requiere más investigación para mostrar si los piretroides tienen el potencial de promover el desarrollo de esta enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

La exposición global a permetrina ha causado preocupación porque a nivel epidemiológico se ha sugerido una asociación con mayor riesgo de cáncer hematológico. En niños se ha asociado principalmente con leucemia pediátrica (LLA B) y en adultos con mieloma múltiple. La LLA es la segunda causa de muerte en niños y se considera un problema de salud. Aunque a nivel epidemiológico hay sospecha de que la exposición a permetrina contribuye al desarrollo de LLA B, se considera que no hay suficiente evidencia derivada de ensayos *in vivo* e *in vitro* demostrando que este agente participa al desarrollo de esta enfermedad; por lo que se requiere investigación que demuestre que la permetrina induce eventos asociados a leucemogénesis.

En este trabajo se estudió si la permetrina es capaz de promover eventos biológicos que están implicados en el proceso de múltiples pasos para el desarrollo de la leucemia. Con base en un modelo *in vitro* se analizó si la permetrina induce alteraciones genéticas leucemogénicas, así como si genera cambios en la expresión y metilación génica; en el modelo murino se estudió *in vivo* si la exposición a permetrina causa cambios en la diferenciación linfocitaria B. Este trabajo contribuye a aportar evidencia sobre la plausibilidad biológica de la asociación entre la exposición a permetrina y el desarrollo de la LLA B, que se ha sugerido en estudios epidemiológicos.

3. HIPÓTESIS

La exposición a permetrina provoca alteraciones a nivel genético (rupturas y fusiones génicas), epigenético (metilación), y de la expresión génica, lo que afecta el potencial de diferenciación del linaje linfoide B.

4. OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la permetrina en la generación de alteraciones genéticas, epigenéticas, y en la generación de cambios en el potencial de diferenciación del linaje linfoide B, los cuales son eventos asociados a LLA B.

a) Evaluar el efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en la generación de alteraciones genéticas características de la LLA B, y en la modificación de la expresión y metilación génica en células de origen hematopoyético.

b) Evaluar el efecto de la exposición *in utero* a permetrina en la inducción de daño en el DNA, así como en la alteración en el potencial de diferenciación hacia el linaje linfoide B en ratones expuestos durante el desarrollo embrionario.

5. METODOLOGÍA

5.1 Experimentos para evaluar el efecto de la permetrina *in vitro*

Para estudiar si la permetrina induce alteraciones genéticas asociadas a leucemia se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs del inglés Peripheral blood mononuclear cells) de donadores sanos. Se incluyeron dos varones, no fumadores de entre 26 y 30 años de edad, que aceptaran participar en el proyecto mediante la firma de una carta de consentimiento informado (**Anexo 1**). Se evaluó mediante citogenética clásica si la permetrina induce alteraciones estructurales en los genes *KMT2A*, *IGH*, y *ETV6-RUNX1*, así como cambios numéricos en los cromosomas 12, 14/21 y 18, las cuales son alteraciones características de la LLA. Adicionalmente, se buscó mediante técnicas moleculares si la permetrina es capaz de inducir las fusiones específicas *KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1*, e *IGH-BCL2* en las PBMCs, así como en líneas celulares hematopoyéticas. A nivel *in vitro*, también se evaluó si la permetrina genera cambios en la expresión y metilación génica, a través de microarreglos de expresión y metilación; para estos estudios se incluyeron por una parte PBMCs y también células mononucleares de médula ósea (BMMCs, del inglés Bone Marrow Mononuclear Cells), obtenidas a partir de muestras usadas para trasplante, de las cuales se usó un remanente que no afectó el proceso del trasplante. Se incluyeron dos individuos menores a 30 años de edad, sanos, y que previo consentimiento informado, aceptaron que se usara una fracción de la médula ósea donada para este proyecto. Además de la permetrina, en todos los experimentos *in vitro*, se incluyó el insecticida malatión, con el cual nuestro grupo trabajó en estudios previos a este. Los insecticidas organofosforados también son ampliamente utilizados y se ha sugerido que pueden estar asociados con cáncer hematopoyético; de hecho, este agente ya ha sido reclasificado por la IARC y actualmente se considera como probable carcinógeno para el ser humano (Grupo 2A), por lo que contrastar los efectos de este agente con los de la permetrina fue de interés.

5.1.1 Efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en la generación de rearrreglos génicos por citogenética y biología molecular.

El efecto de la permetrina en la generación de rearrreglos en genes asociados a leucemia se estudió mediante las técnicas hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, del inglés Fluorescence *in situ* hybridization) (**Sección 5.1.1.1**) y PCR anidada (**Sección 5.1.1.2**).

5.1.1.1 Efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en la generación de alteraciones genéticas: Análisis de los genes *KMT2A*, *IGH*, *ETV6-RUNX1* y de aneuploidía mediante citogenética molecular.

Se estudió si la exposición *in vitro* a permetrina induce rearrreglos en los genes *KMT2A*, *IGH*, y *ETV6-RUNX1* así como aneuploidía, por medio de la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia en PBMCs de donadores sanos.

5.1.1.1.1 Cultivo celular y tratamiento. Mediante separación por gradiente de densidad usando medio Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de dos individuos sanos, previo consentimiento informado. Las PBMCs ($5-7 \times 10^5$ células/mL) se mantuvieron en cultivo durante 72 h a 37°C y 5% CO₂, en medio RPMI 1640 (Gibco, Life technologies, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco, Life technologies, USA), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, Life technologies, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, Life technologies, USA) y 2% de fitohemaglutinina (Gibco, Life technologies, USA). Al inicio de los cultivos la viabilidad fue siempre mayor a 98%. Se incluyó un ensayo agudo utilizando una concentración alta de 200 µM de permetrina (mezcla de isómeros 40:60 cis:trans, CAS no. 52645-53-11; Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) aplicada por única vez, a las 48 h de iniciado el cultivo; y además se incluyó un ensayo crónico, con una concentración baja de permetrina (0.1 µM), aplicada de manera continua a las 0, 24 y 48 h. Como control negativo se incluyeron cultivos expuestos a 0.4% de DMSO. Debido a que el etopósido es un agente clasificado como carcinógeno por la IARC (Grupo 1), se utilizó como control positivo utilizando 10 µM para la exposición aguda, y 1 µM para el modelo crónico. Además de los ensayos con permetrina se

incluyó malatión (200 μM y 0.1 μM), ya que se trabajó con este insecticida en los ensayos iniciales de esta investigación y debido a que es un agente que ya se considera como posible carcinógeno por la IARC (Grupo 2B). Como control negativo de malatión se incluyeron 0.2% de etanol o DMSO para los experimentos de expresión y metilación. Para ambos insecticidas, cada tratamiento se realizó por triplicado (tres repeticiones por individuo).

Después de haberse completado 72 h de cultivo, se determinó la viabilidad celular y se procedió con la cosecha celular. Para la obtención de células en metafase, se incubó con colchicina [8 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) durante 90 minutos a 37 °C, posteriormente las células se hipotonizaron con KCL 0.075M (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) por 20 minutos a 37 °C, y se fijaron y lavaron con solución de Carnoy (metanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1) (Merck, Darmstadt, Germany).

5.1.1.1.2 Viabilidad Celular. Se determinó mediante exclusión con azul tripano (Gibco, Life technologies, USA) y por medio de citometría de flujo con 7AAD (BD Biosciences, San Diego CA, USA).

5.1.1.1.3 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para el análisis de los genes y de aneuploidía. Se realizaron preparaciones celulares mediante goteo y se procedió con el protocolo estándar de FISH de acuerdo a lo recomendado por cada casa comercial. Para el análisis se utilizó un microscopio AXIO Imager M1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Las imágenes se analizaron y capturaron mediante el software ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Germany). El análisis de los genes *KMT2A* e *IGH* se realizó mediante sondas de segregación de doble color (Vysis Abbott, Illinois, USA). En estas sondas hay dos porciones marcadas, una con fluorocromo naranja y otra con verde, que flanquean el punto de ruptura del gen, que es donde mayormente ocurren. Con este formato de sonda, cuando el gen es normal, ambas porciones colocalizan y dan como resultado una señal amarilla, por lo que una célula normal es aquella que presenta dos señales amarillas. Por el contrario, cuando el gen sufre rupturas, ambas porciones naranja y verde se separan, y se detectan como señales individuales y no como una señal fusionada amarilla. Una célula con uno de los alelos rotos tendría una señal amarilla (alelo normal), una señal naranja y otra verde (alelo roto) (**Figura 5a y 5b**). Para el

análisis de los genes *ETV6* y *RUNX1* se empleó una sonda de fusión de doble color (Vysis), esta sonda marca de un color cada gen *ETV6* (verde) y *RUNX1* (naranja); una célula normal es aquella con dos señales verdes y dos naranjas. Cuando existe fusión de los genes, se genera una señal en la que colocan ambas señales verde y naranja, por lo que se aprecia de color amarillo. Una célula con una fusión *ETV6-RUNX1*, tendría una señal amarilla (fusión *ETV6-RUNX1*), una señal verde (*ETV6* normal) y una señal naranja (*RUNX1* normal) (**Figura 5c**). El estudio de aneuploidía se realizó mediante sondas centroméricas para los cromosomas 12, 18, y 14/22 (Oncor) (**Figura 5d**), marcadas con diferente color; el cromosoma 12 con verde, 14/22 con amarillo y 18 con naranja. Por lo que una célula normal tendría dos señales verdes, dos naranjas y cuatro amarillas. Por el contrario, una célula con ganancia o pérdida de señales verdes, naranjas y amarillas representaría una aneuploidía. Para cada condición de tratamiento se incluyeron seis repeticiones (tres por individuo). Se analizaron 1000 células en interfase en cada muestra (6 por tratamiento), para el ensayo agudo y para el crónico se analizaron 500 interfases y 30 metafases. Los criterios de análisis se detallan en el **Anexo 2**.

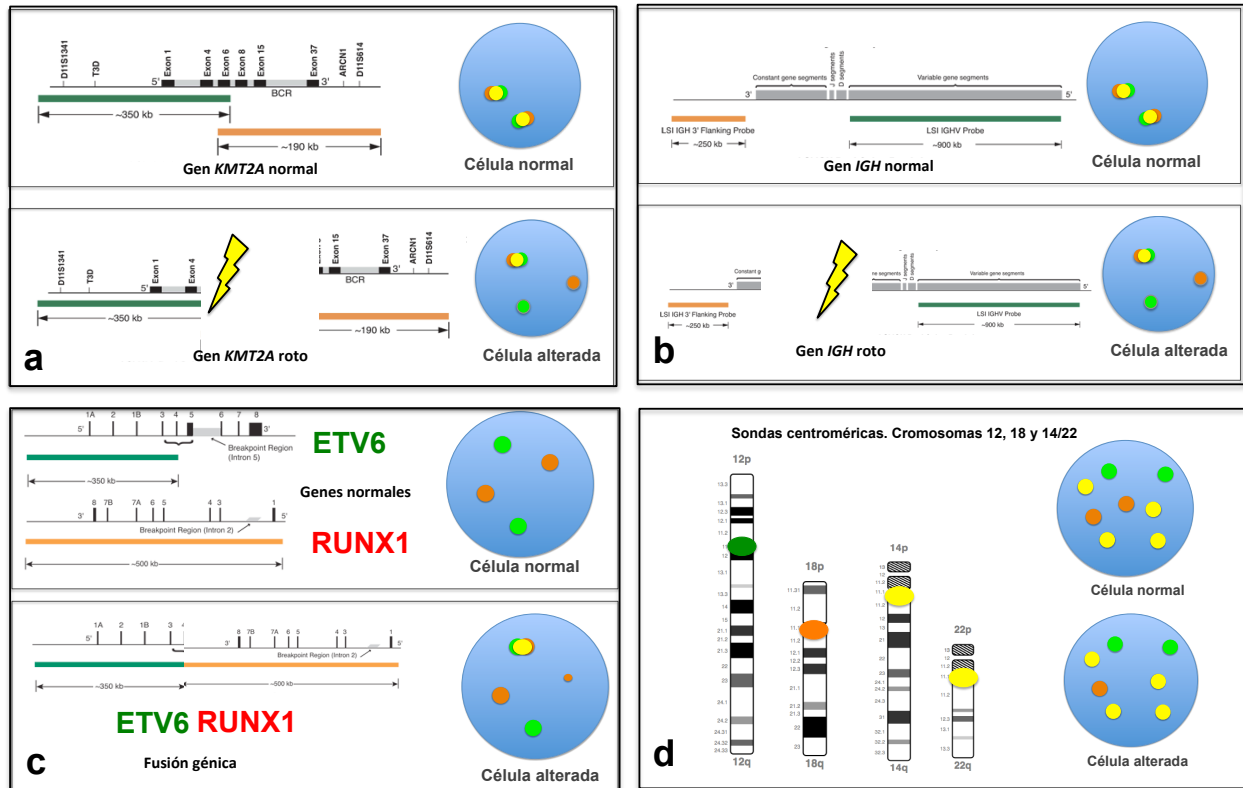


Figura 5 Diseño de sondas de hibridación *in situ* utilizadas. **a)** Sonda de ruptura de doble color para detección de alteraciones en el gen *KMT2A*. **b)** Sonda de ruptura de doble color para detección de alteraciones en el gen *IGH*. **c)** Sonda fusión de doble color para detección de la fusión *ETV6-RUNX1*. **d)** Sondas centroméricas para la detección de aneuploidía

5.1.1.1.4 Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones entre grupos (disolvente vs insecticida) mediante la prueba de U-Mann Whitney ($p < 0.05$) de una cola. Se utilizó el software SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para las pruebas estadísticas.

5.1.1.2 Efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en la generación de fusiones génicas: Análisis de *KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1* e *IGH-BCL2* mediante técnicas moleculares.

Para saber si la exposición *in vitro* a permetrina induce fusiones oncogénicas específicas (*KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1* e *IGH-BCL2*), se analizaron PBMCs de donadores sanos expuestos de manera aguda a permetrina por medio de RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) anidado. El cultivo y tratamiento de los PBMCs se realizó de la misma manera que se

describió en la **sección 5.1.1.1**. Adicionalmente, se incluyeron ensayos con la línea celular K562, con la cual se analizó el efecto agudo y crónico de la permectrina ya que se puede mantener el cultivo por períodos prolongados.

5.1.2.1 Cultivo y tratamiento de células de la línea K562. Las células K562 son células hematopoyéticas multipotentes derivadas de un paciente con una leucemia mielógena crónica (ATCC CCL-243) (128). Las células fueron cultivadas a 37 °C y 5% CO₂ a una densidad de 5-7x10⁵ células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA), 1% piruvato de sodio (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA), 1% L-Glutamina (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA) y 1% antibiótico antimicótico (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA). Se realizó una exposición crónica de dos semanas en la que se trataron las células cada tercer día con 0.1 µM de permectrina o DMSO. Adicionalmente, se incluyó un experimento agudo en el que se trataron las células K562 por 24 h con 0.1 µM de permectrina.

5.1.2.2 PCR anidada para detección de fusiones génicas. Posterior al cultivo, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA), previo a la extracción de ácidos nucleicos. Las fusiones *KMT2A-AFF1* y *ETV6-RUNX1* se analizaron mediante RT-PCR anidado, para lo cual se hizo extracción de RNA mediante el método de Trizol, de acuerdo al protocolo de la casa comercial (Invitrogen, UK). La integridad del RNA fue verificada mediante un gel de electroforesis y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Epoch (BioTek, USA). Se obtuvo cDNA mediante el “kit” comercial Transcriptor First Strand cDNA kit (Roche, Germany). Se verificó el cDNA mediante la amplificación del gen *GAPDH*. Ambas fusiones, *KMT2A-AFF1* y *ETV6-RUNX1* fueron analizadas por RT-PCR anidado, utilizando pares de oligonucleótidos previamente reportados por van Dongen et al., (1999) (129) **Anexo 3**. Como control positivo se utilizaron cDNAs de las líneas celulares RS4 y REH, las cuales son positivas para la fusión *KMT2A-AFF1* y *ETV6-RUNX1*, respectivamente. La amplificación de la fusión *KMT2A-AFF1* en la línea RS4 genera un producto de 502 pares de bases (pb), y la amplificación de la fusión

ETV6-RUNX1 en la línea REH origina dos productos, uno de 180 pb y otro de 140 pb. Las condiciones de la RT-PCR se siguieron exactamente como lo recomendado por van Dongen et al., (1999) (129). Para la primera reacción de PCR (volumen final 50 μ L), se utilizaron 5 μ L de cDNA mezclados con 400 nM de los iniciadores A y B, 200 μ M de dNTPs, 2.5 mM de $MgCl_2$, 1 unidad de enzima Taq y amortiguador PCR (20 Mm Tris HCL, 50 mM KCL). La PCR consistió en un ciclo inicial de 30 s a 95 °C y 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 65 °C y 60 s a 72 °C; la reacción fue detenida a 10 °C. Para la PCR anidada se utilizaron 5 μ L del producto de la primera reacción y los mismos componentes, sustituyendo los iniciadores A y B por los C y D; se usaron los mismos ciclos de PCR que para la primera reacción.

La fusión génica *IGH-BCL2* fue analizada por PCR anidada. Se realizó extracción de DNA mediante el “kit” comercial QIAMP DNA extraction midi kit (Qiagen, Germany); la integridad se verificó mediante electroforesis en gel y se cuantificó con el equipo Epoch (BioTek, USA). Las reacciones de la PCR anidada se realizaron utilizando los pares de cebadores y condiciones reportadas por Fuscoe et al., (1996) y Roulland et al., (2004) **Anexo 4** (86,130). Se mezclaron 2.5 μ L de DNA con 200 nM de cada iniciador, 200 μ M de dNTPs, 2 unidades de DNA Taq polimerasa y amortiguador de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$). La primera reacción de PCR consistió en un ciclo de 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 60 °C, 1 minuto a 72 °C y 1 min a 94 °C. Se realizó una extensión final de 5 min a 72 °C. Para la PCR anidada se utilizó 1 μ L del producto de la primera reacción mezclado con los mismos reactivos a las mismas concentraciones usadas en la primera PCR. Para la segunda reacción se emplearon 20 ciclos de 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C y 1 min a 94 °C. Como control positivo se utilizó DNA de un “kit” comercial de detección de la translocación t(14;18) (Light Cyler t(14:18) Quantification Kit (mbr), Roche, Germany). Los productos de la reacción obtenidos fueron de 300-1000 pb, como lo reportado por Fuscoe et al., (1996) (130). Se hicieron comparaciones entre los productos de PCR de las células expuestas a insecticida y las expuestas al disolvente.

5.1.2 Efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en la generación de cambios en la expresión y metilación génica.

Se estudió si la permetrina *in vitro* genera cambios en la expresión génica en PBMCs y en BMMCs así como en la metilación génica en BMMCs, utilizando microarreglos de expresión y metilación. Se seleccionaron cinco genes que fueron utilizados para validación de la expresión mediante qPCR (quantitative PCR).

5.1.2.1 Cultivo celular de PBMCs y BMMCs y tratamiento. Para el cultivo de PBMCs se obtuvieron aproximadamente 30 mL de sangre de dos donadores sanos. Se realizó separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad con Lymphoprep y se sembraron por triplicado en medio RPMI 1640 con 10% de SFB. Para el cultivo de BMMCs se emplearon aproximadamente 10 mL de médula ósea, a partir de un remanente de muestra que ya no fue empleado en el proceso de trasplante de médula ósea. Se realizó separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad con Lymphoprep y se sembraron cultivos por triplicado en medio RPMI 1640 con 10 % de SFB. Ambos tipos de cultivo, de PBMCs y BMMCs, se expusieron tanto a permetrina 0.1 μ M como a malatión 0.1 μ M, así como a 0.2 % de DMSO como control negativo. Los agentes fueron aplicados a las 0, 24 y 48 h.

5.1.2.2 Extracción de ácidos nucleicos y microarreglos. Finalizado el cultivo a las 72 h, se hizo un lavado con PBS 1X (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA) y se determinó la cuenta y viabilidad celular por el método de exclusión con azul tripano (Gibco, Life technologies, USA, Life technologies, USA). Se separaron células para conservar RNA en trizol (1×10^6 células en 300 μ L trizol). El resto de las células se utilizó para la extracción de DNA mediante Qiamp DNA midiKit, Qiagen. Se prepararon mezclas en partes iguales de las muestras provenientes de ambos donadores sanos de médula ósea y de sangre periférica, para obtener muestras finales que contenían igual cantidad de células en trizol de cada individuo o cantidades iguales de DNA de cada individuo. Para los microarreglos de expresión se utilizó el microarreglo de Agilent "Human GE 4x44K v2 Microarray" (G4845A).

En cada microarreglo (de PBMCs y de BMMCs) se pusieron a hibridar cRNA (RNA antisentido) de células expuestas a insecticida junto con cRNA de células expuestas a disolvente (DMSO), el procesamiento del RNA hasta la extracción de datos fue realizado por el Laboratorio Genetadi, Bilbao España, de acuerdo a lo establecido en el protocolo de Agilent USA (131). En resumen, a partir de cada muestra se hizo extracción de RNA, el cual fue amplificado y marcado con un fluorocromo para producir cRNA Cy5 o Cy3 mediante el “kit” Low Input Quick Amp Labeling two color kit (Agilent, USA) en presencia de un control spike-in (control exógeno) de dos colores. Posterior a la purificación el cRNA marcado de cada muestra fue hibridado en el microarreglo G4845A Human GE 4x44K v2 (Agilent, USA); este microarreglo contiene secuencias de RNA de 27,958 genes de la base Entrez Gene. Posterior a la hibridación, se hizo el escaneo del microarreglo mediante el escáner Agilent G2505 scanner (Agilent, USA), y la extracción de datos con el software Feature Extraction software (Agilent, USA). El análisis y procesamiento de datos se realizó mediante el programa Gene Spring (Agilent, USA).

Para el análisis de metilación del DNA se utilizaron 6-12 µg de DNA de cada muestra de BMMCs expuestas a permetrina, a malatión o al disolvente, a partir del cual se hizo sonicación y se procedió con la inmunoprecipitación del DNA metilado. Después de ser lavado y purificado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se hizo marcaje con Cy5; el control de DNA genómico fue marcado con Cy3. Posteriormente, tanto el DNA inmunoprecipitado como el control de DNA genómico fueron hibridados en el Agilent “Human DNA Methylation Microarray” (G4495A-023795) 1x244K, el cual cubre 27,627 islas CpG de regiones promotoras y no promotoras. Se realizó el lavado, el escaneo y la extracción de datos. El procesamiento del DNA hasta la extracción de datos fue realizada por el Laboratorio Genetadi Biotech, Bilbao España, de acuerdo a lo establecido en el protocolo recomendado por Agilent, USA (132). El análisis de datos se hizo mediante el programa Agilent Workbench.

5.1.2.3 Análisis de datos. El análisis de datos de expresión se realizó mediante el software Gene Spring GX 14.9 Agilent, a partir del cual se obtuvieron las listas de genes con un cambio en la expresión respecto al control, se utilizó como valor de corte un cambio (*fold*

change) mayor a 2. Se seleccionaron los cien genes con mayor sobreexpresión y los cien genes con expresión más baja. A partir de las listas de los genes totales, y las listas de los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión, se hizo búsqueda de funciones moleculares, procesos biológicos, componentes celulares, clases de proteínas y vías de señalización mediante el sistema PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) Pathways 14.1 que pertenece al proyecto Gene Ontology Reference Genome Project (GO) (133). Con la herramienta PANTHER se analizó la distribución de las categorías para cada ontología: “función molecular”, “función biológica”, “clase de proteína”, “vías” y “componente celular”; adicionalmente, se realizó la prueba estadística de sobrerrepresentación (overrepresentation test tool), la cual compara mediante prueba de Fisher ($p < 0.05$ significativa) la lista de genes de interés con la lista de referencia y determina si una clase particular de genes está sobre representado; el algoritmo que utiliza esta prueba estadística se ha reportado previamente (134). Además, se analizó la interacción entre los cien genes con sobreexpresión y con baja expresión utilizando la herramienta web GeneMANIA (135).

A partir de los datos de expresión génica obtenidos, se hizo una selección de 78 genes cuyo grado de metilación fue analizado mediante el programa Workbench 7.0, Agilent, se hicieron comparaciones entre la muestra expuesta al insecticida con la expuesta al disolvente. Se compararon los factores Z de cada gen, considerando de acuerdo al protocolo, un factor Z muy alto y positivo como metilado y un factor Z muy bajo o negativo como no metilado. El análisis se enfocó a cambios en la metilación en regiones promotoras, se analizó la concordancia entre los cambios en la metilación y las modificaciones en la expresión. Se comparó la suma de valores de Z de las diversas sondas (en región promotora) del gen expuesto a DMSO contra la suma de valores de Z de las distintas sondas (en región promotora) del gen expuesto a insecticida. Se consideraron aquellos genes en los que la diferencia de sumas de Z entre disolvente e insecticidas fue mayor a 20.

5.1.2.4 Validación por qPCR. A partir de los datos obtenidos del análisis de expresión génica se seleccionaron cinco genes, cuyo cambio de expresión inducido por la exposición a permetrina o malatión fue determinado mediante qPCR en muestras de PBMCs y BMMCs

independientes a las utilizadas para realizar los microarreglos. Se realizó cuantificación relativa de los niveles de expresión de los transcritos de los genes *IL6*, *PCDH15*, *PCDH9*, *DSP* y *LYPD1*, utilizando un instrumento LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Se procedió como se describió en la **sección 5.1.2.1**. Finalizado el cultivo y tratamiento, se realizó extracción de RNA por el método de Trizol, y se verificó la integridad mediante gel de agarosa, y se cuantificó con Epoch (BioTek). Posteriormente, se procedió con la obtención de cDNA mediante el “kit” comercial Transcriptor First Strand cDNA kit (Roche, Germany). La amplificación por qPCR del cDNA se realizó utilizando sondas de expresión TaqMan de la Universal Probe Library System (Roche Applied Science, Germany). Los pares de oligonucleótidos empleados para cada gen y las sondas respectivas se describen en el **Anexo 5**. La cuantificación de transcritos se calculó mediante el método $\Delta\Delta CT$, usando el gen *GUSB* como control endógeno para la normalización de los datos. Cada determinación se realizó por duplicado.

5.2 Experimentos para evaluar el efecto de la permetrina *in vivo*

Se evaluó si la exposición a permetrina durante el desarrollo induce daño en el DNA, así como alteraciones en la diferenciación linfocítica en ratones BalbC. Se determinó el daño en el DNA en la médula ósea de ratones de neonatos expuestos *in utero* a permetrina, mediante la histona H2AX fosforilada evaluada por citometría de flujo. La histona H2AX sufre fosforilación cuando existen DSB, por lo que permite detectar aquellas células en las que hubo daño al DNA. Para determinar si la exposición *in utero* a permetrina genera un arresto en la diferenciación de linfocitos proB hacia células B inmaduras, se obtuvieron líneas celulares de linfocitos proB, las cuales posteriormente fueron puestas en condiciones de cultivo que permitieran el progreso hacia células B inmaduras. Se evaluaron con citometría de flujo las poblaciones de linfocitos proB, preB y B inmaduros haciendo comparaciones entre los ratones expuestos a permetrina y los expuestos al control negativo.

5.2.1. Obtención de ratonas gestantes y tratamiento con permetrina durante la gestación. Se utilizaron ratones de la cepa BalbC (Envigo), los cuales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. Se les dio agua y comida *ad libitum* antes y

durante los experimentos. Se establecieron parejas de hembra y macho y realizaron cruza, durante toda la noche; a la mañana siguiente se determinó la existencia de cópula con base en presencia del tapón vaginal, considerando ese día como el 0.5 de gestación. Diariamente se registró el peso de las ratonas gestantes y se les dio tratamiento con permetrina disuelta en aceite de ajonjolí, a los días de gestación 8.5, 10.5, 12.5, 14.5 y 16.5. Se incluyeron cuatro dosis de permetrina (3, 9, 18 y 30 mg/Kg), así como un grupo expuesto al control negativo (aceite de ajonjolí); cada grupo consistió de tres ratonas gestantes.

5.2.2. Obtención de médula ósea de las crías expuestas. Las crías expuestas durante su desarrollo fueron sacrificadas por dislocación cervical al día 10 postnatal. Se registró el peso de cada cría y el sexo, así como el tamaño y peso de hígado y bazo. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron con la prueba ANOVA (Graph Pad Prism 6.0). Se obtuvieron los huesos de las patas, fémur y tibia de cada cría; la médula ósea se extrajo con una jeringa de insulina circulando PBS 1X con 5% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco, Life technologies, USA) en la cavidad ósea. Posteriormente se hizo lisis de eritrocitos con solución de NH_4Cl y lavados con PBS 1X con 5% de SFB y 1% de antibiótico. Se determinó el número y la viabilidad celular por medio de azul tripano (Gibco, Life technologies, USA). Una fracción de las células fue reservada para congelar, otra para fijar con formaldehído para experimentos de citometría de flujo y otra fracción se utilizó para establecer cultivos.

5.2.3 Establecimiento de líneas celulares de linfocitos proB y ensayo de diferenciación.

A partir de la mezcla de células de tres crías hembra de cada camada, se establecieron cultivos que fueron mantenidos en medio IMDM (Gibco, Life technologies, USA) suplementado con 10% SFB (Gibco, Life technologies, USA), 1% OPI (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA), 1% aminoácidos no esenciales (Gibco, Life technologies, USA), 1% de antibiótico antimicótico (Gibco, Life technologies, USA), 1% de L-Glutamina (Gibco, Life technologies, USA), 50 μM de 2-Mercaptoetanol (Gibco, Life technologies, USA) y 10 ng/mL de Interleucina 7 (IL7) (PeproTech, New Jersey, USA). Los cultivos fueron mantenidos a densidad de $1-5 \times 10^6$ células/mL en placas de 6 pozos durante aproximadamente 2.5 meses, después de lo cual se logró la obtención de líneas celulares de linfocitos proB. Las células proB de cada camada (3 camadas por dosis de permetrina o aceite) fueron utilizadas para el

ensayo de diferenciación, en el que se determinaron la cantidad de células proB, preB y B inmaduras por citometría de flujo. Se utilizaron los marcadores (B220, CD43, CD22 e IgM) para definir cada población de linfocitos: a) proB (B220+, CD43+, CD22-, IgM-), b) preB (B220+, CD43-, CD22+, IgM-), y c) B inmaduros (B220+, CD43-, CD22+, IgM+). Los anticuerpos utilizados fueron PerCP-B220/FITC-CD43/PE-CD22/APC-IgM (BD Biosciences); el análisis de las muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS ARIA II BD Biosciences. Los datos fueron analizados con el software Flow Jo, LLC. Se montaron cultivos de células proB en ausencia de IL7, y se monitoreó la cantidad de células de cada población de linfocitos B a las 0, 24, 48 y 72 h. En cada punto se hicieron comparaciones entre las poblaciones de linfocitos B provenientes de ratones expuestos a permetrina contra los expuestos al vehículo (aceite). Adicionalmente, se comparó la proliferación y viabilidad celular entre grupos. El análisis estadístico se hizo mediante la prueba de Chi-cuadrada, considerando significativa una $p < 0.05$, utilizando el programa Graph Pad Prism 6.0.

5.2.4 Evaluación de daño al DNA. Se analizó el daño al DNA en células de médula ósea de ratones neonatos expuestos *in utero* a permetrina. A partir de ratones de 10 días de nacidos se obtuvo médula ósea como se describió en la **sección 5.2.2**. A partir de una mezcla de células de diferentes crías de la misma camada, se determinó mediante citometría de flujo el nivel de rupturas de DNA (DSBs del inglés, double strand breaks), analizando la histona H2AX fosforilada, la cual marca sitios en donde existen DSBs. Posterior a la obtención de las células se hizo lavado y cuantificación para proceder con la fijación con 4% de formaldehído. Las células se permeabilizaron utilizando una solución 0.1% de tween 20, se lavaron y posteriormente se marcaron durante toda la noche; al día siguiente se lavaron y se analizaron en un citómetro FACS ARIA II (BD Biosciences). Se analizaron los marcadores B220, CD43, IgM y γ H2AX. Se hicieron comparaciones entre los grupos expuestos y los no expuestos mediante la prueba de Chi-cuadrada, considerando un $p < 0.05$ como significativa. Además del experimento en células de médula ósea de ratones neonatos expuestos *in utero* a permetrina, se incluyó un ensayo *in vitro* en el que se expusieron linfocitos proB inmortalizados (obtenidos de ratones neonatos BalbC no expuestos durante el desarrollo) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de permetrina, y por medio de citometría de flujo se evaluaron rupturas de doble cadena en el DNA. Se comparó el nivel de H2AX

fosforilada en las muestras tratadas con insecticida contra las tratadas con disolvente (DMSO). El análisis estadístico se hizo como se mencionó previamente.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto de la permetrina *in vitro*

Se evaluó el efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en: a) la generación de alteraciones génicas asociadas a leucemia y en b) cambios en la expresión y metilación génica.

6.1.1 Efecto de la permetrina en la generación de alteraciones genéticas

Se analizó por citogenética molecular y por técnicas moleculares si la permetrina induce alteraciones genéticas asociadas a LLA.

6.1.1.1 Evaluación del efecto de la permetrina en la generación de aneuploidía y daño en los genes *KMT2A*, *IGH* y *ETV6-RUNX1* por citogenética

Para determinar si la exposición a insecticidas induce rupturas y otras alteraciones en genes asociados a leucemia, se analizaron por medio de FISH PBMCs expuestos *in vitro* a permetrina, incluyendo dos esquemas de exposición, aguda (200 μ M, 24 h) y crónica (0.1 μ M, 72 h).

6.1.1.1.1 Efecto de la exposición aguda a insecticidas

De acuerdo al ensayo de exclusión con azul tripano y al estudio de viabilidad por citometría de flujo con 7AAD, no se encontró una reducción significativa en la viabilidad en los cultivos expuestos 24 h a una concentración de 200 μ M de permetrina o malatión. En todos los ensayos de FISH (*KMT2A*, *IGH*, *ETV6-RUNX1* y aneuploidía), la frecuencia de células con alteraciones tuvo tendencia al incremento en los cultivos tratados con insecticida (permetrina o malatión), comparados con los controles (DMSO o etanol). Se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en aquellos cultivos tratados con permetrina. Con respecto al gen *IGH*, se encontró que la permetrina incrementó significativamente la frecuencia de células con ruptura clásica de este gen, es decir aquellas células que presentaban un patrón de fluorescencia de 1 señal fusionada amarilla (alelo normal), 1 señal naranja (alelo roto, fragmento 3) y 1 señal verde (alelo roto, fragmento 5') ($p=0.032$). No se encontró diferencia significativa entre malatión y etanol respecto a las rupturas en el gen *IGH* (**Figura 6**).

Las mayores frecuencias de células alteradas se observaron en el ensayo de *KMT2A*. Tanto el malatión como la permetrina incrementaron de manera significativa la ocurrencia de alteraciones estructurales en el gen *KMT2A* (malatión $p=0.032$, permetrina $p=0.046$) (**Figuras 7 y 8**). Adicionalmente, la permetrina aumentó significativamente la frecuencia de alteraciones numéricas en el gen *KMT2A* (es decir, ganancia o pérdida de señales fusionadas amarillas) ($p=0.020$), esto no se observó con la exposición a malatión (**Figuras 7 y 8**). Las pérdidas y ganancias de copias del gen *KMT2A* fueron incluso más frecuentes que las alteraciones estructurales en este gen (es decir, separación de señales en naranja y verde). El análisis en conjunto de alteraciones tanto numéricas como estructurales, mostró que la permetrina elevó significativamente la frecuencia de alteraciones totales ($p=0.0045$) (**Figuras 7 y 8**). Se registraron todos los patrones de fluorescencia detectados además del patrón clásico (1 fusión amarilla, 1 naranja, 1 verde), estos patrones de fluorescencia alternativos reflejan diferente daño, y han sido reportados previamente en células expuestas a etopósido (136). Las mayores frecuencias de células con alteración se detectaron en los cultivos expuestos a etopósido.

Ninguno de los dos insecticidas, permetrina y malatión, incrementó de manera significativa la recurrencia de la fusión génica *ETV6-RUNX1*; sin embargo se detectaron cambios numéricos en los genes *ETV6* y *RUNX1* en las células expuestas a permetrina ($p=0.046$) (**Figura 9**). Las alteraciones numéricas en el gen *ETV6* (pérdida o ganancia de señales verdes) fueron ligeramente mayores que las observadas para el gen *RUNX1* (pérdida o ganancia de señales rojas). La alta frecuencia de pérdidas y ganancias de copias de los genes *KMT2A*, *IGH*, *ETV6* y *RUNX1* por la exposición a permetrina, sugirieron que este agente es capaz de inducir aneuploidía (pérdida o ganancia de cromosomas completos), por lo que se incluyó un

ensayo con sondas centroméricas para analizar pérdidas y ganancias de los cromosomas 14/22 y 18, que comúnmente se ganan y pierden en células de LLA, adicionalmente el gen *ETV6* se localiza en el cromosoma 12, por lo cual en el análisis también se incluyó este cromosoma. El análisis de FISH con sondas centroméricas mostró que la permetrina induce significativamente el número de células con aneuploidía ($p=0.013$) (**Figura 10**), en donde las ganancias de cromosomas fueron más comunes que las pérdidas. No se observó inducción de aneuploidía por la exposición a malatión. Estos resultados mostraron que ambos insecticidas, pero principalmente la permetrina, son capaces de inducir daño estructural en los genes *KMT2A* e *IGH*, y adicionalmente la permetrina es capaz de inducir aneuploidía en PBMCs expuestos *in vitro*.

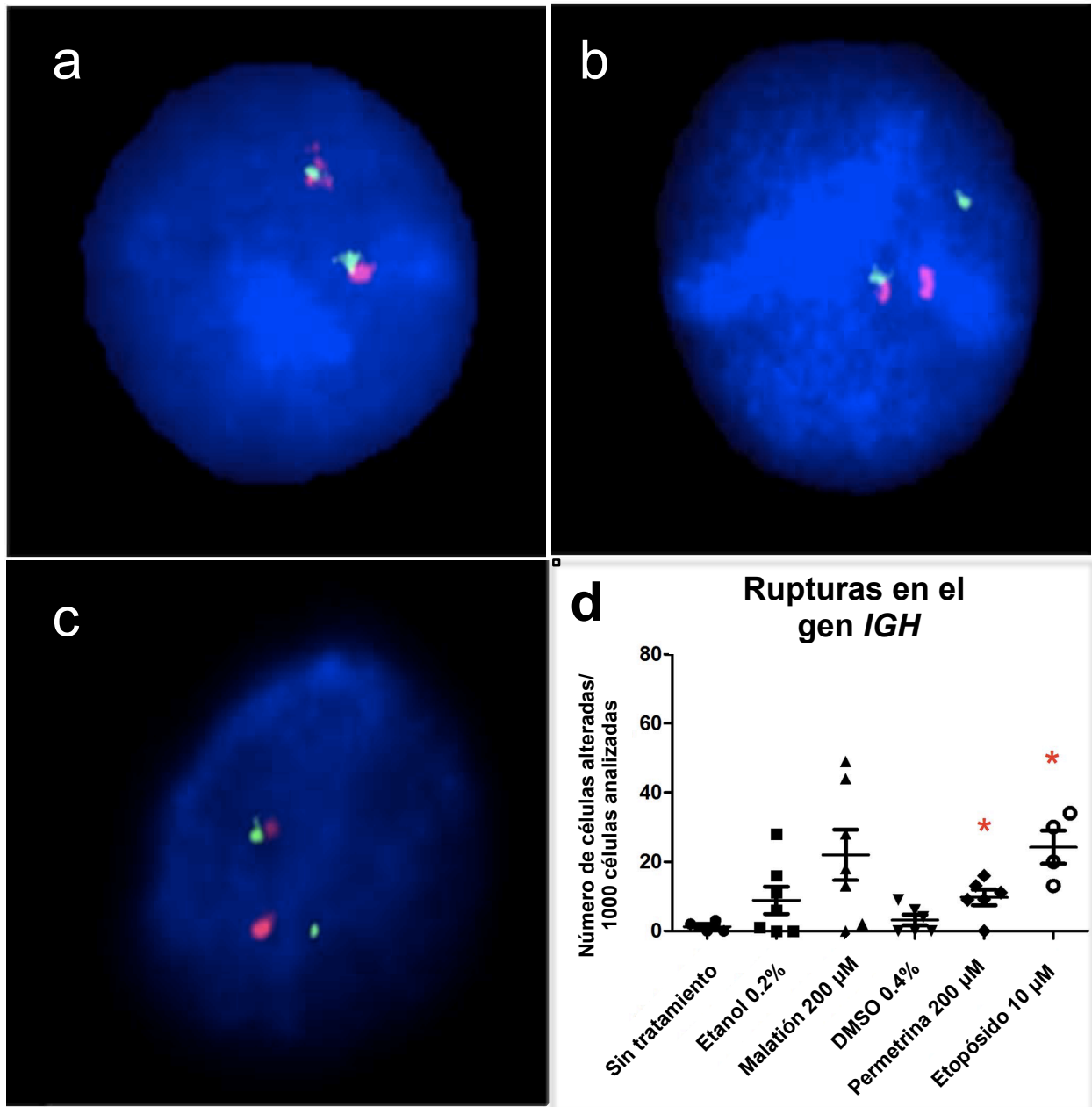


Figura 6 Efecto de altas concentraciones de permetrina y malatión en el gen *IGH*. Se expusieron *in vitro* PBMCs a 200 µM de insecticidas durante 48 h y se analizó el efecto en el gen *IGH* mediante FISH. Se utilizaron etanol y DMSO como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Célula expuesta a DMSO con dos alelos de *IGH* normales. b) Células expuestas a malatión con un alelo normal de *IGH* y un alelo roto. c) Célula expuesta a permetrina con un alelo normal de *IGH* y un alelo roto. d) Frecuencia de ruptura clásica en *IGH* por efecto de los insecticidas. * $p < 0.05$. U-Mann Whitney

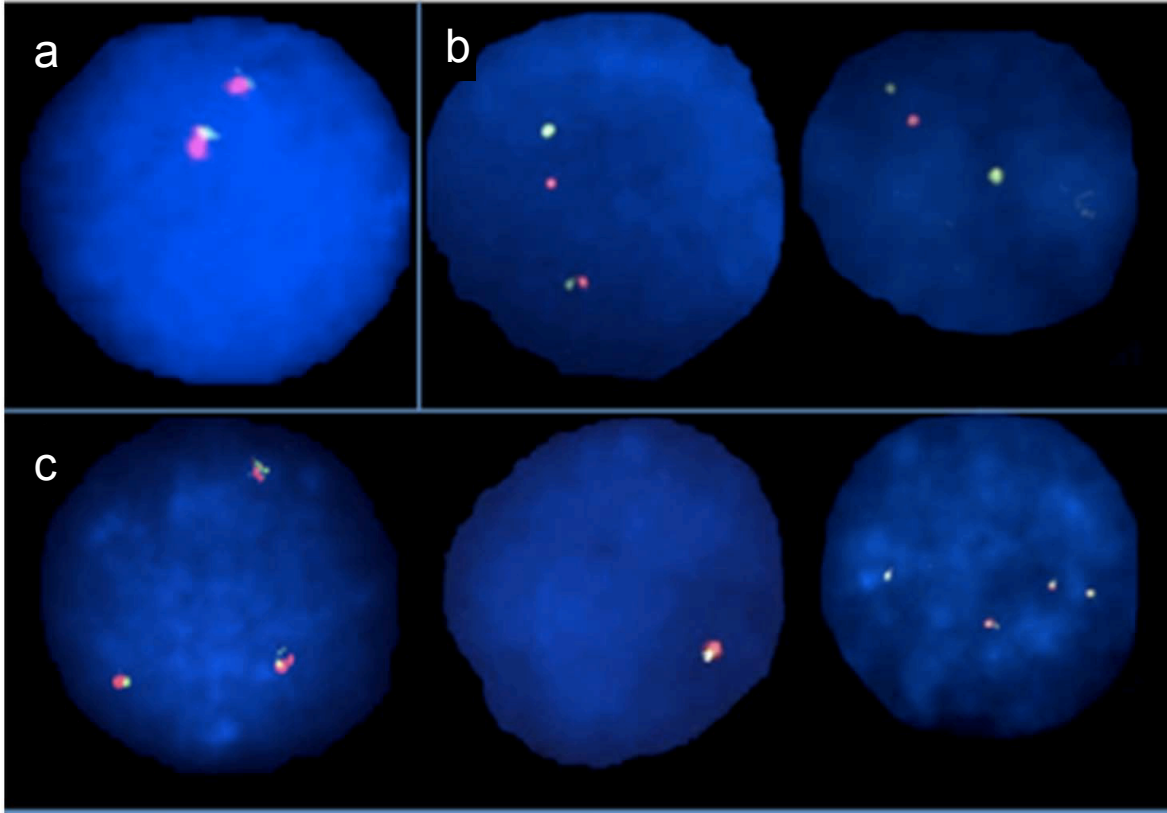


Figura 7 Daño en el gen *KMT2A* por efecto de la exposición a altas concentraciones de malatión y permetrina. Se expusieron *in vitro* PBMCs a 200 μ M de insecticidas durante 48 h y se analizó el efecto en el gen *KMT2A* mediante FISH. a) Célula expuesta a DMSO con dos alelos de *KMT2A* normales. b) Células expuestas a insecticidas con un alelo normal y un alelo roto (ruptura clásica). c) Células expuestas a permetrina con alteración en el número de copias de *KMT2A*.

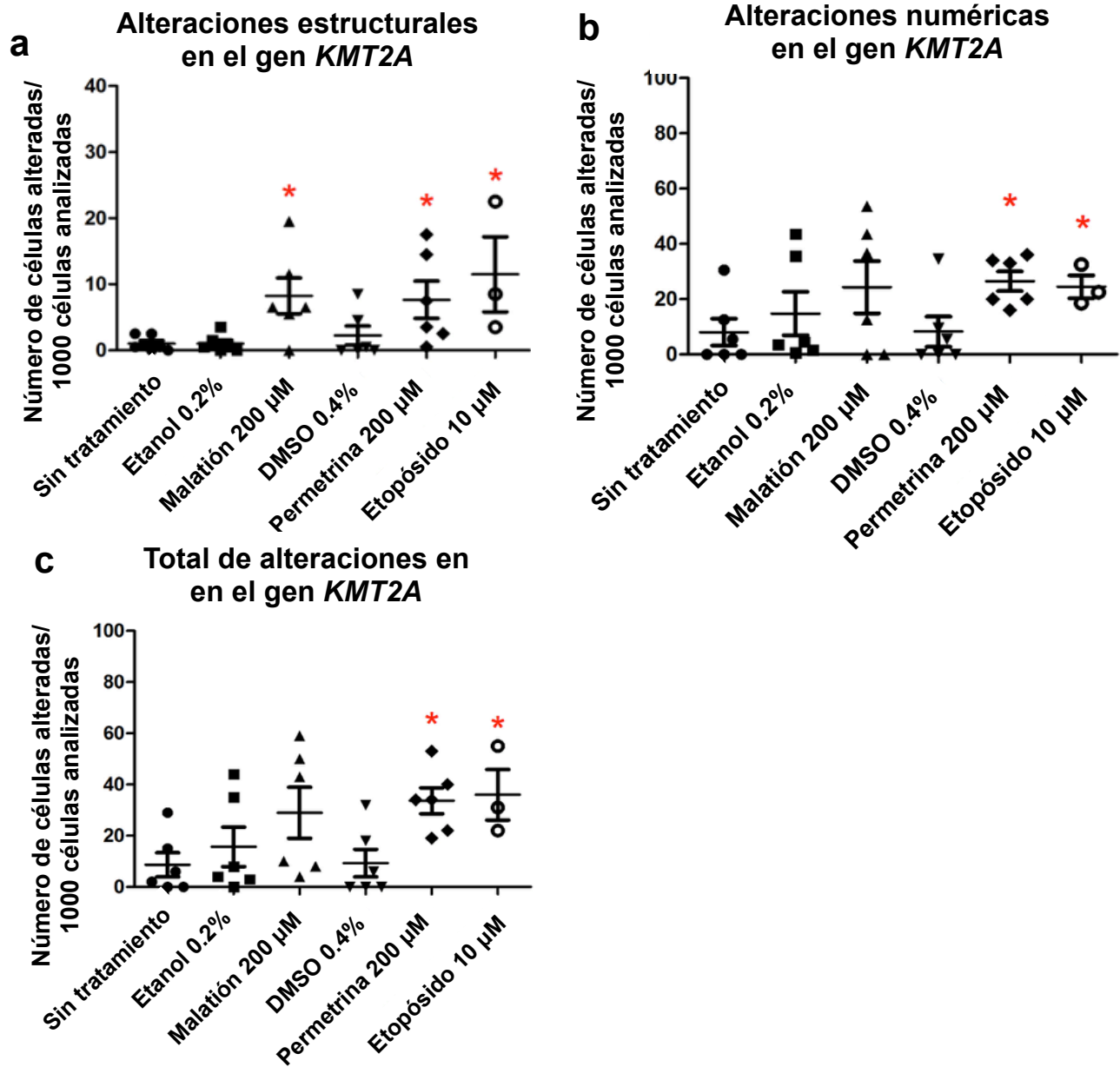


Figura 8 Frecuencia de daño en el gen *KMT2A* por efecto de exposición a altas concentraciones de insecticidas. Se expusieron *in vitro* PBMCs a 200 µM de insecticidas durante 48 h y se analizó el efecto en el gen *KMT2A* mediante FISH. Se utilizaron etanol y DMSO como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Frecuencia de alteraciones estructurales. b) Frecuencia de alteraciones numéricas. c) Frecuencia de alteraciones totales (numéricas + estructurales). * $p < 0.05$, U Mann Whitney.

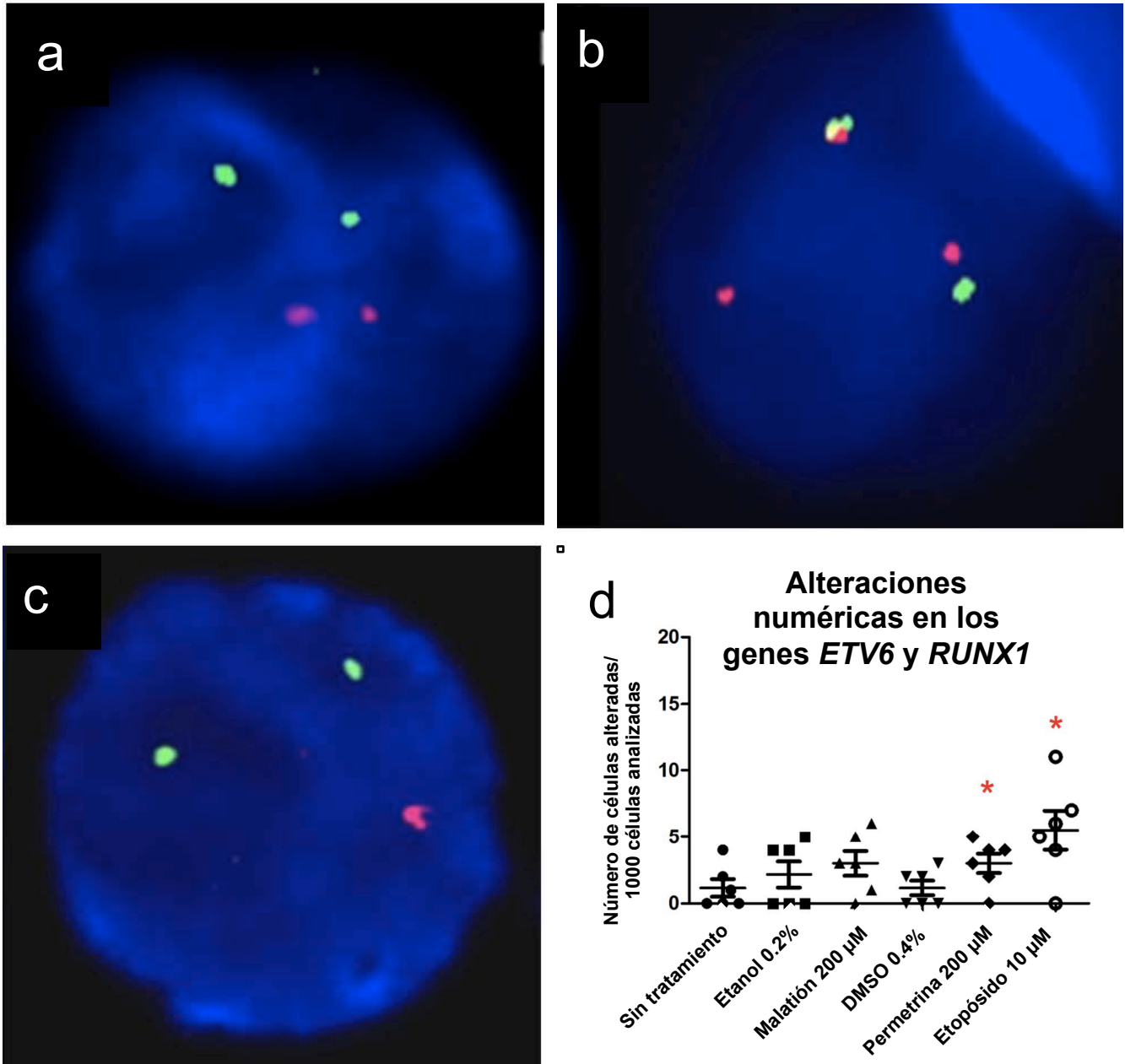


Figura 9 Efecto de altas concentraciones de insecticidas en los genes *ETV6* y *RUNX1*. Se expusieron *in vitro* PBMCs a 200 μ M de insecticidas durante 48 h y se analizó el efecto en el gen *KMT2A* mediante FISH. Se utilizaron etanol y DMSO como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Célula expuesta a DMSO con dos alelos de *ETV6* y dos alelos de *RUNX1* normales. b) Célula expuesta a permetrina con dos alelos de *RUNX1* normales, un alelo de *ETV6* y una fusión *ETV6-RUNX1*. d) Célula expuesta a permetrina con pérdida de una copia del gen *RUNX1*. d) Frecuencia de alteraciones numéricas en los genes *ETV6* y *RUNX1*. * $p < 0.05$ U Mann Whitney.

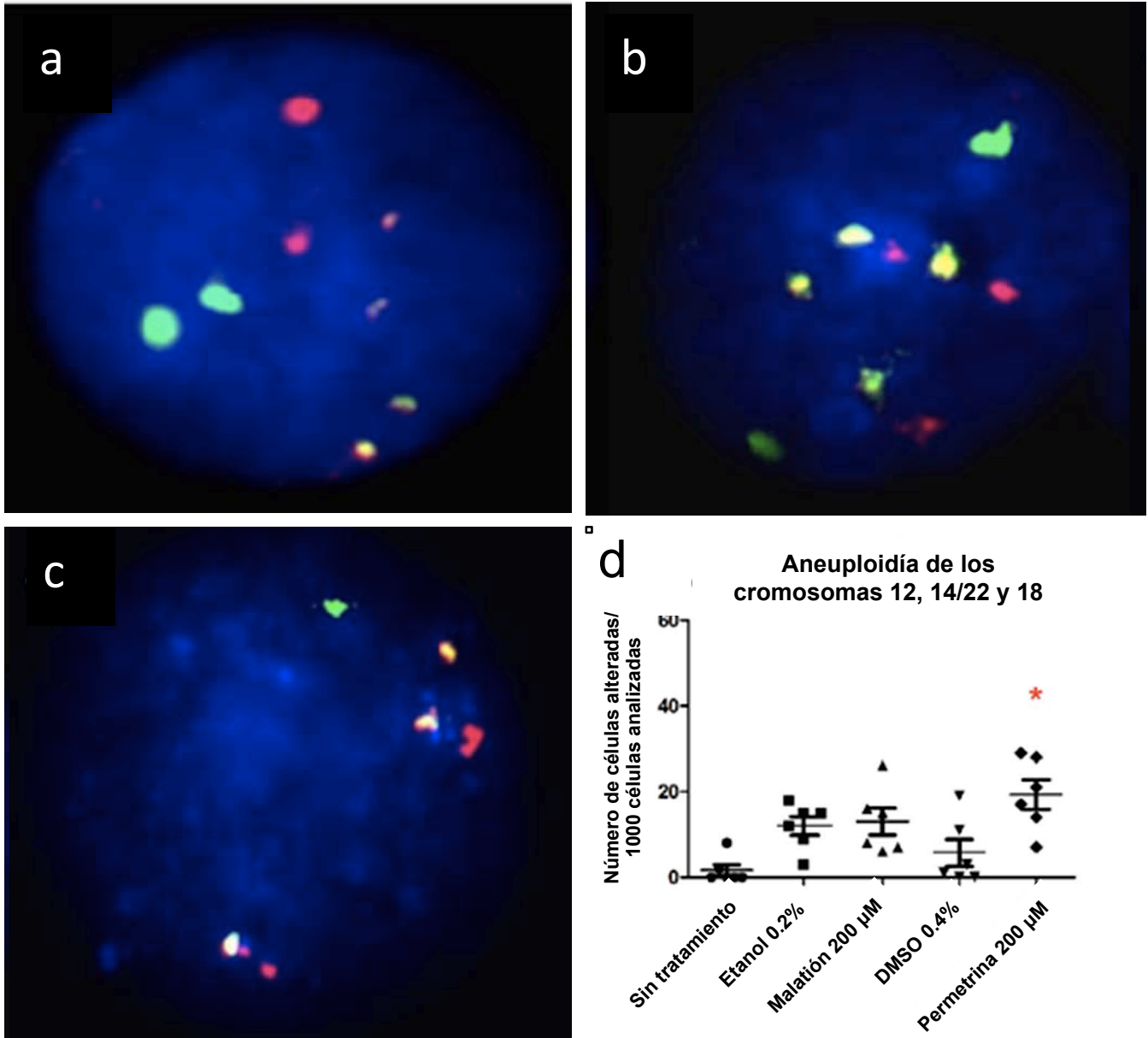


Figura 10 Análisis de aneuploidía inducida por la exposición a alta concentración de insecticidas. Se expusieron *in vitro* PBMCs a 200 µM de insecticidas durante 48 h y se analizó aneuploidía mediante FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 12, 18 y 14/22. Se utilizaron etanol y DMSO como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Célula normal expuesta a DMSO con dos copias de cada cromosoma, 12, 18, 14/22. b) Célula expuesta a permetrina con ganancia de un cromosoma 18. c) Célula expuesta a permetrina con pérdida de un cromosoma 12 y un cromosoma acrocéntrico. d) Frecuencia de aneuploidía inducida por los insecticidas. * $p < 0.05$ U Mann Whitney.

6.1.1.1.2 Efecto de la exposición crónica a insecticidas

Para conocer si concentraciones más bajas de insecticidas son capaces de inducir ruptura en los genes *KMT2A* e *IGH*, se incluyeron cultivos de PBMCs expuestos a 0.1 μ M de insecticidas por 72 h, como se observó a concentraciones mayores (200 μ M). Adicional al análisis de células en interfase, en estos cultivos expuestos de manera crónica, se analizaron metafases y se incluyó el índice mitótico. La viabilidad celular, estimada por citometría de flujo, mostró un ligero decremento en cultivos expuestos a permetrina y malatión, en comparación con los controles negativos. A pesar del ligero decremento, en todos los casos la viabilidad se mantuvo por arriba del 80%; no se mostraron diferencias significativas en el índice mitótico entre los diferentes tratamientos (**Figura 11**).

Se encontró que ambos insecticidas a baja concentración incrementaron significativamente la recurrencia de alteraciones totales en el gen *IGH* (numéricas y estructurales), siendo mayor con la exposición a permetrina ($p=0.001$) (**Figura 12 y 13a**). La frecuencia de alteraciones numéricas en el gen *IGH* también aumentó de manera significativa con la exposición a ambos insecticidas, pero principalmente con permetrina ($p=0.032$). La alteración numérica en el gen *IGH* más observada fue la pérdida de una copia (**Figura 12 y 13b**). Adicionalmente, ambos insecticidas pero principalmente la permetrina, elevaron de manera significativa la frecuencia de alteraciones estructurales en *IGH* (permetrina $p=0.001$, malatión $p=0.004$) (**Figura 12 y 13c**). Se notó una gran variabilidad de daño en el gen *IGH*, reflejado en diferentes patrones de fluorescencia, esta gran diversidad y complejidad de daño fue mayor en el gen *IGH* que en el gen *KMT2A* (**Figuras 12, 14 y 15**).

La exposición de PBMCs a baja concentración de ambos insecticidas incrementó de manera significativa las alteraciones numéricas en el gen *KMT2A*, principalmente con la exposición a permetrina ($p=0.001$); sin embargo, también se mostró un incremento significativo en los cultivos expuestos a los disolventes (DMSO y etanol), sin embargo los valores de p fueron mayores que lo observado con permetrina ($p=0.037$ y $p=0.025$, respectivamente) (**Figura 14 y 15a**). La alteración numérica más frecuente fue la pérdida de una señal de *KMT2A*. En el

análisis de alteraciones estructurales, no se encontró diferencia significativa entre los disolventes y el control no tratado. La mayor frecuencia de células con alteración estructural en *KMT2A* se evidenció en cultivos tratados con malatión ($p=0.013$); sin embargo, el tratamiento con permetrina también incrementó de manera significativa la recurrencia de rearrreglos en *KMT2A* ($p=0.046$) (**Figura 14 y 15b**). Además del patrón de fluorescencia clásico (1 fusión, 1 naranja, 1 verde), se observaron diversos patrones de alteraciones estructurales (**Figura 14 y 15c**). Adicional a la detección de daño en PBMCs en interfase inducido por la exposición a bajas concentraciones de insecticidas, se encontraron células en metafase con alteraciones en ambos genes analizados, pero principalmente con permetrina. El análisis de *KMT2A* en metafase mostró el mayor número de células alteradas en cultivos expuestos a permetrina, aunque no fue estadísticamente significativo. El análisis del gen *IGH* mostró que los cultivos expuestos a permetrina presentaron más del doble de metafases alteradas que los cultivos expuestos a DMSO; sin embargo la diferencia no fue significativa ($p=0.066$). Se encontraron diversas alteraciones incluyendo deleciones, inversiones y ganancias numéricas. Se detectó un mayor número de metafases con alteración en *IGH* en comparación con *KMT2A* (**Figura 16**).

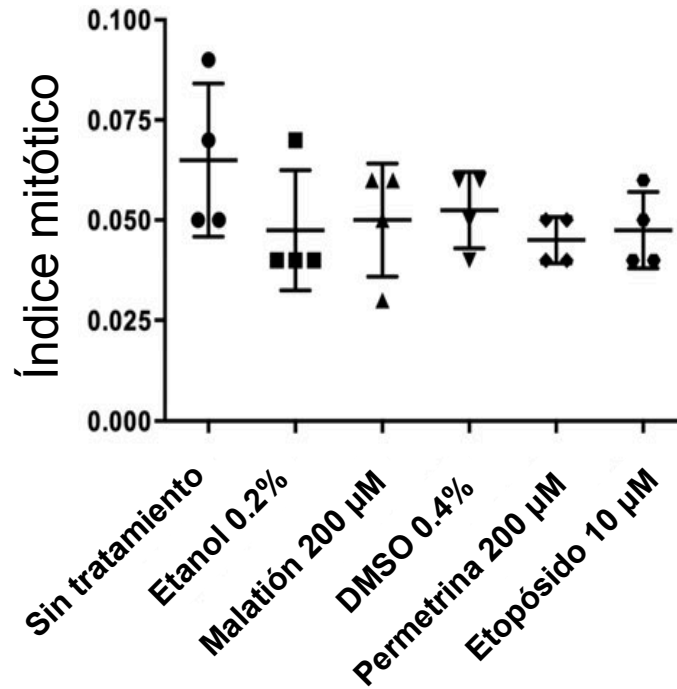


Figura 11 Índice Mitótico de PBMCs expuestas a concentraciones bajas de insecticidas. Se expusieron a 0.1 µM de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. Se determinó el índice mitótico a las 72 h. No se encontraron diferencias significativas, U-Mann Whitney.

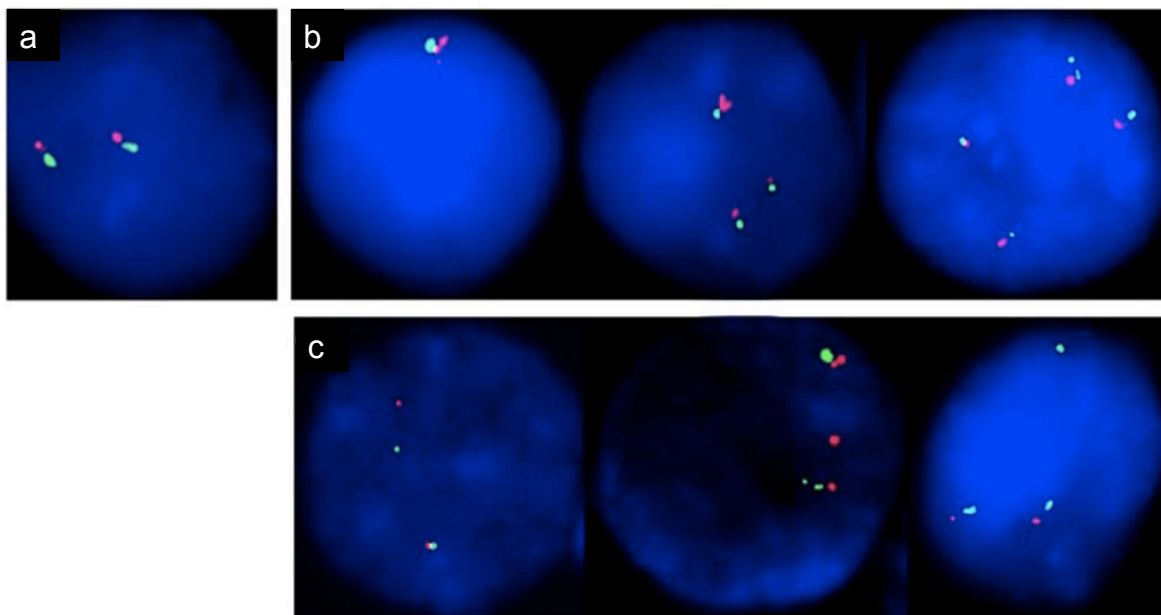


Figura 12 Daño en el gen *IGH* por efecto de la exposición a bajas concentraciones de insecticidas. Se expusieron PBMCs a 0.1 μ M de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h, y se analizó el daño en el gen *IGH* por medio de FISH. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Célula expuesta a DMSO con dos alelos de *IGH* normales. b) Células expuestas a permetrina con alteraciones en el número de copias de *IGH*. c) Células expuestas a permetrina con distintos patrones de daño en el gen *IGH*.

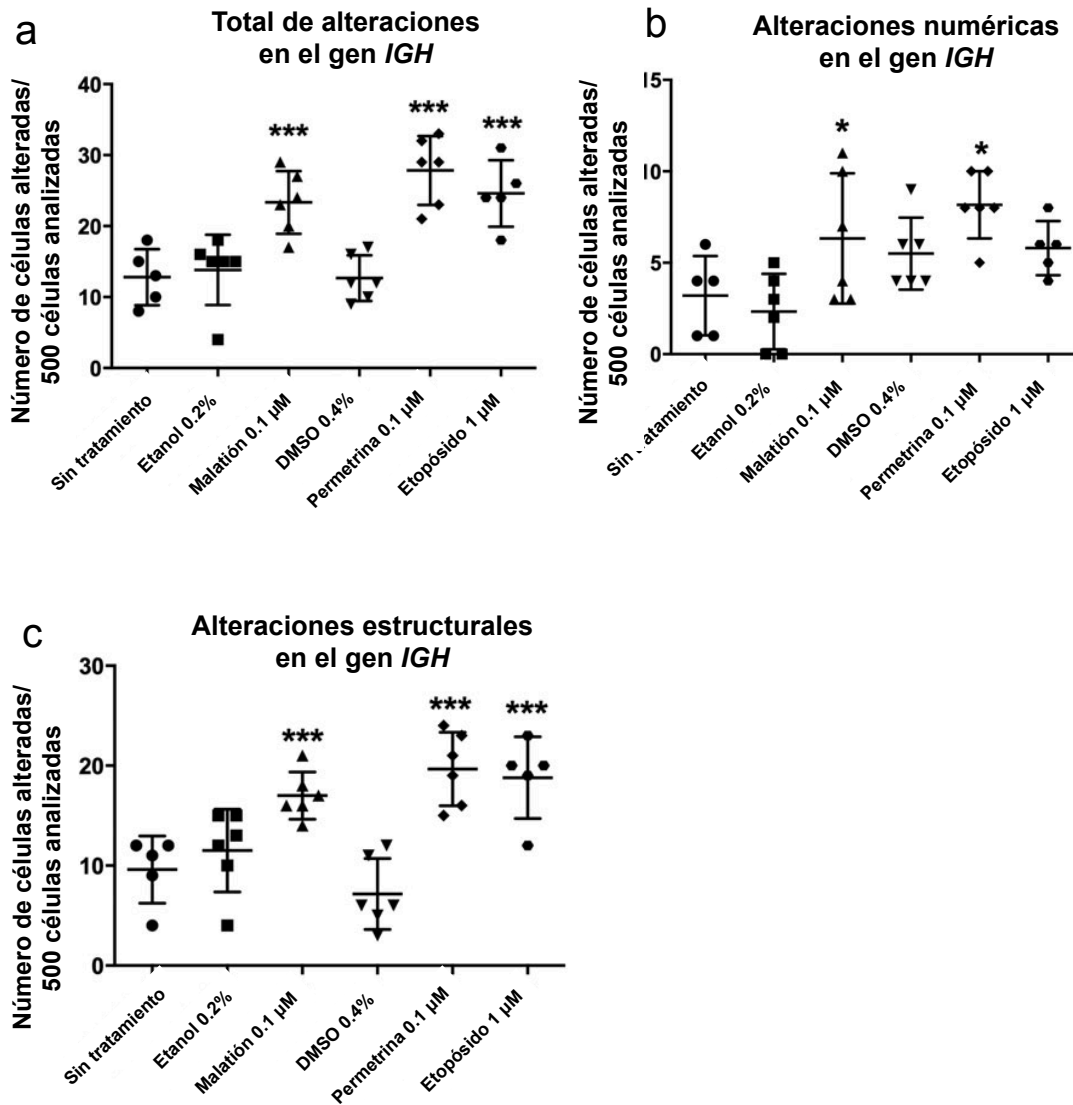


Figura 13 Efecto de la exposición a bajas concentraciones de insecticidas en el gen *IGH*. Se expusieron PBMCs a 0.1 µM de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h, y se analizó el daño en el gen *IGH* por medio de FISH. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Frecuencia de alteraciones en *IGH* (numéricas y estructurales). b) Frecuencia de alteraciones numéricas. c) Frecuencia de alteraciones estructurales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ U Mann Whitney

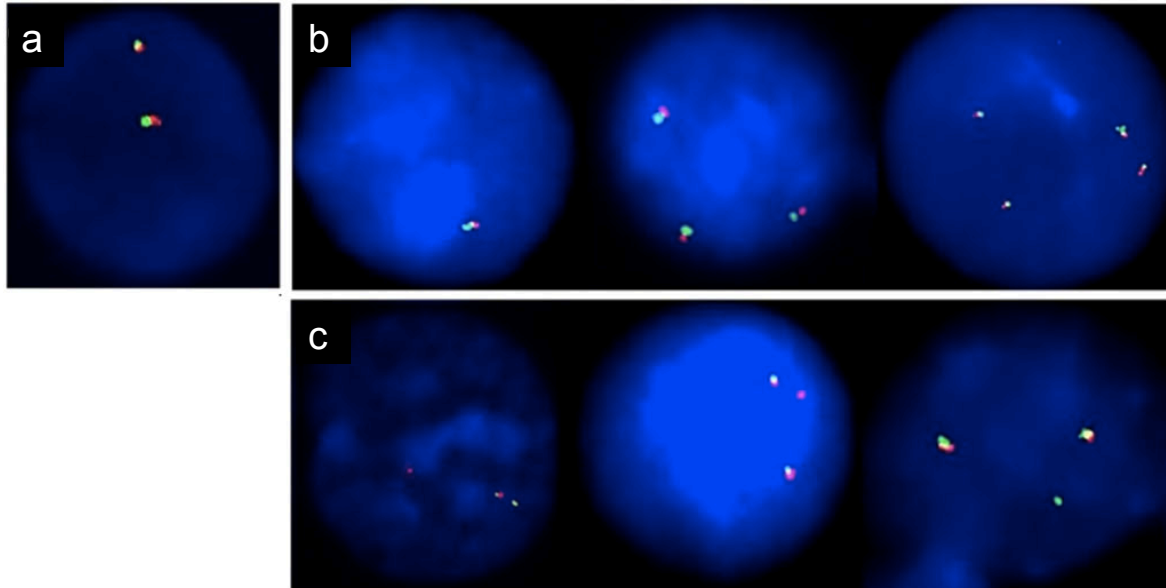


Figura 14 Daño en el gen *KMT2A* por efecto de la exposición a bajas concentraciones de insecticidas. Se expusieron PBMCs a 0.1 μM de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h, y se analizó el daño en el gen *KMT2A* por medio de FISH. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Célula expuesta a DMSO con dos alelos de *KMT2A* normales. b) Células expuestas a permetrina con alteraciones en el número de copias de *KMT2A* c) Células expuestas a permetrina con distintos patrones de daño en el gen *KMT2A*.

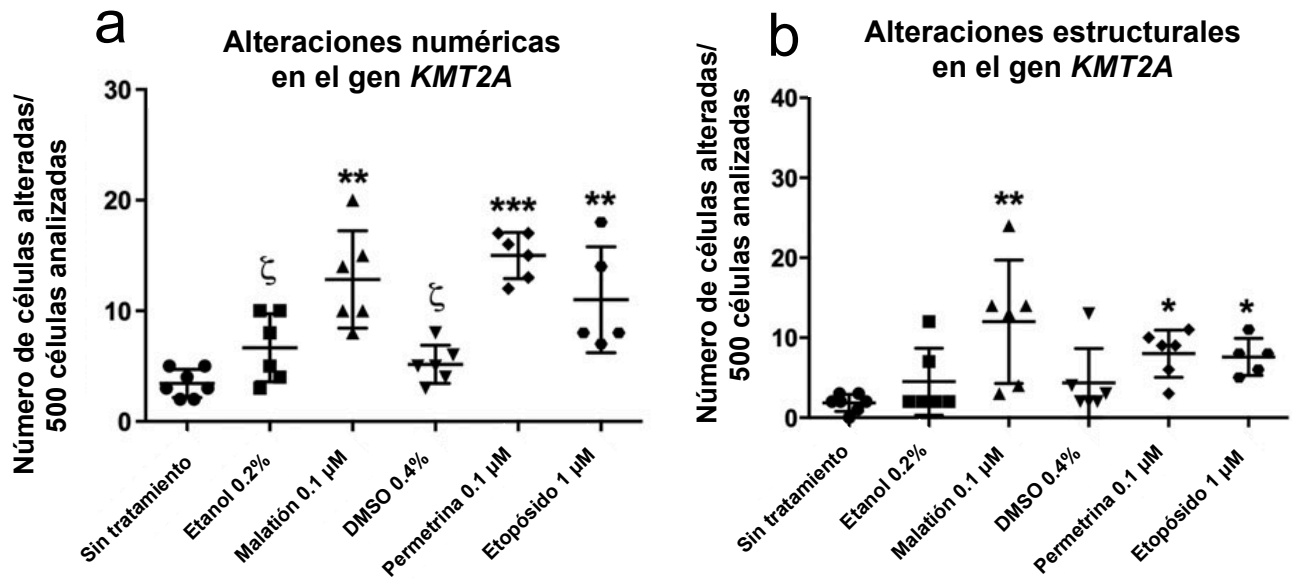


Figura 15 Efecto de la exposición a bajas concentraciones de insecticidas en el gen *KMT2A*. Se expusieron PBMCs a 0.1 µM de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h, y se analizó el daño en el gen *KMT2A* por medio de FISH. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Frecuencia de alteraciones numéricas en *KMT2A*. b) Frecuencia de alteraciones estructurales en *KMT2A*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ U Mann Whitney

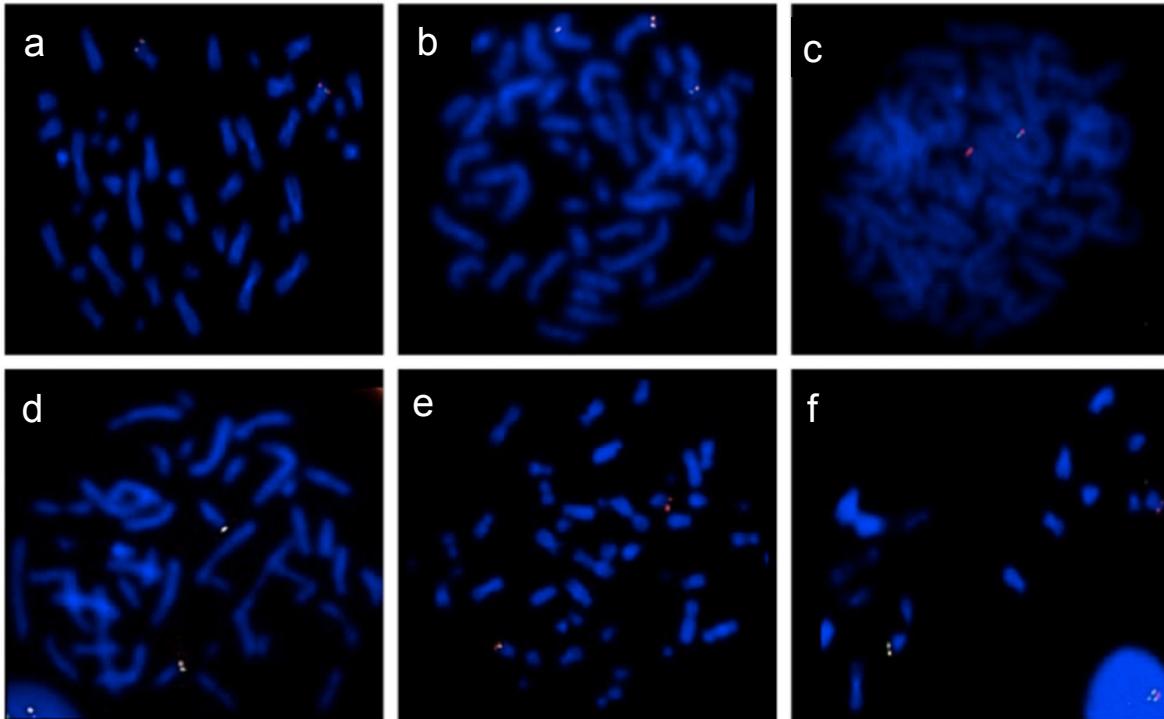


Figura 16 Metafases con alteraciones en *KMT2A* e *IGH* por efecto de bajas concentraciones de insecticidas. Se expusieron PBMCs a 0.1 μ M de permetrina o malatión a las 0, 24 y 48 h, y se analizó el daño en los genes *KMT2A* e *IGH* por medio de FISH en metafases. Se incluyeron DMSO y etanol como controles negativos y etopósido como control positivo. a) Metafase sin alteración en *KMT2A*. b) Metafase con ganancia de un cromosoma 11 (*KMT2A*). c) Metafase con un cromosoma con delección intersticial en *KMT2A*. d) Metafase sin alteración en *IGH*. e) Metafase con delección de la porción telomérica de *IGH*. f) Metafase con inversión y delección de la porción terminal de *IGH*.

6.1.1.2 Evaluación del efecto de la permetrina en la generación de fusiones oncogénicas por técnicas moleculares.

Mediante el análisis citogenético con FISH fue posible detectar alteraciones en los genes *KMT2A*, *IGH* y *ETV6-RUNX1*; sin embargo, para definir si los insecticidas inducen además de ruptura, la formación de fusiones oncogénicas, se hizo el análisis molecular con RT-PCR anidada. La búsqueda de las fusiones *KMT2A-AFF1*, *IGH-BCL2* y *ETV6-RUNX1* se hizo en PBMCs expuestas a permetrina o malatión (200 μ M, 24 h) y en células K562 expuestas de manera prolongada a concentraciones bajas (0.1 μ M por dos semanas); en las células K562 también se incluyó una sola exposición a 0.1 μ M. No se observaron fusiones en células expuestas a los vehículos de la permetrina y el malatión. En PBMCs expuestos a permetrina (200 μ M, 24 h) se obtuvo un fragmento de 180pb correspondiente a la amplificación de la fusión *ETV6-RUNX1* (**Figura 17a**). En células K562, la exposición aguda a permetrina indujo la fusión *IGH-BCL2* (**Figura 17e**), mientras que el malatión generó las fusiones *ETV6-RUNX1* y *KMT2A-AFF1* (**Figuras 17c y d**). Sin embargo, en el ensayo de exposición prolongada, únicamente persistió la fusión *ETV6-RUNX1* (**Figura 17b**) inducida por el malatión. Estas fusiones no se encontraron en la línea K262 al inicio del tratamiento y no se detectaron con la exposición a DMSO. En resumen, el análisis citogenético y molecular apoya que tanto el malatión y como la permetrina tienen el potencial de inducir daño genético en sitios asociados a LLA y que frecuentemente lo hacen a niveles más elevados que el etopósido.

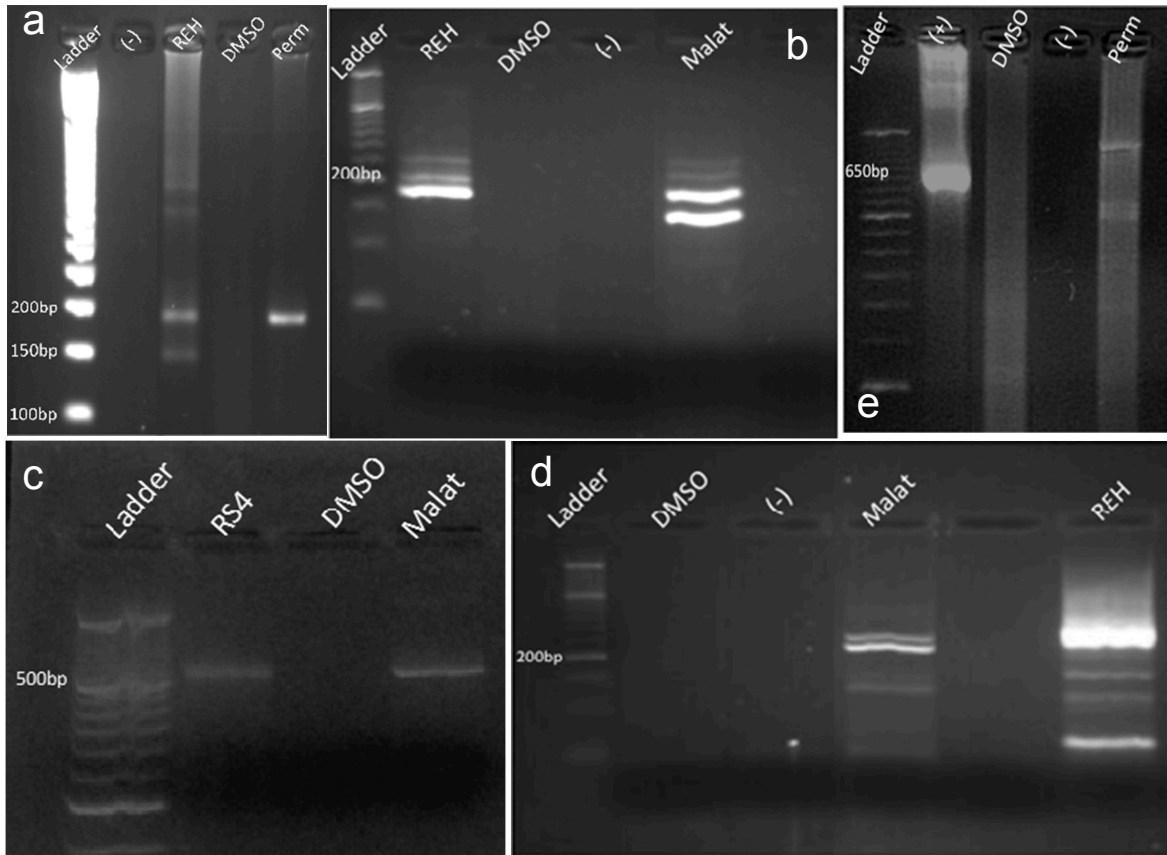


Figura 17 Detección de fusiones oncogénicas inducidas por la exposición a insecticidas. Se expusieron in vitro PBMCs y células de la línea K562 a permetrina y malatión, así como a DMSO que se utilizó como control negativo. Como controles positivos se utilizaron las líneas celulares REH (positiva para la fusión *ETV6-RUNX1*) y RS4 (positiva para la fusión *KMT2A-AFF1*). a) La exposición aguda (200 μ M, 24 h) a permetrina genera la fusión *ETV6-RUNX1* en PBMCs, detectada por la amplificación de un fragmento de 200 pb. b) La exposición crónica (0.1 μ M, 2 semanas) a malatión provoca la fusión *ETV6-RUNX1* en células K562, detectada mediante la amplificación de fragmentos de 180 y 140 pb. c) La exposición aguda (0.1 μ M, 24 h) a malatión induce la fusión *KMT2A-AFF1* en células K562, detectada como la amplificación de un fragmento de 502 pb. d) La exposición aguda (0.1 μ M, 24 h) a malatión causa la fusión *ETV6-RUNX1* en células K562. e) La exposición aguda (0.1 μ M, 24 h) a permetrina induce la fusión *IGH-BCL2* en células K562.

6.1.2 Efecto de los insecticidas en la expresión y metilación génica.

6.1.2.1 Efecto en la expresión génica

Se analizó mediante microarreglos si la exposición *in vitro* a permetrina y malatión induce alteraciones en la expresión génica en BMMCs y PBMCs . Se encontró que ambos insecticidas modificaron la expresión génica con respecto al control (DMSO). La mayor cantidad de genes con cambios en la expresión se identificó en las BMMCs expuestas a malatión, en las que se encontraron 3,121 genes con expresión alterada que correspondieron a 1,374 genes con baja expresión y 1,747 genes sobreexpresados. En las BMMCs expuestas a permetrina se detectaron 1189 genes con baja expresión y 999 genes sobreexpresados. En general en las PBMCs se observaron menos genes alterados, en comparación con las BMMCs; se identificaron 823 genes con baja expresión y 748 sobreexpresados por efecto del tratamiento con permetrina, y 889 con baja expresión y 716 sobreexpresados por la exposición a malatión (**Figuras 18 y 19**). El análisis ontológico se llevó a cabo con el total de genes con baja y alta expresión y adicionalmente se realizó utilizando los 100 genes con la mayor y menor expresión (cambios máximos y mínimos o “*fold changes*”). El análisis ontológico incluyó las clasificaciones: a) “función molecular”, b) “proceso biológico”, c) “componente celular”, d) “clase de proteína” y e) “vías”, y se hizo mediante el sistema PANTHER. Se aplicó la prueba de sobrerrepresentación que utiliza la prueba exacta de Fisher. En las **Tablas 1-4 y Figuras 20 y 21** se muestran resumidos los resultados que tuvieron una diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de sobre representación utilizando el total de los genes. En los **Anexos 6 y 7** se muestran el total de los resultados de la prueba de sobre representación así como las listas de genes asociados a cada ontología.

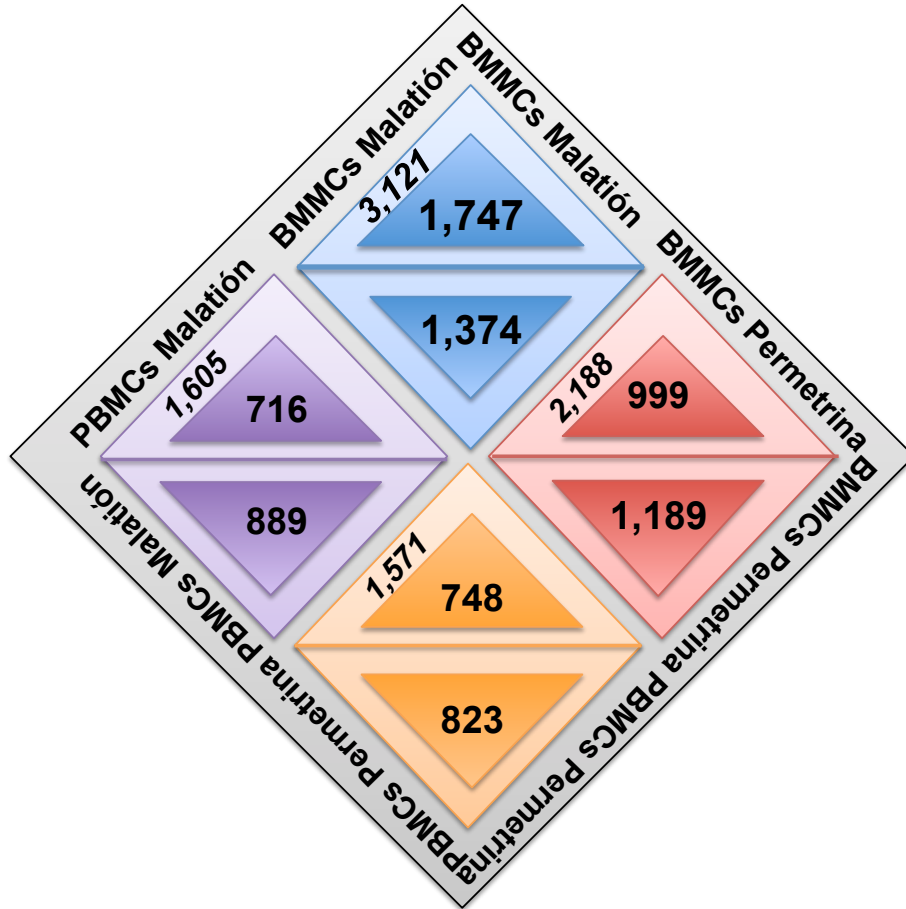


Figura 18 Distribución de genes con baja expresión (triángulos hacia abajo) y con sobreexpresión (triángulos hacia arriba) en cada microarreglo. Se analizó el efecto en la expresión génica en PBMCs y BMMCs expuestas a permetrina y malatión. Cada cuadrado de color corresponde a una condición de tratamiento.

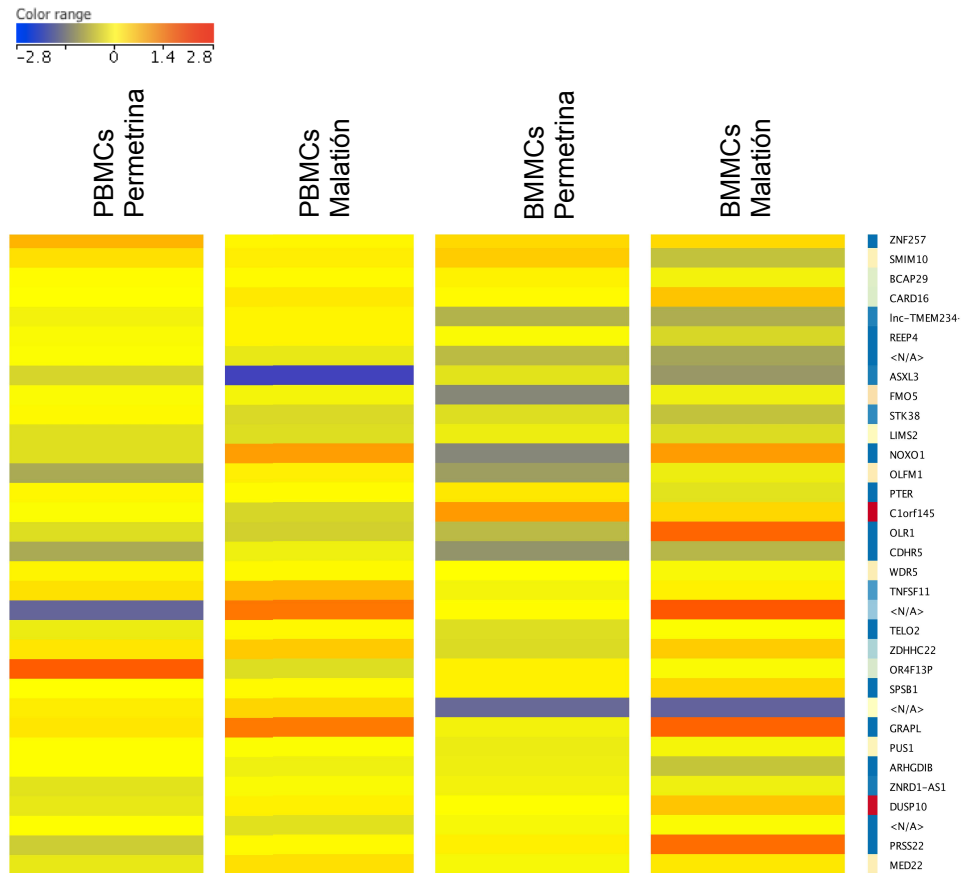


Figura 19 Mapa de calor de genes representativos. En azul se muestran los genes con baja expresión y en rojo aquellos sobreexpresados.

Tabla 1 Resumen de resultados del análisis de sobre representación del total de genes con expresión alterada en BMMCs expuestos a malatión

Prueba de sobre representación de genes con BAJA EXPRESIÓN			
		# genes	Valor de P
Proceso biológico	Proceso de organismo multicelular	110	7.82E-06
	Proceso metabólico de macromoléculas	79	1.56E-05
Función molecular	Actividad de canal de potasio	19	3.53E-04
Clase de proteína	Proteína de unión a RNA	12	1.14E-04
Prueba de sobre representación de genes con SOBREENPRESIÓN			
		# Genes	Valor de P
Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	30	2.51E-14
	Respuesta a factor de necrosis tumoral	15	3.76E-03
	Regulación positiva de cascada ERK1/ERK2	17	7.25E-08
	Regulación positiva de cascada MAPK	19	3.27E-08
	Receptor de factor de crecimiento epidermal	14	1.48E-03
	Vía de señalización mediada por citocinas	35	1.11E-12
	Respuesta a sustancia tóxica	17	7.61E-04
	Regulación de la proliferación celular	17	1.69E-03
	Cascada MAPK	33	3.24E-04
	Adhesión celular	47	4.82E-04
Vías de señalización	Vía de señalización por interleucina	17	7.61E-04
	Señalización CCKR	39	4.78E-05
	Inflamación mediada por vías de señalización por quimiocinas y citocinas	40	7.19E-05
Función molecular	Actividad citocina	43	5.83E-13
	Unión a factor de crecimiento	12	3.65E-04
Componente celular	Parte del núcleo	21	7.68E-08

Tabla 2 Resumen de resultados del análisis de sobre representación del total de genes con expresión alterada en PBMCs expuestos a malatión

Prueba de sobre representación de genes con BAJA EXPRESIÓN			
		# genes	Valor de P
Función molecular	Unión a ácidos nucleicos	27	9.59E-05
Componente celular	Núcleo	33	4.32E-07
Clase de Proteína	Unión a ácidos nucleicos	24	3.47E-05
Prueba de sobre representación de genes con SOBREENPRESIÓN			
		# genes	Valor de P
Proceso Biológico	Regulación de transmisión sináptica, glutamatérgica Señalización sináptica	22	3.04E-04
	Señalización célula-célula	35	3.61E-04
Componente celular	Parte de neurona	28	2.29E-05
	Complejo receptor glutamato ionotrópico	6	5.59E-05

Tabla 3 Resumen de resultados del análisis de sobre representación del total de genes con expresión alterada en BMBCs expuestos a permetrina

Prueba de sobre representación de genes con BAJA EXPRESIÓN			
		#genes	Valor de p
Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	13	7.17E-06
	Vía de señalización mediada por citocinas	17	7.99E-06
	Respuesta a citocinas	18	1.64E-05
Función molecular	Actividad citocina	22	2.11E-06
	Unión a enzimas	5	1.87E-06
Clase de proteína	Quimiocina	10	1.84E-04
	Citocina	16	1.51E-04
	Canal iónico	22	2.14E-02
Prueba de sobre representación de genes con SOBREENPRESIÓN			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Vía del receptor ionotrópico glutamato	13	4.06E-05
Función molecular	Receptor con señalización transmembranal	80	4.09E-06

Tabla 4 Resumen de resultados del análisis de sobre representación del total de genes con expresión alterada en PBMCs expuestos a permetrina

Prueba de sobre representación de genes con BAJA EXPRESIÓN			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Señalización por cadherinas	15	1.50E-04
	Vía Alzheimer-presenilina	19	7.59E-05
Componente celular	Complejo canal catiónico	10	8.44E-04
Prueba de sobre representación de genes con SOBREENPRESIÓN			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Síntesis de vasopresina	7	2.49E-05
Función molecular	Receptor con actividad tirosina cinsasa	9	1.66E-04
	Unión a RNA	3	1.44E-04
Componente celular	Complejo canal iónico	11	6.33E-04
	Núcleo	33	1.76E-05

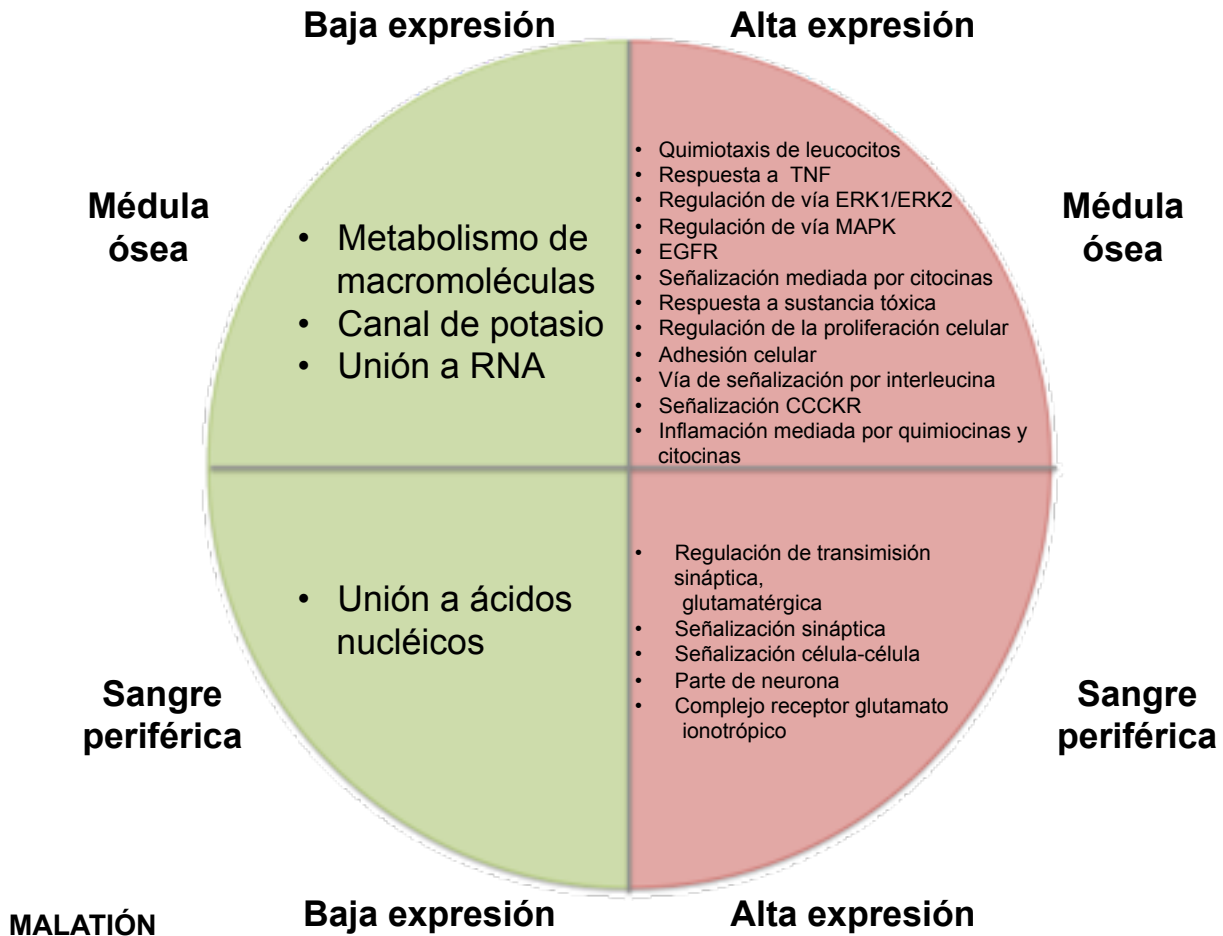


Figura 20 Resumen de resultados de prueba de sobre representación de genes con expresión alterada por efecto del malati3n en BMMCs y en PBMCs. En verde se muestran las funciones celulares asociadas a genes con baja expresi3n y en rojo con sobreexpresi3n. En la parte superior se muestran los resultados en BMMCs y en la parte inferior los resultados en PBMCs.

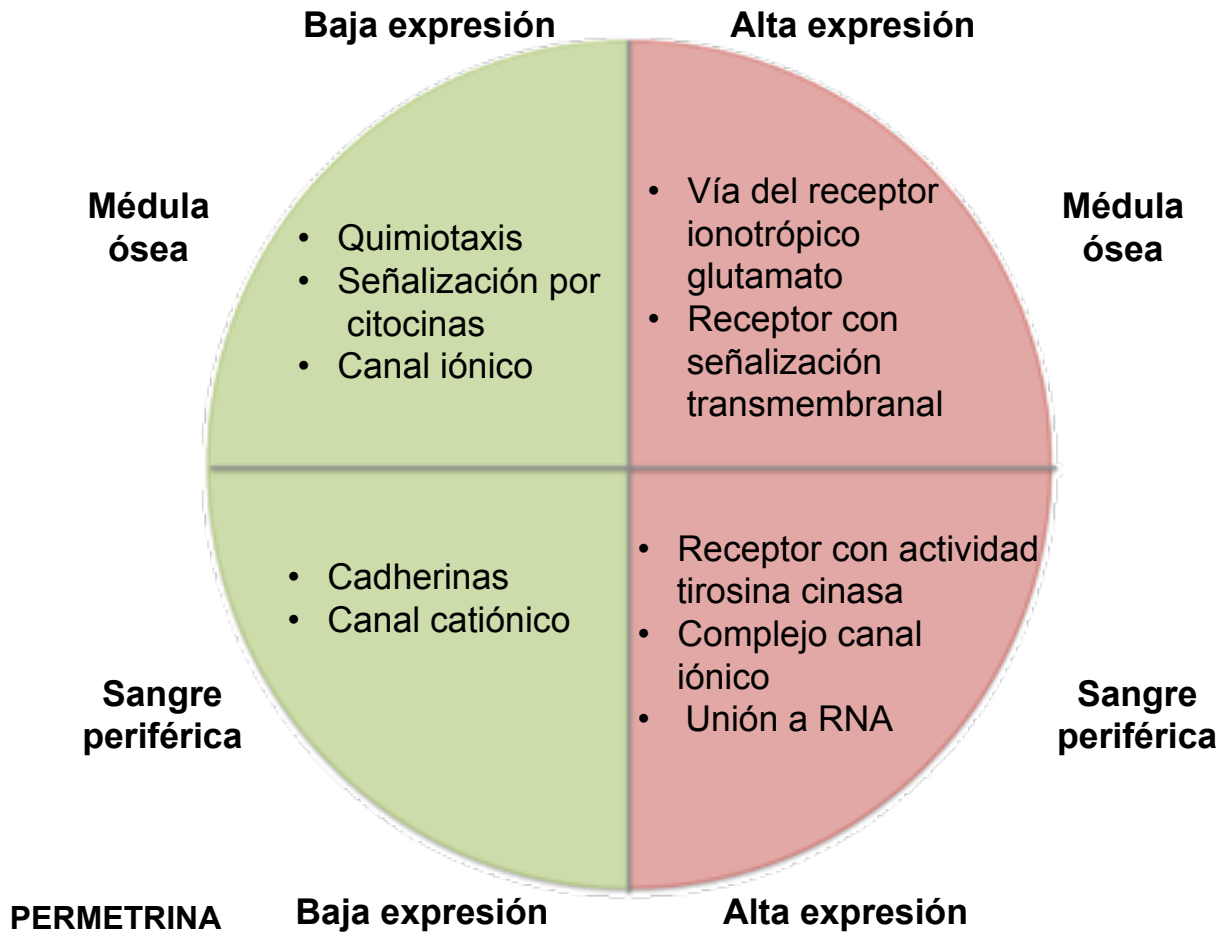


Figura 21 Resumen de resultados de prueba de sobre representación de genes con expresión alterada por efecto de la permetrina en BMMCs y en PBMCs. En verde se muestran las funciones celulares asociadas a genes con baja expresión y en rojo con sobreexpresión. En la parte superior se muestran los resultados en BMMCs y en la parte inferior los resultados en PBMCs.

Se obtuvieron mayores resultados significativos en los cultivos de BMMCs expuestos a malatión, principalmente en el análisis de genes con sobreexpresión; en los que se encontró mayor representación de la vía de inflamación mediada por citocinas y quimiocinas, señalización por interleucinas, y señalización CCKR. Adicionalmente, se observó que los productos de los genes sobreexpresados participan en diversos procesos biológicos, entre los que destacan: quimiotaxis de leucocitos, regulación de la actividad cinasa, respuesta celular a factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés tumor necrosis factor), respuesta celular a estímulo de citocinas, regulación positiva de la cascada ERK1/ERK2, regulación positiva de la cascada MAPK (del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases), regulación de la comunicación celular, señalización del factor de crecimiento epidermal (EGFR, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor), señalización por citocinas, respuesta inflamatoria y adhesión celular (**Tabla 1, Figura 20**). Por otra parte, en las PBMCs expuestas a malatión se encontró que los genes con baja expresión correspondían principalmente a proteínas de unión a ácidos nucleicos. Se encontró que los genes sobreexpresados participan principalmente en procesos biológicos como: regulación de la transmisión sináptica glutamatérgica, señalización por el receptor glutamato, señalización sináptica y señalización célula-célula (**Tabla 2, Figura 20**).

El análisis de las BMMCs expuestas a permetrina, mostró que los genes con baja expresión presentan principalmente función de citocina, de unión a enzima y de unión a receptor acoplado a proteína G, y los procesos biológicos más representados fueron quimiotaxis y señalización mediada por citocinas; de igual forma, las clases de proteínas a las que correspondían los genes con baja expresión fueron principalmente quimiocinas, citocinas y canales iónicos. Por otro lado, se encontró que los genes con sobreexpresión corresponden principalmente a receptores, con actividad de señalización transmembranal. La vía con mayor representación fue la vía del receptor ionotrópico glutamato (**Tabla 3 y Figura 21**). Adicionalmente, el análisis de las PBMCs expuestas a permetrina, mostró que los genes con baja expresión corresponden principalmente a canales catiónicos y participan principalmente en las vías de señalización de las cadherinas, del receptor ionotrópico glutamato, vía de Alzheimer-presenilina. Por otra parte, los genes con alta expresión corresponden a proteínas

con función de receptor con actividad tirosina cinasa, canales iónicos y de unión a RNA **(Tabla 4 y Figura 21)**.

Se detectaron coincidencias entre las funciones moleculares, procesos biológicos, y vías más sobre representadas por efecto del mismo insecticida en diferente tipo celular (BMMCs y PBMCs), así como coincidencias entre el mismo tipo celular expuesto a diferente insecticida (malatión y permetrina), los resultados se muestran en la Figura 22. Se encontró que en ambos tipos celulares el malatión desregula genes que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos, y en ambos tipos celulares la permetrina afecta la expresión de genes que codifican canales iónicos. Adicionalmente, se detectó que en BMMCs, tanto el malatión como la permetrina desregulan genes implicados en quimiotaxis, y señalización por citocinas, y se detectó sobre representación de genes que codifican canales iónicos. Por otra parte se encontró que en PBMCs ambos insecticidas desregulan la expresión de genes que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos **(Figura 22)**.



Figura 22 Coincidencia de funciones celulares alteradas por modificación en la expresión de genes por efecto de la exposición a malatión y permetrina en BMMCs y PBMCs. Los resultados se derivaron del análisis de sobre representación con el total de genes con cambios en la expresión. Se utilizó el programa Panther Pathways.

Adicional al análisis de sobre representación con el total de genes alterados, con el que se obtuvieron las vías, componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos significativos para cada tipo de muestra (BMMCs, PBMCs) y tratamiento (malatión o permetrina), con los 100 genes mayormente expresados y los 100 con más baja expresión, se analizó la distribución de categorías en cada ontología analizada; se profundizó en las categorías más relevantes para este estudio, es decir, las que tuvieran alguna relación con cáncer y que hubieran sido igualmente identificadas en el análisis de sobrerrepresentación. En las **Tablas 5-8** se enlistan los genes con mayor relevancia para este estudio.

En las BMMCs expuestas a malatión se encontró que dentro de los genes con la más baja expresión se encuentran los genes de unión a DNA *PROX2* y *NFIB*, genes que participan en muerte celular como *ADAM11* y *ADAM32*, entre otros. Dentro de los genes con la más alta expresión por efecto del malatión en BMMCs se encuentran las citocinas *CCL3*, *CCL7*, *CCL19*, *CCL1*, *CCL3L3* y *CCL20*, y las quimiocinas *CXCL8*, *CCL3*, *CCL7*, *CCL19*, *CXCL5*, *CCL1*, *CCL3L3*, *CXCL11*, *CCL20* también se encontraron desregulados genes de la vía TNF como *TNF* y *TNFSF15*, así como los factores de transcripción *HES4*, *NR4A3*, *NR4A1* (**Tabla 5**). En las PBMCs expuestas a malatión se encontraron dentro de los genes con la más baja expresión los factores de transcripción *MEIS1*, *ZFP42*, *ARNT2*, y *WBP2NL*, genes asociados a muerte como *TNFSF15* y *PDIA2*, y genes implicados en diferenciación durante el desarrollo como *GATA4* y *LEP1*. Dentro de los genes con mayor expresión se encontraron los que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos como *ZFPM2*, *IRX2*, genes que codifican receptores tirosina cinasa como *EPHA10*, *FLT4* y *ERBB4*, que están implicados en la regulación negativa de la apoptosis, genes asociados con regulación epigenética como *FAM172BP* y *MBD2*, así como genes de la vía MAPK como *EPHA10*, *FLT4*, *RAPGEF5* y *ERBB4* (**Tabla 6**).

En las BMMCs expuestas a permetrina se encontraron dentro de los genes con la más baja expresión genes asociados con función antioxidante y de respuesta a estrés como *GPX8* y *PROZ*, así como genes que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos como *TBX15* y *RBMXL2*, genes asociados a las vía MAPK como *FGFR2* y *PDGFD*, genes que participan en muerte celular como *ADAM30*, genes con función de factores de transcripción *TBX15* y

GATA4, genes que codifican canales de sodio como *SCN9A* y genes con función de cadherina como *DCHS2*, *PCDH15* y *PCDH9*. Dentro de los genes con la mayor expresión en BMMCs expuestas a permetrina se encontraron aquellos que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos como *MBD2*, *FAM172BP* e *IFIT1*, genes asociados a regulación de la apoptosis como *BDNF*, genes de respuesta a estrés como *FIGF*, genes que codifican citocinas como *IL15RA*, y genes asociados a la vía TGF β como *GDF1* (**Tabla 7**).

En las PBMCs expuestas a permetrina se encontró dentro de los genes con la expresión más baja aquellos que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos como *SAMD7*, *LHX3*, *PRX* e *IFIT1B*, factores de transcripción como *ZFP42* y *WBP2NL*, genes que codifican citocinas como *A2ML1* e *IL13RA2*, cinasas como *MAPK4*, genes asociados a muerte celular como *LHX3* y *PRUNE2*. Dentro de los genes con la mayor expresión en PBMCs expuestas a permetrina se encontraron genes que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos como *VGLL3*, citocinas como *TNFSF11*, genes asociados a regulación de la apoptosis como *EPHA10*, *EPHA6*, *TNFSF11* y *PPEF1*, genes asociados a reparación del DNA como *HMGA2*, asociados a respuesta a estrés como *ATG10* y *HMGA2*, factores de transcripción como *HOXB5*, *FOX11*, *PER3*, *MYT1* y *KDM5S*, así como el gen *PLCH11*, asociado a inflamación (**Tabla 8**). Adicionalmente, se encontraron coincidencias en los genes con expresión alterada entre los diferentes tejidos estudiados (BMMCs y PBMCs), y también entre los diferentes plaguicidas (malatión y permetrina), en la **Figura 23** se muestran los genes en los que se mostró concordancia.

Tabla 5 Análisis ontológico de los cien genes con menor y mayor expresión por efecto del malatión en BMMCs.

BMMCs expuestas a malatión		
	Baja Expresión	Alta Expresión
Función molecular	Unión a ácidos nucleicos: <i>PROX2, NFIB</i>	Unión a DNA: <i>NR4A3, NR4A1</i>
		Citocinas: <i>CCL3, CCL7, CCL19, CCL1, CCL3L3, CCL20</i>
		Unión a receptor citocina: <i>CCL3, CCL7, CCL19, CCL1, CCL3L3, IL23A, CCL20</i>
	Estructural, citoesqueleto: <i>TUBB8</i>	Unión a receptor hormonal: <i>ADM, SCG5, EDN1</i>
		Receptor: receptor de citocinas <i>F3</i> , de necrosis tumoral: <i>TNF, TNFSF15</i>
Proceso biológico	Ciclo celular: <i>TUBB8, FGF22</i>	Adhesión celular: <i>ITGB8, ANGPTL4</i>
	Crecimiento celular: <i>LINGO1, LRIG3</i>	Regulación negativa de apoptosis: <i>MET</i>
	Diferenciación celular: <i>PLP1</i>	
	Muerte: <i>ADAM11, ADAM32</i>	
	Desarrollo del mesodermo: <i>ADAM11, PITX1, FGF22</i>	
	Respuesta a estímulo: <i>OPN5, LINGO1, LRIG3, DDR1, OR4D1, CEACAM7, OR2AT4, OR4F29, PROZ, OR4F21, AMOT, OR6C2, OR9G4</i>	
Componente celular	Unión intercelular: <i>AMOT</i>	Unión intercelular: <i>MYO1B</i>
	Núcleo: <i>PROX2, NFIB, FAM71D</i>	Núcleo: <i>IRAK2, NR4A3, NR4A1</i>
Clase de proteína	Adhesión: <i>CEACAM7</i>	Molécula de adhesión: <i>ITGB8</i>
	Defensa/Inmunidad: <i>CEACAM7, CRISP3</i>	Factor de crecimiento: <i>INHBA, HBEGF</i>
	Señalización: <i>PF4V1, CEACAM7, FGF22, FGG</i>	Quimiocinas: <i>CXCL8, CCL3, CCL7, CCL19, CXCL5, CCL1, CCL3L3, CXCL11, CCL20</i>
		Familia de interleucinas: <i>IL23A</i>
	Factor de transcripción: <i>PROX2, NFIB</i>	Familia de necrosis tumoral: <i>TNF, TNFSF15</i>
		Factor de transcripción: <i>HES4, NR4A3, NR4A1</i>

Tabla 6 Análisis ontológico de los cien genes con menor y mayor expresión por efecto del malatión en PBMCs.

PBMCs expuestas a Malatión		
	Baja Expresión	Alta expresión
Función molecular	Unión a cromatina: <i>WBP2NL</i>	Unión a ácidos nucleicos: <i>ZFPM2, IRX2</i>
	Unión a ácidos nucleicos: <i>ZFP42, ENI, WBP2NL</i>	Proteína cinasa: <i>CDK15, GRK1</i>
	Factor de transcripción: <i>ZFP42, WBP2NL</i>	Receptor tirosina cinasa: <i>EPHA10, FLT4, ERBB4</i>
	Citocinas: <i>TNFSF15</i>	
	Metiltransferasa: <i>HNMT</i>	
Proceso biológico	Señalización por citocinas: <i>TNFSF15</i>	Adhesión celular: <i>PCDHGB1</i>
	Ciclo celular: <i>S100A1, CROCCP3</i>	Regulación negativa de apoptosis: <i>EPHA10, FLT4, ERBB4</i>
	Diferenciación durante el desarrollo: <i>GATA4, LEP1</i>	Regulación epigenética: <i>FAM172BP, MBD2</i>
	Muerte: <i>TNFSF15, PDIA2</i>	Organización de la cromatina: <i>MBD2</i>
	Respuesta inmune: <i>CMA1</i>	Transducción de señales: MAPK: <i>EPHA10, FLT4, RAPGEF5, ERBB4</i>
	Respuesta a estrés: <i>APLF, PDIA2</i>	Diferenciación durante el desarrollo: <i>EPHA10, FLT4, ZFPM2, GP5, ERBB4</i>
		Desarrollo embrionario: <i>DLG2</i>
Replicación del DNA: <i>GMNC</i>		
Componente celular	Uniones intercelulares: <i>AMOT</i>	Núcleo: <i>CDK15, TCF7L1</i>
	Cromosomas: <i>ZFP42, APLF</i>	
	Microtúbulos: <i>KIF6</i>	
Clase de proteína	Modulador de cinasas: <i>CROCCP3</i>	Adhesión: <i>RS1</i>
	Nucleasa: <i>GATA4</i>	Nucleasa: <i>TDRD6, TDRD1</i>
	Citocinas: <i>TNFSF15, SST</i>	Factor de transcripción: <i>IRX2, ZFPM2</i>
	Factor de transcripción: <i>MEIS1, ZFP42, ARNT2</i>	
Vías	Endotelin: <i>EDNRB</i>	Cadherinas: <i>PCDHGB1, ERBB4, TCF7L1</i>
		Vía EGF: <i>ERRB4</i>
		Endotelina: <i>PLCB4</i>
		Inflamación: <i>PLCB4, GNAII</i>
		Vía VEGF: <i>FLT4</i>
	WNT: <i>ENI</i>	WNT: <i>TCF7L1, PCDHGB1, PLCB4</i>

Tabla 7 Análisis ontológico de los cien genes con menor y mayor expresión por efecto de la permetrina en BMMCs.

BMMCs expuestas a permetrina		
	Baja Expresión	Alta Expresión
Función molecular	Antioxidante: <i>GPX8</i>	Unión a ácidos nucleicos: <i>MBD2, FAM172BP, IFIT1</i>
	Unión a ácidos nucleicos: <i>TBX15, RBMXL2</i>	Factor de crecimiento: <i>BDNF, FIGF</i>
	Cinasa: <i>PDGFD</i>	Actividad hormonal: <i>CGB2</i>
Proceso biológico	Adhesión celular: <i>ITGB6, PCDH15, PCDH9</i>	Adhesión celular: <i>ZNF645, PARD3, SSX21P</i>
	Regulación negativa de apoptosis: <i>FGFR2</i>	Regulación negativa de apoptosis: <i>BDNF</i>
	Señalización intracelular: cascada MAPK: <i>FGFR2, PDGFD</i>	Regulación epigenética: <i>FAM172BP, MBD2</i>
	Ciclo celular: <i>MAPRE3, TPTE2</i>	Organización de la cromatina: <i>MBD2</i>
	Crecimiento celular: <i>HMCN2</i>	Transducción de señales: MAPK: <i>GDF1</i>
	Proliferación celular: <i>PDGFD</i>	Ciclo celular: <i>CDKL4, ACTL7B</i>
	Diferenciación durante el desarrollo: <i>FGFR2, HMCN2, BSPH1, PLP1, GATA4, LMOD1</i>	Crecimiento celular: <i>DCN</i>
	Muerte celular: <i>ADAM30</i>	Proliferación: <i>FIGF</i>
	Respuesta a estrés: <i>GPX8, PROZ</i>	Diferenciación durante el desarrollo: <i>DCN, GDF1, BDNF, BRSK1</i>
Componente celular	Núcleo: <i>CSN3, RBMXL2</i>	Muerte: <i>IFI27, GDF1</i>
		Respuesta a estrés: <i>FIGF</i>
Clase de proteína	Núcleo: <i>CDKL4</i>	
	Adhesión: <i>ITGB6</i>	Adhesión: <i>FBLN2</i>
	Nucleasa: <i>GATA4</i>	Nucleasa: <i>TDRD6</i>
	Factor de transcripción: <i>TBX15, GATA4</i> Canal de sodio dependiente de voltaje: <i>SCN9A</i>	Factor de crecimiento: <i>BDNF</i>
Vías	Angiogénesis: <i>PDGFD</i>	Interleucinas: <i>IL15RA</i>
	Cadherinas: <i>DCHS2, PCDH15, PCDH9</i>	
	Endotelina: <i>EDNRB</i>	
	Vía FGF: <i>FGFR2</i>	TGFB: <i>GDF1</i>
	Vía PI3K: <i>TPTE2</i>	
	WNT: <i>DCHS2, PCDH15, PCDH9</i>	
	P53: <i>TPTE2</i>	
Coagulación: <i>PROZ</i>		

Tabla 8 Análisis ontológico de los cien genes con mayor represión en la expresión por efecto de la permetrina en PBMCs.

PBMCs expuestas a permetrina		
	Baja Expresión	Alta expresión
Función molecular	Unión a cromatina: <i>SAMD7, WBP2NL</i>	Unión a ácidos nucleicos: <i>VGLL3</i>
	Unión a ácidos nucleicos: <i>SAMD7, LHX3, PRX, IFIT1B</i>	Citocinas: <i>TNFSF11</i>
	Factor de transcripción: <i>ZFP42, WBP2NL</i>	
	Citocinas: <i>A2ML1, IL13RA2</i>	
	Cinasas: <i>MAPK4</i>	
Proceso biológico	Regulación negativa de apoptosis: <i>LHX3</i>	Adhesión celular: <i>PCDHA8, PCDHB18P</i>
		Regulación negativa de apoptosis: <i>EPHA10, EPHA6</i>
	Organización de citoesqueleto: <i>TUBB8</i>	Ensamble de cromatina: <i>HIST2H3BF</i>
		Cascada MAPK: <i>EPHA10, RAPGEF5, EPHA6, GAB1</i>
	Ciclo celular: <i>TUBB8, SAMD7</i>	Mitosis: <i>RAPGEF5</i>
	Crecimiento celular: <i>MXRA5, SEMA5B</i>	Diferenciación durante desarrollo: <i>EPHA10, SPRR1A, WNT11, EPHA6</i>
	Diferenciación durante desarrollo: <i>PSAPL1, MXRA5, SEMA5B</i>	Muerte: <i>TNFSF11, PPEF1</i>
		Desarrollo de mesodermo: <i>GAB1</i>
		Reparación del DNA: <i>HMGA2</i>
	Muerte: <i>PRUNE2</i>	Splicing: <i>RBMX2</i>
	Desarrollo de mesodermo: <i>COL8A1, LHX3</i>	Producción de citocinas: <i>BTNL3</i>
		Respuesta a estrés: <i>ATG10, HMGA2</i>
Componente celular	Núcleo: <i>MAPK4, WBP2NL</i>	Núcleo: <i>RBMX2, PER3, PUS7L, VGLL3, HMGA2</i>
Clase de proteína	Cinasas: <i>MAPK4</i>	Histona: <i>HIST2H2BF</i>
		Citocinas: <i>TNFSF11</i>
		Factor de transcripción: <i>HOXB5, FOXI1, PER3, MYT1, KDM5A</i>
Vías	Interleucinas: <i>IL13RA2</i>	CCKR: <i>MMP7</i>
	WNT: <i>ANKYRIN</i>	Cadherinas: <i>PCDHA8, MMTV, WNT11</i>
		Vía EGF: <i>GAB1</i>
		Inflamación: <i>PLCH11</i>

		PDGF: <i>GAB1</i>
		WNT: <i>PCDHA8, PCDHB18P, MMTV, WNT11, MMP7</i>

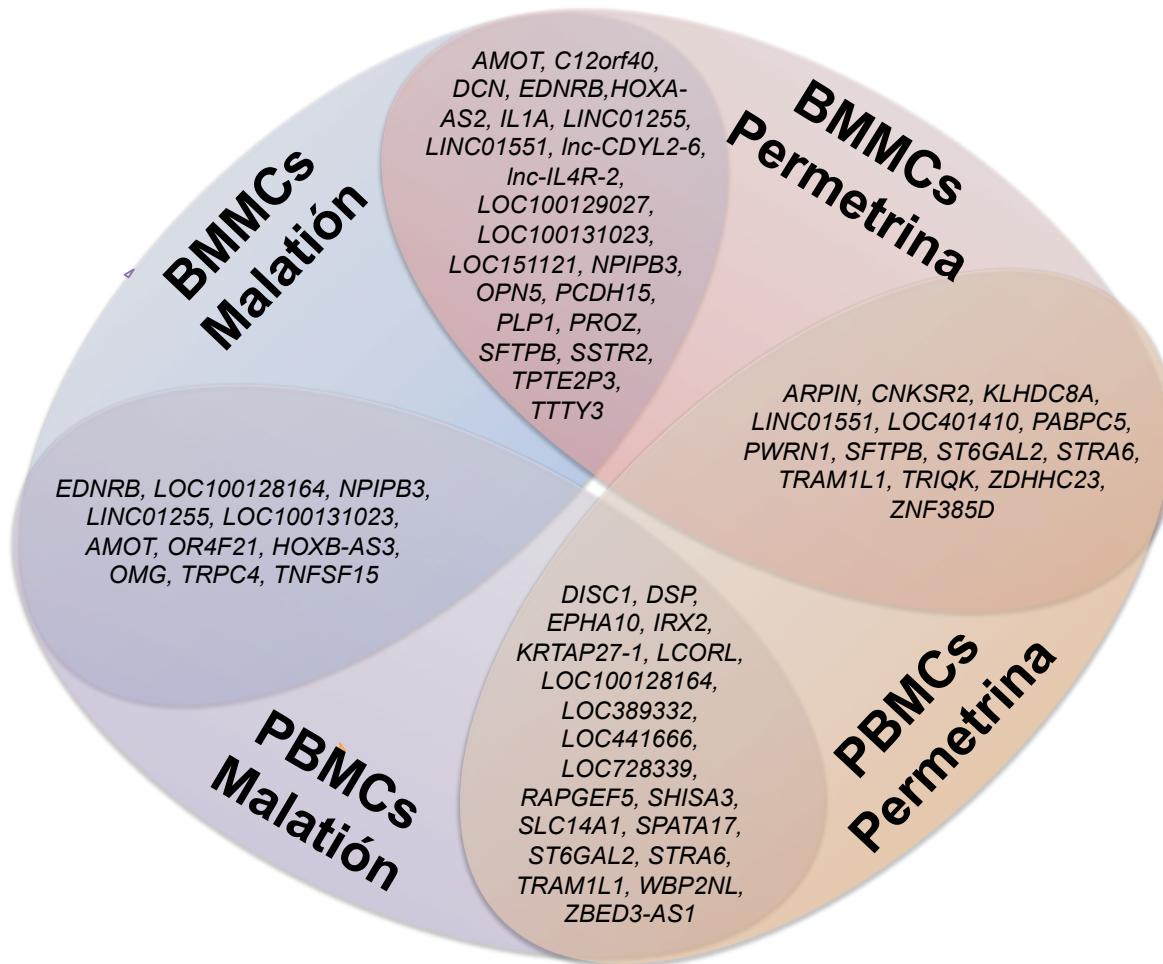


Figura 23 Genes con expresión alterada en más de una condición. Derivado del análisis de los 100 genes con la mayor y los 100 con la menor expresión en BMMCs y en PBMCs expuestas a malatión y a permetrina. Se muestran aquellos en los que hubo coincidencias.

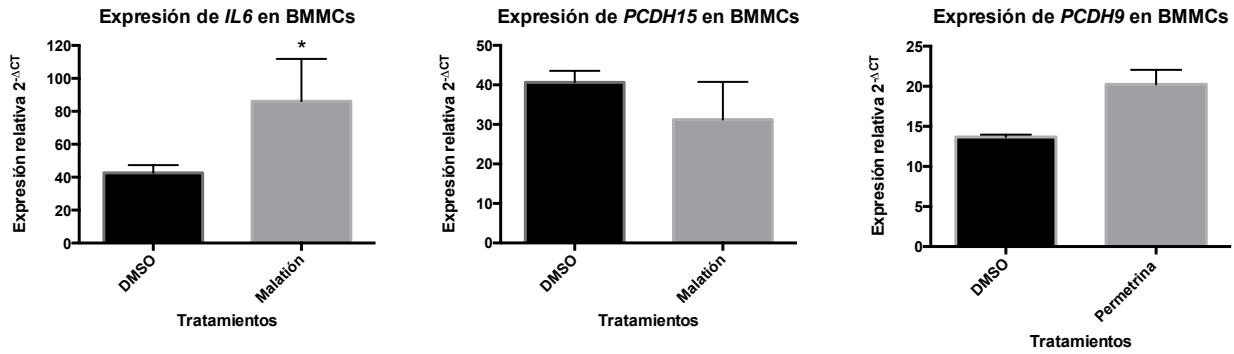
Adicionalmente, con los 100 genes con mayor y menor expresión se realizó un análisis con la herramienta GeneMANIA, con la que se determinó la interacción entre los genes, sus funciones moleculares y vías en común, el resumen de los hallazgos se muestran en la **Tabla 9** y los resultados completos se muestran en el **Anexo 8**. En cuanto a las funciones moleculares, se encontraron algunas coincidencias con el análisis realizado con la herramienta PANTHER, además de otros resultados adicionales. En las BMMCs expuestas a malatión se encontró que los genes con baja expresión tienen actividad de canales iónicos, participan en la regulación negativa de la diferenciación y desarrollo celular. Por otro lado, se observó que muchos de los genes con alta expresión se co-expresan y se asocian a funciones como actividad citocina, regulación negativa del crecimiento, diferenciación de leucocitos y respuesta inflamatoria; la mayoría de estas funciones también se identificaron con el programa PANTHER. Por otro lado, en las PBMCs se encontró que los genes con alta expresión comparten ciertas interacciones físicas y participan en la regulación de la plasticidad sináptica. En cuanto al efecto de la permetrina, se observó que varios de los genes con alta expresión en las BMMCs se co-expresan y participan en la vía de señalización del interferón de tipo 1 (IFN1). Por otra parte, en las PMBCs se evidenció que los genes con alta expresión presentan interacciones génicas y se asocian a funciones como regulación del metabolismo de ROS, y señalización de efrinas y sus receptores.

Tabla 9 Análisis de los 100 genes con mayor y 100 con menor expresión con Genemania

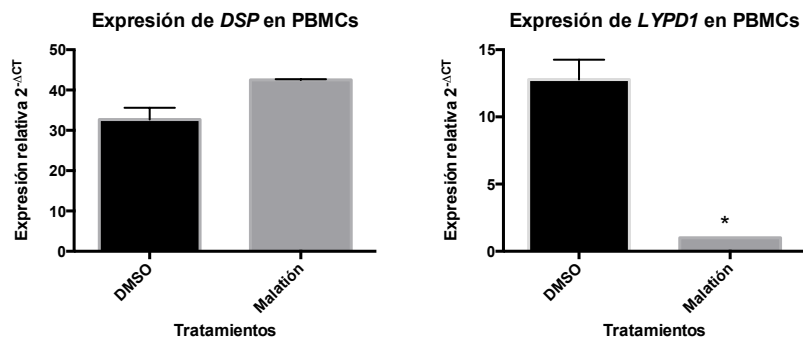
		Baja Expresión	Alta Expresión
Malatión	BMMCs	Actividad de canal	Respuesta inflamatoria
		Regulación negativa del desarrollo celular	Regulación negativa del crecimiento
		Actividad de canal iónico	Actividad citocina
		Regulación negativa de la diferenciación celular	Diferenciación de leucocitos
	PBMCs	-	Regulación de la actividad sináptica
Permetrina	BMMCs	-	Vía de señalización de Interferón tipo 1
			Respuesta celular a interferón tipo 1
	PBMCs	Actividad de canal poro amplio	Regulación positiva de especies reactivas de oxígeno
			Señalización por efrinas
			Interacción proteína- proteínas, puentes

(-) No se obtuvieron resultados

Mediante qPCR se analizó la expresión de 5 genes (*IL6*, *PCDH15*, *PCDH9*, *DSP*, *LYPD1*), los cuales fueron seleccionados por encontrarse dentro de los 100 con mayor y menor expresión y por tener alguna relevancia en cáncer. El análisis de la expresión de estos genes se realizó en muestras de PBMCs y BMMCs independientes a las utilizadas para el análisis por microarreglos. En el análisis por qPCR se observó una tendencia de incremento o decremento de la expresión con el tratamiento de los insecticidas, la cual coincidió con lo observado mediante microarreglos de expresión. Sin embargo, solamente en dos casos (*IL6* y *LYPD1*) se encontró diferencia significativa, en los que se encontró sobreexpresión (*IL6*) y baja expresión (*LYPD1*) en células expuestas a malatión en BMMCs y en PBMCs, respectivamente (**Figura 24**).



* $p < 0.001$, Chi cuadrado



* $p < 0.001$, Chi cuadrado

Figura 24 Validación de alteración en la expresión de genes por efecto de la exposición a insecticidas. En muestras independientes de PBMCs y BMMCs se analizó el efecto de la exposición a malatión y permetrina (0.1μ , 72 h) en la expresión de los genes seleccionados mediante qPCR. * $p < 0.05$, Chi Cuadrada

6.1.2.2 Efecto en la metilación génica

Se seleccionaron 100 genes en BMMCs expuestas a malatión (25 sobreexpresados y 25 con baja expresión) o permetrina (25 sobreexpresados y 25 con baja expresión), los cuales fueron seleccionados por estar dentro del grupo de los 100 más o menos expresados y por tener alguna función relevante determinada en el análisis ontológico. De los 100 genes seleccionados, se obtuvo información de 78 de ellos en el microarreglo de metilación, la lista de los 78 genes se muestra en el **Anexo 9**. Se analizaron 17 y 21 genes con baja y alta expresión en las BMMCs expuestas a malatión respectivamente y se analizaron 24 y 16 genes con baja y alta expresión por efecto de la permetrina en las BMMCs. Se encontró que el 15.3% (12/78) de los genes presentó algún cambio en el estado de metilación de la región promotora, que fue concordante con el estado de expresión génica. De los genes estudiados, se encontraron de manera general, más eventos de desmetilación que de hipermetilación inducida por los insecticidas. Se identificaron 2/17 (11.7%) genes (*KCNMA1* y *ADAM11*) con hipermetilación en la región promotora en BMMCs expuestas a malatión, que fue concordante con baja expresión. Por otra parte, se identificó que los promotores de 4/21 (19%) genes (*INHBA*, *NR4A3*, *ANGPTL4*, *ITGB8*) mostraron desmetilación en la región promotora, que coincidió con alta expresión inducida por la exposición a malatión en células BMMCs. En cuanto a la exposición a permetrina, se encontró que este agente no induce hipermetilación en los genes analizados (0/24). Por el contrario, los eventos de desmetilación fueron frecuentes, ya que se detectó que 6/16 (37.5%) de los genes analizados (*ST6GAL2*, *FIGF*, *BDNF*, *PARD3*, *MAPK*, *TDRD6*) presentaron desmetilación en la región promotora, que coincidió con alta expresión de genes en BMMCs expuestos a permetrina. En la **Tabla 10** se muestran los genes detectados en cada caso con los valores de z correspondientes.

Tabla 10 Análisis del estado de metilación de genes seleccionados

Genes reprimidos por efecto del malatión en BMMCs					
GEN	LOCUS	ΣZ DMSO	ΣZ Malatión	Estado de metilación	Malatión-DMSO
<i>KCNMA1</i>	10q22.3	39.65	62.97	Hipermetilado	23.32
<i>ADAM11</i>	17q21.31	-44.58	55.14	Hipermetilado	99.72

Genes con sobreexpresión por efecto del malatión en BMMCs					
GEN	LOCUS	ΣZ DMSO	ΣZ Malatión	Estado de metilación	DMSO-Malatión
<i>INHBA</i>	7p14.1	9.74	-11.36	Hipometilado	21.10
<i>NR4A3</i>	9q22	167.30	65.15	Hipometilado	102.15
<i>ANGPTL4</i>	19p13.2	31.23	-62.18	Hipometilado	93.41
<i>ITGB8</i>	7p21.1	66.01	0.25	Hipometilado	65.77

Genes con sobreexpresión por efecto de la permetrina en BMMCs					
GEN	LOCUS	ΣZ DMSO	ΣZ Permetrina	Estado de metilación	DMSO-Permetrina
<i>ST6GAL2</i>	2q12.3	86.51	-3.67	Hipometilado	90.17
<i>FIGF</i>	Xp22.2	28.40	0.92	Hipometilado	27.48
<i>BDNF</i>	11p14.1	128.06	-1.27	Hipometilado	129.32
<i>PARD3</i>	10p11.22-p11.21	27.95	-5.93	Hipometilado	33.88
<i>MAPK</i>	22q11.22	18.07	-13.69	Hipometilado	31.76
<i>TDRD6</i>	6p12.3	62.78	0.03	Hipometilado	62.75

6.2 Efecto de la permetrina *in vivo*

Se analizó el efecto de la exposición *in utero* a permetrina en ratones neonatos BalbC, en los que se analizó si este agente afecta el potencial de diferenciación de linfocitos B, así como el daño al DNA en células de médula ósea (**Figura 25**).

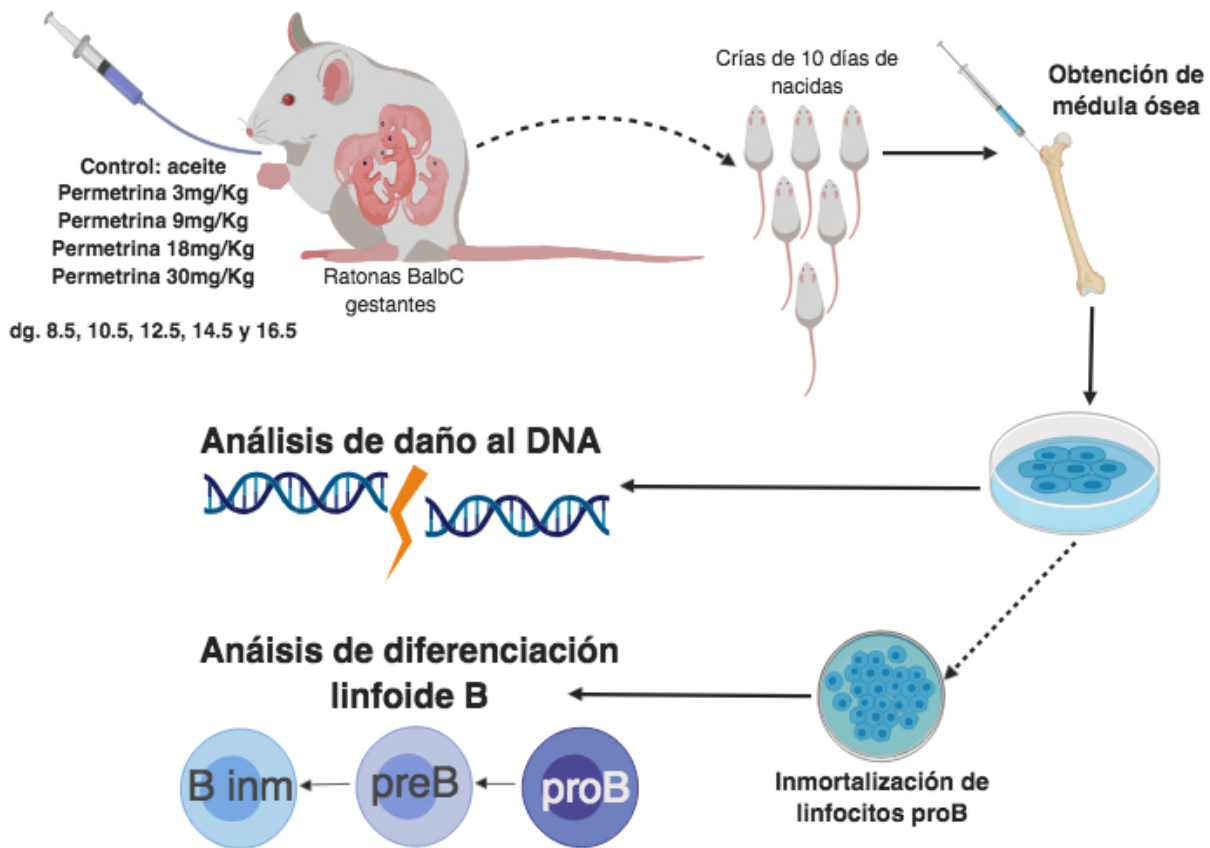


Figura 25 Análisis de daño al DNA y del potencial de diferenciación linfocitoide B en crías BalbC expuestas *in utero* a permetrina.

6.2.1. Características de las crías expuestas *in utero* a permetrina.

Se estudiaron cuatro diferentes dosis de permetrina (0, 3, 9, 18, 30 mg/kg), las cuales son biológicamente relevantes de acuerdo a lo observado en individuos, administrada a los días de gestación (8.5, 10.5, 12.5, 14.5 y 16.5). En cada grupo se incluyeron tres hembras gestantes; ninguna gestante del grupo expuesto a 30 mg/kg completó la gestación, a pesar de mostrar datos de preñez (tapón vaginal, incremento de peso durante los primeros 10 días). En general, se encontraron mayores camadas en las gestantes expuestas a permetrina, el número máximo de crías se detectó con la dosis de 9 mg/kg; sin embargo no fue significativo (**Figura 26a**). Tanto en el peso total como en el peso del hígado se observó tendencia a incrementar con los tratamientos, sin significancia estadística (**Figura 26b, 29c**). No se notó diferencia en el peso del bazo (**Figura 26d**). A partir de cada cría de 10 días se obtuvo la médula ósea y las muestras de cada camada se concentraron para realizar los ensayos de diferenciación de linfocitos B y daño al DNA (**Figura 25**).

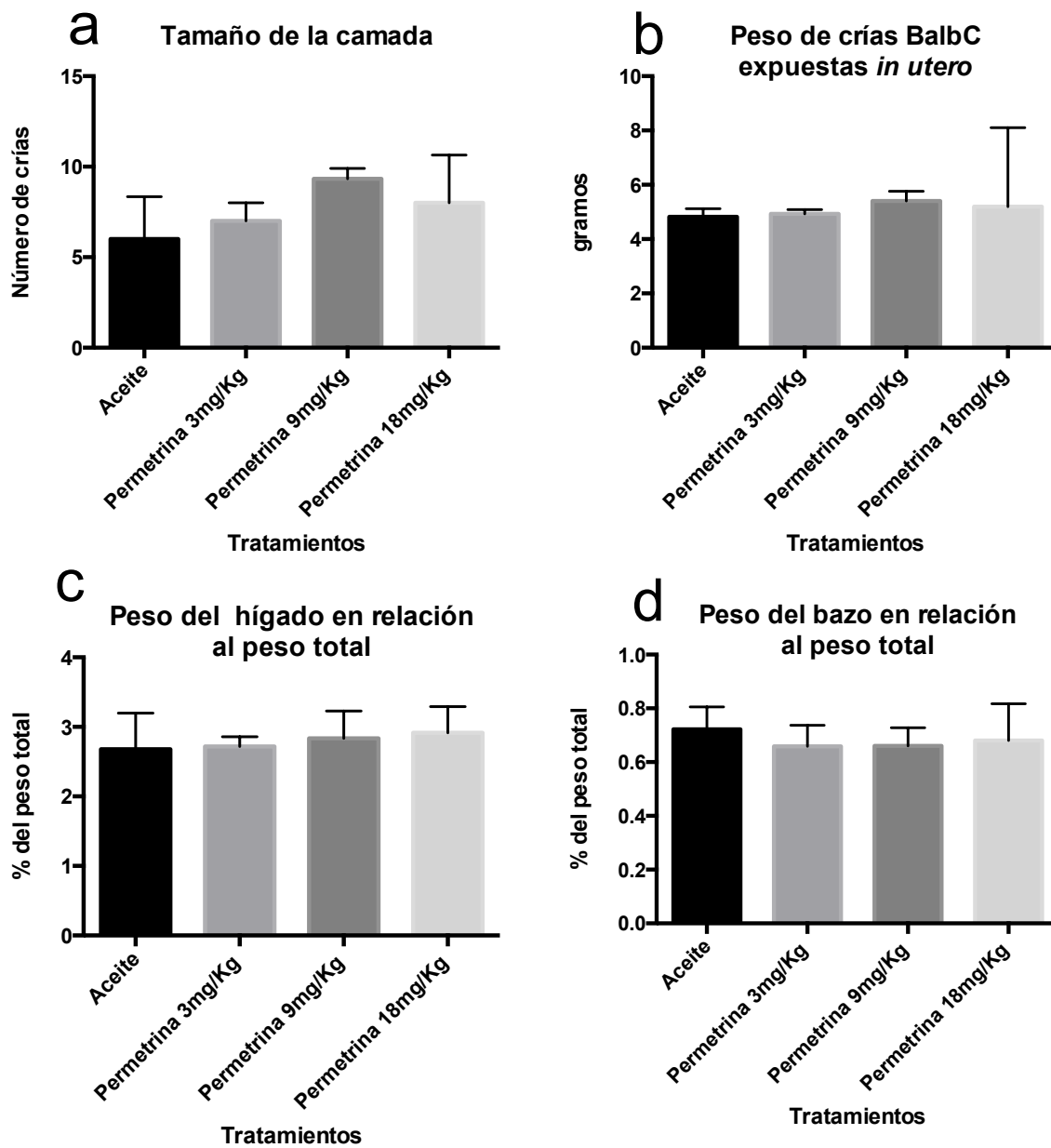


Figura 26 Características de las crías expuestas *in utero* a permetrina. a) Promedio del número de crías. b) Promedio del peso al nacer. c) Promedio del peso del hígado con relación al peso total. d) Promedio del peso del bazo con relación al peso total. No se encontraron diferencias significativas, ANOVA.

6.2.2. Efecto *in utero* de la permectrina en el potencial de diferenciación de linaje linfoide B.

Se obtuvieron líneas celulares de linfocitos proB de 3 gestantes expuestas a aceite y de 3 gestantes expuestas a permectrina a una dosis de 3 mg/kg. Para evaluar el potencial de diferenciación linfoide, cada línea de células proB inmortalizadas fue cultivada en ausencia y presencia de IL7; ya que esta citocina permite que las células se mantengan en estadio proB, y en ausencia de ésta las células proB progresan en la diferenciación, generando linfocitos preB y B inmaduros. Se evaluó la población de linfocitos proB, preB y B inmaduros, así como la viabilidad a las 0, 24, 48 y 72 h de cultivo con o sin IL7. En los cultivos en presencia de IL7 la viabilidad se mantuvo cerca del 80% en todos los casos, no se observó diferencia significativa entre los linfocitos derivados de ratones expuestos a aceite y los expuestos a permectrina 3 mg/kg (**Figura 30**). Por medio de citometría de flujo se comprobó que el inmunofenotipo de cada línea celular coincidía con el de células proB (B220+, CD43+, CD22-, IgM-).

Se observó una marcada disminución de la viabilidad desde las 24 h en los cultivos de células proB en ausencia de IL7, aún en los ratones expuestos a aceite. En las células proB de ratones expuestos a permectrina también se observó reducción de la viabilidad; sin embargo, a las 24 y 72 h la viabilidad de estas células fue ligeramente mayor que la de las células proB de ratones expuestos a aceite (**Figura 27**). En el análisis de poblaciones del ensayo de diferenciación, en general se observaron porcentajes mayores de linfocitos proB derivados de ratones expuestos a permectrina, en comparación con los derivados de ratones expuestos a aceite en cada tiempo evaluado; esta diferencia fue estadísticamente significativa a las 24 h y 72 h (**Figuras 28 y 29a**). Por otra parte, los porcentajes de linfocitos preB derivados de ratones expuestos a permectrina fueron inferiores que los derivados de ratones control, fueron significativamente menores a las 24 y 72 h (**Figura 29b**). La frecuencia de linfocitos B inmaduros fue estadísticamente inferior en cultivos de ratones expuestos a permectrina, en comparación con los ratones control a las 48 y 72 h (**Figura 29c**). Estos resultados sugieren que los linfocitos proB derivados de ratones expuestos a permectrina presentan cambios en el potencial de diferenciación linfoide B, en comparación

con linfocitos de ratones no expuestos, por lo que podrían estar en arresto en el estadio proB, observándose mayores porcentajes de proB y menores porcentajes de preB y B inmaduros en comparación con los linfocitos de ratones control.

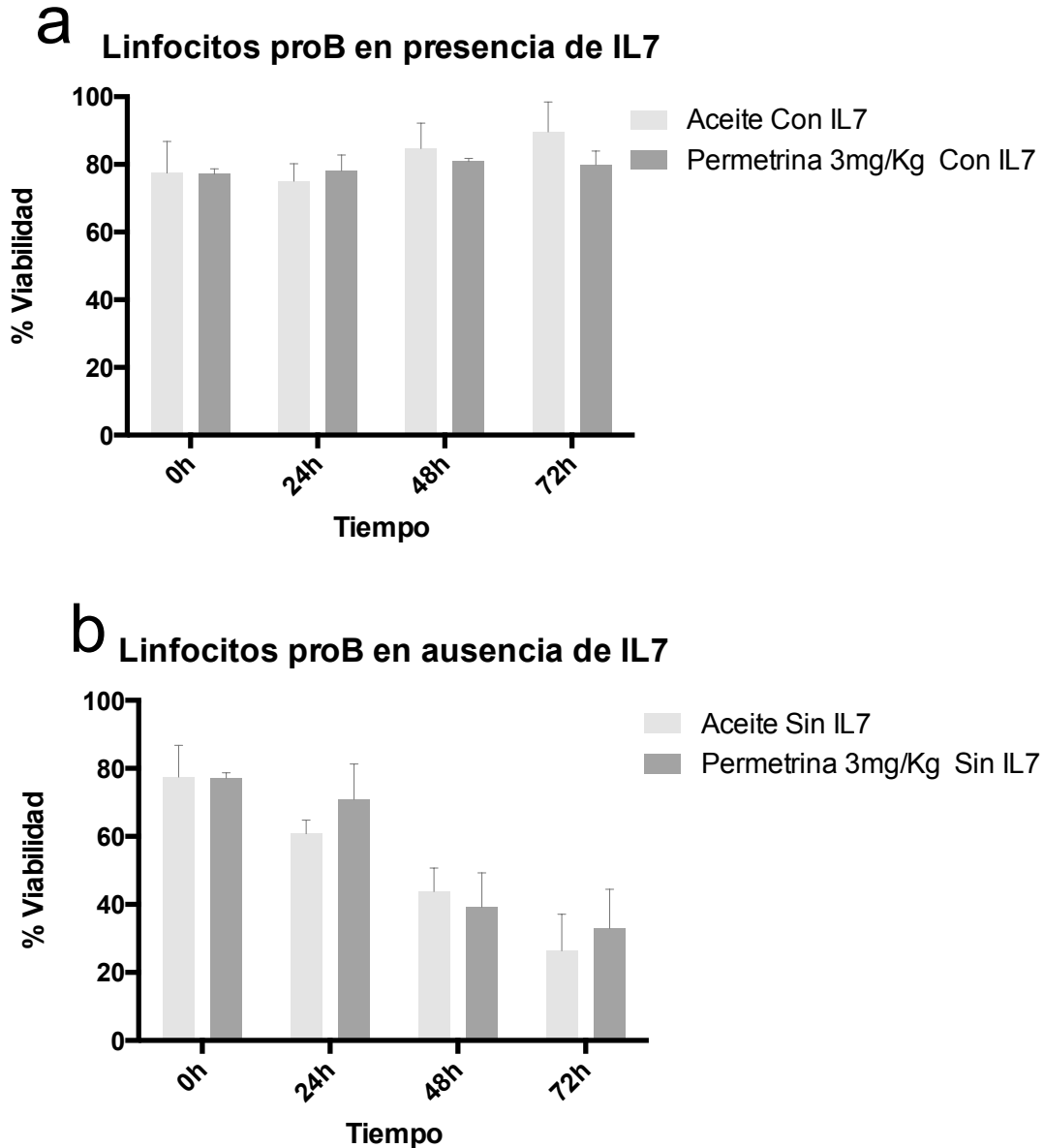


Figura 27 Viabilidad en ausencia y presencia de IL7 de linfocitos proB de ratones neonatos expuestos y no expuestos. No se encontraron diferencias significativas (T Student) entre los linfocitos proB derivados de ratones control y los expuestos a permetrina.

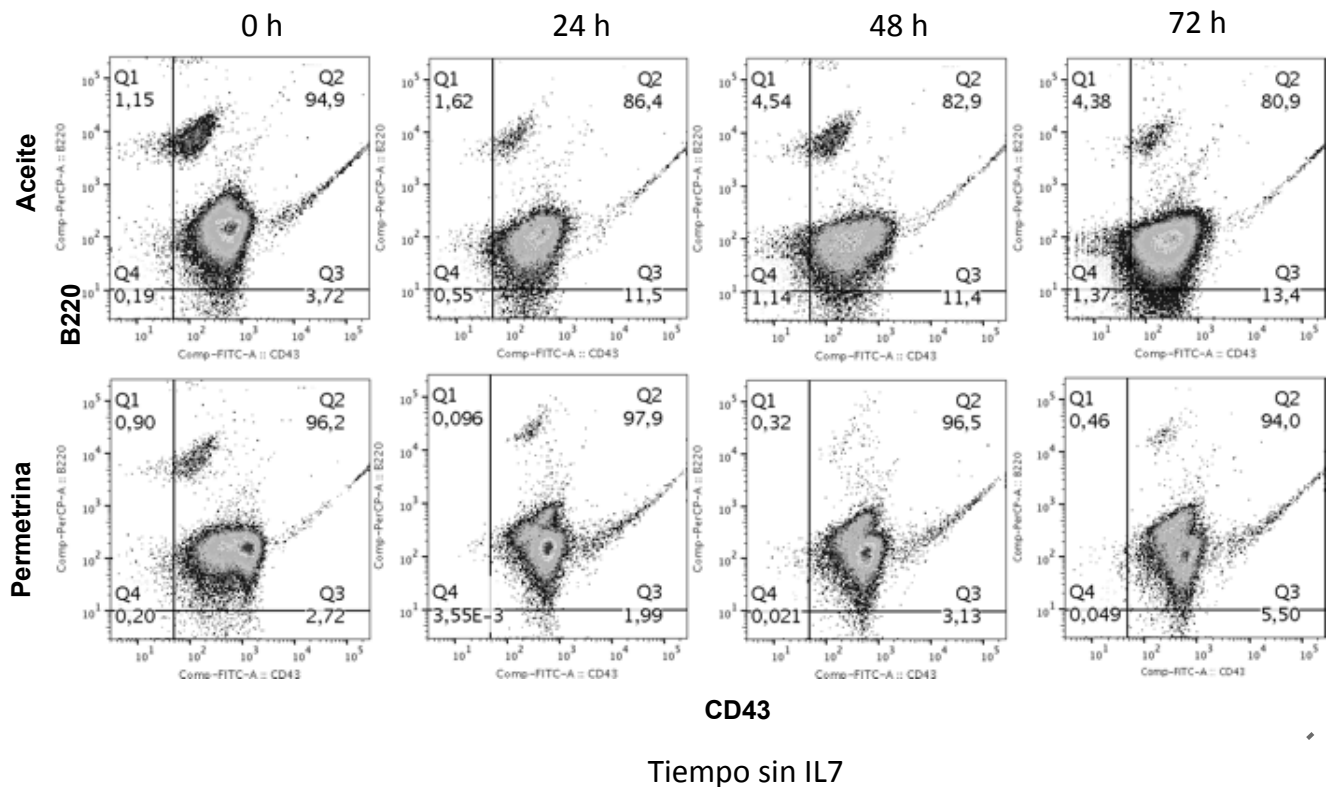


Figura 28 Ensayo de citometría de flujo representativo del análisis de diferenciación linfocito B. Se presenta la población de células B220+, CD43+ (CD22-, no mostrado) en cada tiempo de cultivo sin IL7. El porcentaje de linfocitos proB (población Q2) de ratones expuestos a aceite tendió a disminuir con el tiempo en cultivo sin IL7, mientras que el porcentaje de linfocitos proB de ratones expuestos a permetrina (3mg/Kg) se mantuvo durante el tiempo en cultivo sin IL7. Por otro lado, los linfocitos B220+, CD43- (preB, Q1) tendió a incrementar en cultivos de linfocitos de ratones expuestos a aceite, y disminuyó en aquellos cultivos de linfocitos provenientes de ratones expuestos a permetrina

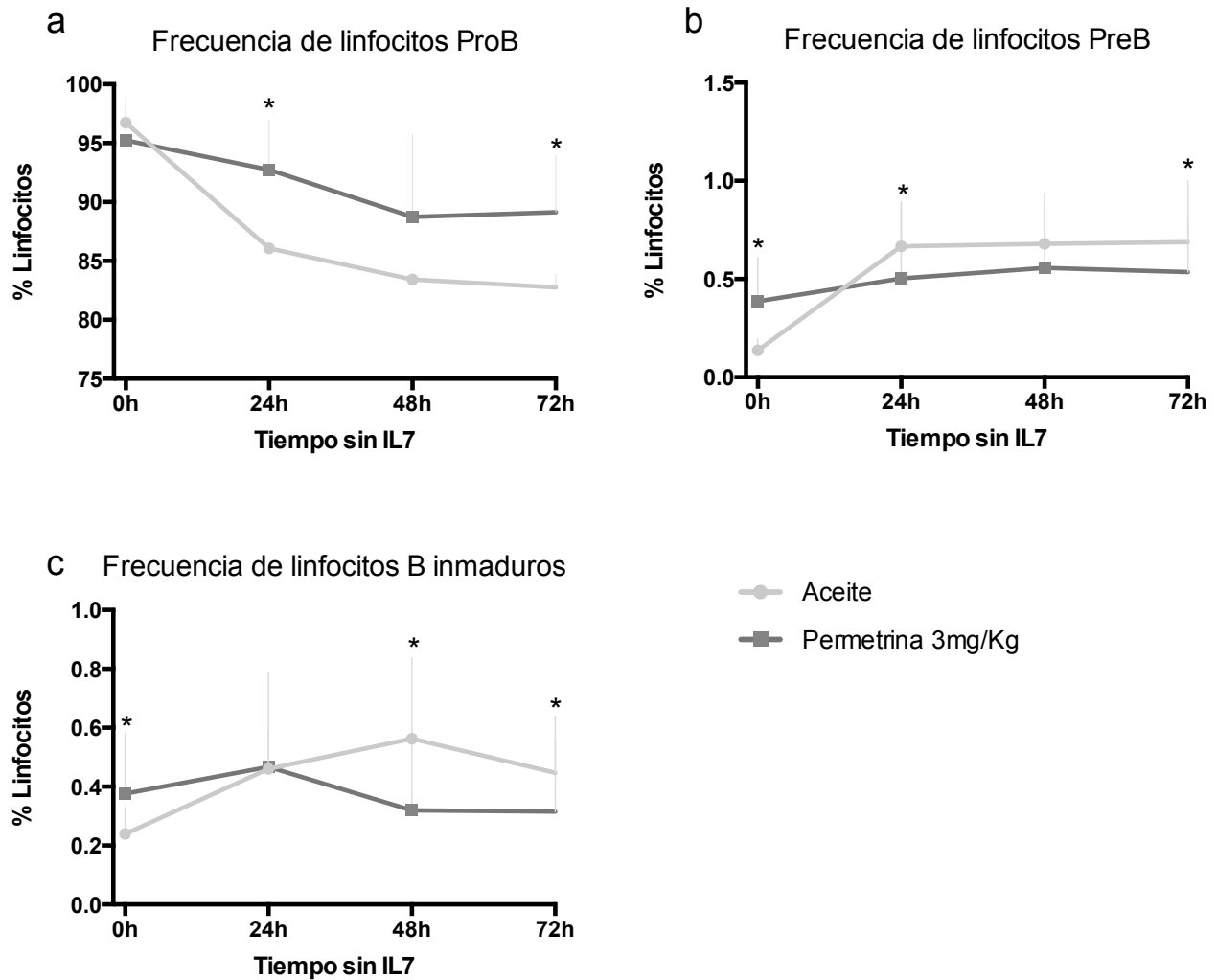


Figura 29 Análisis del potencial de diferenciación de linfocitos proB de ratones expuestos in utero a pemetrina. a) Porcentaje de linfocitos proB (B220+,CD43+,CD22-, IgM-) en ausencia de IL-7. b) Porcentaje de linfocitos preB (B220+, CD43-, CD22+, IgM-) en ausencia de IL-7. c) Porcentaje de linfocitos B inmaduros (B220+, CD43-, CD22+, IgM+) en ausencia de IL-7. * $p < 0.05$, Chi Cuadrada.

6.2.3 Efecto de la exposición *in vitro* a permetrina en el daño al DNA de linfocitos proB murinos.

Se determinó la frecuencia de rupturas de doble cadena del DNA, en linfocitos proB inmortalizados expuestos *in vitro* durante 0.5, 1 y 3 h a 0.1, 1, 10, 100 y 200 μM de permetrina. Se incluyó etopósido, 1 y 10 μM como control positivo evaluado en los mismos tiempos. El mayor daño al DNA se detectó con la exposición de 1 hora de exposición con el control positivo. Al monitorear a las 0.5 y 1 h, se encontró incremento significativo en el daño al DNA con la exposición a 0.1 μM de permetrina ($p < 0.05$, Chi cuadrada); con el resto de las concentraciones no se observó efecto significativo (**Figura 30**).

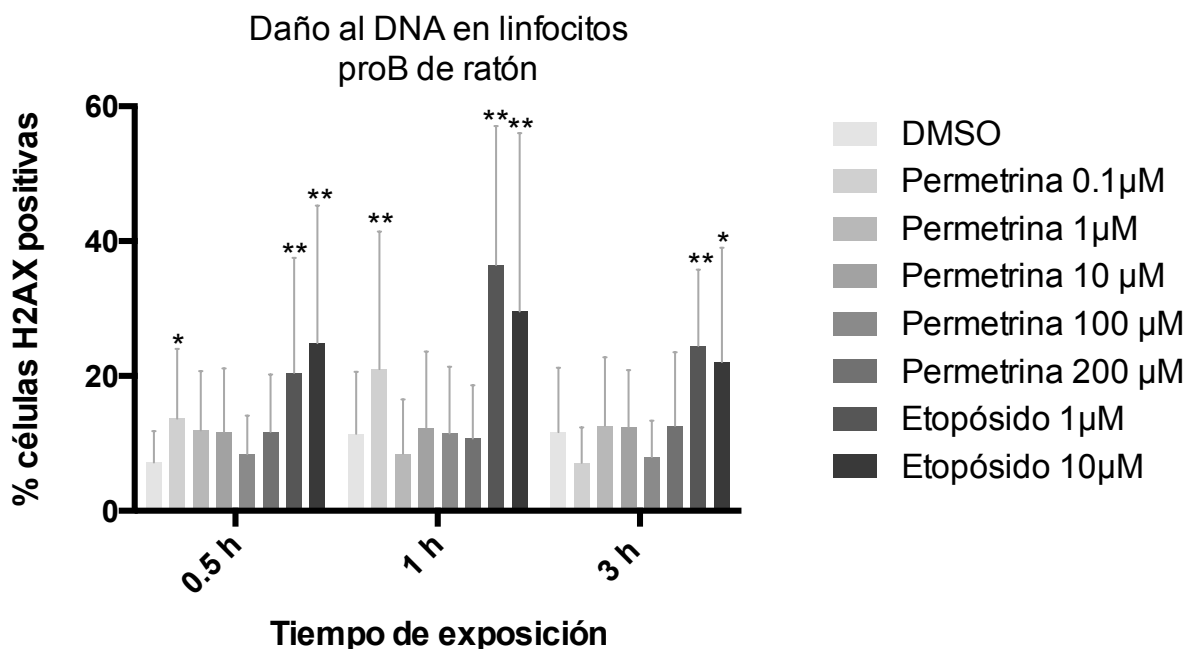


Figura 30 Efecto de la permetrina en el daño al DNA en linfocitos proB expuestos *in vitro*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Chi Cuadrada.

6.2.4 Efecto de la exposición *in utero* a permetrina en el daño al DNA en médula ósea y linfocitos B.

Se evaluó el daño al DNA en células de médula ósea de ratones neonatos expuestos *in utero* a 0, 3, 9 y 18 mg/kg de permetrina mediante la detección de la fosforilación de la histona H2AX, la cual se fosforila cuando existen DSB. Se encontró mayor daño al DNA en la médula ósea de ratones expuestos a 9 y 18 mg/kg en comparación con los ratones control. Al analizar únicamente células de estirpe B, de igual forma se encontró significativamente mayor daño en el DNA en ratones expuestos a 9 y 18 mg/kg en comparación con los control. Sin embargo, se evidenció mayor daño en el DNA en células preB que en las proB, en las que se detectó incremento significativo únicamente a la mayor dosis. No se notó efecto con la exposición *in utero* a 3 mg/kg en ninguno de los tipos celulares analizados (**Figuras 31 y 32**).

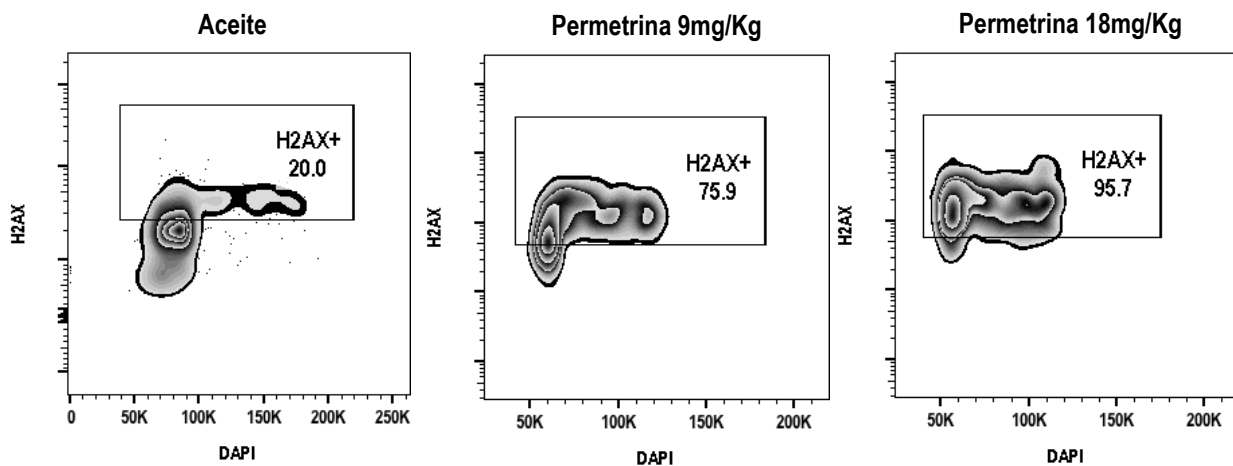


Figura 31 Gráficas representativas de citometría de flujo del análisis de daño al DNA. Se muestra la población H2AX+ en linfocitos preB (B220+,CD43-,CD22+,IgM-). Se detectó mayor porcentaje de daño en linfocitos preB de ratones expuestos a permetrina 9 y 18mg/Kg

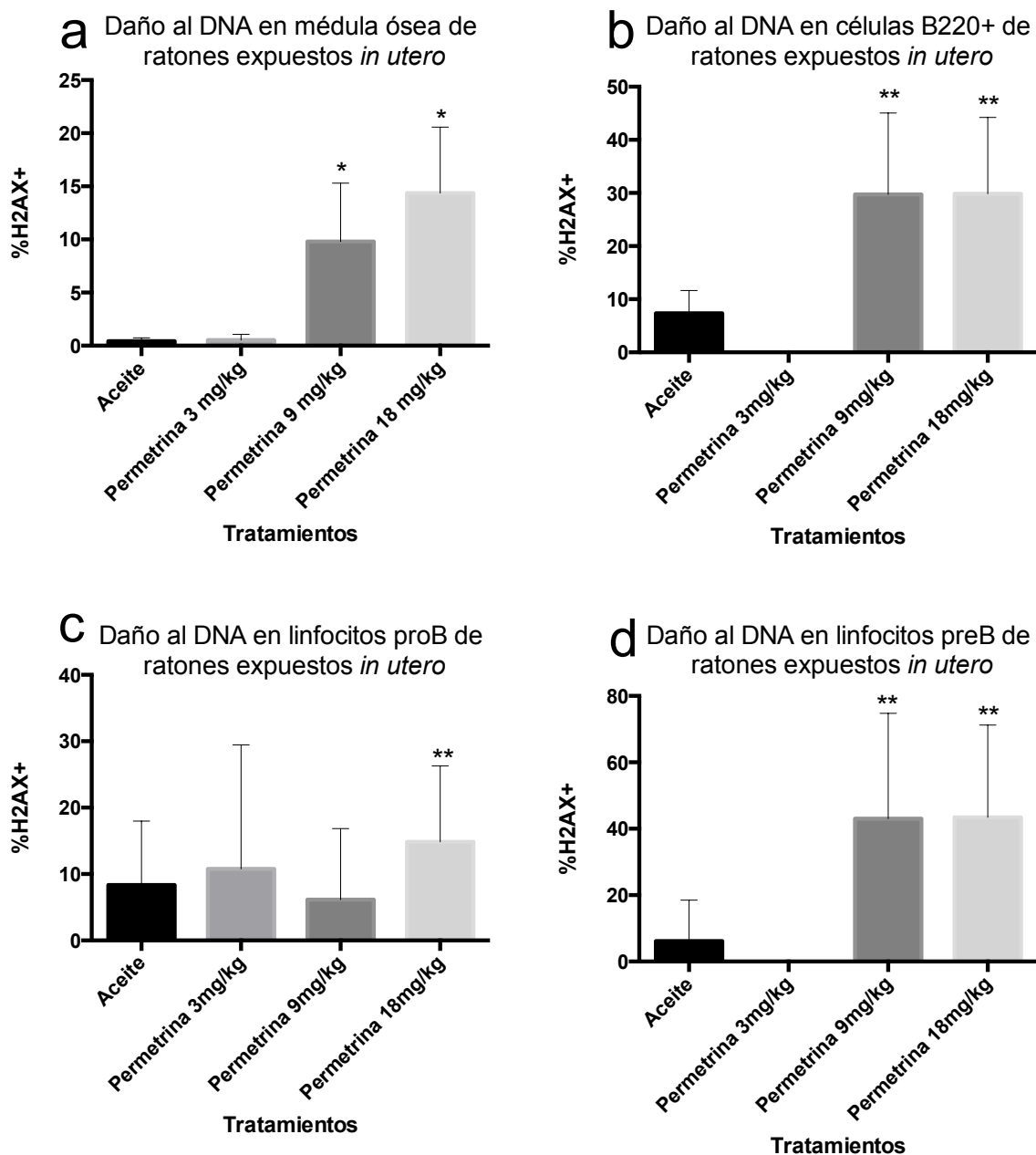


Figura 32 Análisis del daño al DNA en linfocitos de ratones neonatos expuestos a permetrina *in utero*. a) Daño en leucocitos de médula ósea. b) Daño en linfocitos B (B220+). c) Daño en linfocitos proB (B220+,CD43+,CD22-,IgM-). d) Daño en linfocitos preB (B220+,CD43-,CD22+). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ Chi Cuadrada.

7. DISCUSIÓN

El uso de piretroides como la permetrina ha incrementado significativamente en los últimos años (29); actualmente se emplea en diversas actividades agropecuarias y no agropecuarias, por lo que cualquier individuo está potencialmente expuesto a estos agentes (102). Sin embargo, a nivel epidemiológico se ha sugerido que la exposición a insecticidas piretroides está asociada con mayor riesgo de leucemia en niños, aunque la plausibilidad biológica de esta asociación no se ha determinado (102). La leucemia pediátrica se caracteriza por alteraciones genéticas específicas, que surgen *in utero* y que junto con alteraciones adicionales que afectan la expresión y metilación génica (54), pueden conducir a la transformación maligna provocando un arresto en la diferenciación linfoide. No se conoce si la permetrina es capaz de participar en la etiología de la leucemia, promoviendo alguno de los eventos biológicos antes mencionados; resulta importante evaluar si este agente induce alteraciones genéticas leucemogénicas, si afecta la expresión y metilación génica y si conduce a un arresto en la diferenciación linfoide. En este trabajo se estudió en modelos *in vitro* con células humanas e *in utero* en modelo murino si la exposición a permetrina induce eventos biológicos que son característicos del desarrollo de leucemia infantil.

7.1 Efecto de la permetrina en la generación de alteraciones genéticas *in vitro*

Se estudió el efecto de la permetrina en la generación de alteraciones en los genes *KMT2A*, *IGH* y *ETV6-RUNX1*, los cuales están implicados en la etiología de la leucemia pediátrica (43). Adicionalmente, se evaluó el efecto de la permetrina en la generación de aneuploidía, que es un evento recurrente en leucemia. Junto con la permetrina, se evaluó y comparó otro insecticida de amplio uso, el malatión, que también se ha asociado a mayor riesgo de cáncer hematopoyético y que, a diferencia de la permetrina, recientemente fue reclasificado por la IARC como probable carcinógeno (grupo 2A) (137).

Diversos estudios han evaluado si la permetrina y el malatión causan daño global al DNA y aunque en ciertos casos se han encontrado resultados contradictorios, se ha sugerido en

ensayos como cometa, micronúcleos, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, que estos agentes causan daño al DNA (89–93,96,138,139). Los estudios previos (102) que han evaluado el efecto de la permetrina y de otros piretroides, en general se han enfocado en el daño global al DNA; sin embargo, en el presente trabajo se evaluó el daño específico en genes asociados a leucemogénesis y en la generación de fusiones oncogénicas específicas. Para evaluar el efecto de la permetrina en genes asociados a leucemia se utilizó el modelo del linfocito de sangre periférica, para hacer los resultados comparables a estudios previos. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en ensayos de genotoxicidad ya que ofrece ventajas como la facilidad en la obtención de la muestra, simplicidad y bajo costo del cultivo, y es posible obtener un gran número de células en un tiempo relativamente corto. A pesar de que el uso de sangre completa en los cultivos reproduce mejor lo que sucede *in vivo*, en este estudio se eligió el uso de células mononucleares aisladas, ya que han mostrado mayor sensibilidad a sufrir daño al DNA, posiblemente porque en la sangre completa existen otros blancos de estos agentes, que podrían alterar su concentración y disponibilidad en el cultivo (96,138,139).

Existen diversas alteraciones genéticas capaces de iniciar y conducir la transformación maligna. El gen *IGH* participa en la etiología de la leucemia y linfoma. En leucemia linfoblástica aguda son comunes las fusiones que involucran a *IGH*, como *IGH-CRLF2*, *IGH-CEBP* e *IGH-ID4* (87). Adicionalmente, la fusión *IGH-BCL2* es una marca característica del linfoma folicular, que es uno de los tipos de linfoma no Hodgkin más comunes (86,140). Se ha detectado un incremento en la recurrencia de la fusión *IGH-BCL2* en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas. Por esta razón, en este trabajo se evaluó si la permetrina y el malatión inducen rearrreglos en el gen *IGH*.

Los resultados de FISH mostraron un incremento no significativo en la frecuencia total de alteraciones (estructurales y numéricas) en *IGH*, en células expuestas a permetrina y malatión (200 µM, 24 h). Sin embargo, se detectó que la exposición a 200 µM de permetrina incrementa significativamente la recurrencia de alteraciones estructurales en el gen *IGH* en PBMCs. A pesar de que por citogenética se detectaron rupturas en *IGH* por la exposición a permetrina, no se detectó la fusión *IGH-BCL2* por PCR anidado; es posible que se hayan

generado fusiones entre *IGH* y otros genes diferentes a *BCL2*. Además, se debe considerar que las rupturas génicas son únicamente el primer paso, y que se requieren eventos adicionales para generar fusiones génicas. Es indispensable que ocurra ruptura en otro gen, aproximación de ambos extremos rotos de los genes alterados, así como recombinación no homóloga para que se complete la formación de la fusión oncogénica (136,141). Con base en el resultado positivo observado mediante FISH, se incluyó un ensayo crónico utilizando la línea leucémica K562, en la que se detectó la fusión *IGH-BCL2* en células expuestas a permetrina por dos semanas. Se debe considerar la particular inestabilidad genómica de las células K562, que las hace más susceptibles a la inducción de mutaciones por la exposición a agentes químicos (142).

Las alteraciones que involucran al gen *KMT2A*, así como la fusión *ETV6-RUNX1*, participan en la etiología de la LLA B pediátrica, y se ha sugerido que se originan en la etapa prenatal. Estas alteraciones se encuentran dentro de las más frecuentemente observadas en la LLA neonatal y pediátrica (44,45,143), y adicionalmente, los rearrreglos en el gen *KMT2A* son comunes en leucemias de adulto secundarias a tratamiento con quimioterapéuticos que inhiben la enzima topoisomerasa II, como el etopósido (144). Se ha sugerido que la exposición a insecticidas puede inducir alteraciones en estos genes, sin embargo, la evidencia en la literatura es limitada (85,88), ya que se cuenta con estudios escasos y no en todos se han encontrado resultados concordantes. La falta de concordancia puede ser atribuible a que los estudios se han llevado a cabo con técnicas con distintas sensibilidades y en modelos celulares diferentes. En este trabajo se estudió si la permetrina y el malatión inducen alteraciones en los genes *KMT2A*, *ETV6* y *RUNX1*.

Los resultados del ensayo de FISH mostraron que ambos insecticidas (a una dosis 200 μ M, 24 h) incrementan significativamente la ocurrencia de alteraciones en el gen *KMT2A* en PBMCs. Se encontró que la permetrina (200 μ M, 24 h) induce daño numérico y estructural en este gen. Las frecuencias mayores de células dañadas se detectaron en el ensayo de *KMT2A*, en comparación con los otros genes analizados, lo que sugiere que puede tener mayor susceptibilidad a sufrir rupturas. Ya se ha referido que *KMT2A* puede tener una vulnerabilidad distintiva, que resulta de ciertas características estructurales del gen, como la

presencia de una región rica en AT, que es donde caen la mayoría de las rupturas (breakpoint cluster region, BCR), y que contiene secuencias repetidas *Alu*, LINE (del inglés, *long interspersed elements*) y MER, así como sitios de reconocimiento de la topoisomerasa II, que participan directa o indirectamente promoviendo rearrreglos en este sitio específico (144).

En este estudio fue posible detectar diferentes patrones de daño en el gen *KMT2A* ya que el FISH en interfase permite analizar un número amplio de células individuales y simultáneamente detecta alteraciones estructurales y numéricas. Los patrones de daño observados ya han sido previamente reportados en células expuestas a etopósido, que es un agente leucemógeno bien conocido (136,145). Fue frecuente observar células con dos señales íntegras de *KMT2A* (copias normales), junto con una porción del gen 3' o 5' (es decir, dos señales amarillas y una extra verde o naranja). Se han planteado dos diferentes mecanismos que originan esos patrones. En el primero se propone que ocurre ruptura en un sitio relativamente distante a la región BCR, lo que resulta en la escisión de una señal naranja o verde. De manera alternativa, este patrón puede generarse a partir de la ruptura en una sola cromátida hermana, la cual no es correctamente retenida por cohesinas junto a la otra cromátida (136). Dada la similitud entre los patrones observados en células expuestas a etopósido y las expuestas a insecticidas, es posible que la permetrina y el malatión tengan un mecanismo de acción similar, inhibiendo a la enzima topoisomerasa II. Sin embargo, se requerirán estudios a futuro que aborden los mecanismos por los que estos agentes inducen alteraciones en *KMT2A*.

A pesar de que el análisis por FISH reveló una alta frecuencia de rupturas en el gen *KMT2A*, por RT-PCR anidado no se detectó la fusión oncogénica *KMT2A-AFF1* en PBMCs expuestos a permetrina, lo cual sugiere que no se generaron fusiones génicas, o que bien se formaron fusiones entre *KMT2A* y otros genes diferentes a *AFF1*; de hecho se han reportado más de 80 genes distintos con los que *KMT2A* puede recombinarse (46). Además debe de considerarse que no todas las rupturas en *KMT2A* dan lugar a fusiones oncogénicas, ya que se requieren eventos adicionales (145). No es posible descartar que las rupturas en *KMT2A* en algunas células hayan sido correctamente reparadas, por lo que no se generaron fusiones

oncogénicas. Sin embargo, es importante considerar que la alta incidencia de rupturas en *KMT2A* inducidas por los insecticidas, podría aumentar la probabilidad de que se generen fusiones leucemogénicas.

El análisis por FISH reveló muy pocas células (<1%) con la fusión oncogénica *ETV6-RUNX1*, y no se encontraron resultados significativos al comparar insecticidas contra los respectivos controles. El porcentaje de células con esta alteración fue considerablemente menor en comparación con lo detectado en los análisis de los genes *IGH* y *KMT2A* (2-5%). Se esperaba una frecuencia menor de células en este ensayo, ya que la sonda de FISH utilizada detecta la fusión génica y no solamente la ruptura, como en el caso de *IGH* y *KMT2A*. Aunque por FISH sí se detectaron células positivas para la fusión *ETV6-RUNX1* en PBMCs expuestos a insecticidas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles. Sin embargo, la fusión *ETV6-RUNX1* sí se detectó por medio de RT-PCR anidado en PBMCs expuestos a permetrina y en células K562 expuestas a malatión. La diferencia entre los resultados observados con FISH y RT-PCR anidado también pueden ser atribuidos a las diferencias en la sensibilidad de ambas técnicas. De manera inesperada, en el ensayo de FISH de *ETV6-RUNX1* se detectó que la permetrina induce alteraciones en el número de copias de estos genes, y esto se confirmó posteriormente mediante un ensayo de análisis de aneuploidía.

La aneuploidía es un evento común en diversos tipos de cáncer y refleja inestabilidad cromosómica. Este trabajo reveló que la permetrina (200 μ M, 24h) induce aberraciones cromosómicas numéricas. Se analizaron los cromosomas 12, 14/22, y 18 ya que éstos sufren aneuploidía comúnmente en LLA (146), y adicionalmente porque en los ensayos previos se detectaron alteraciones numéricas en *ETV6*, localizado en el cromosoma 12. Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo sugerido en reportes previos, en los que se observó que la exposición a permetrina incrementa la formación de micronúcleos en células murinas. Sin embargo, en el reporte previo no se confirmó si los micronúcleos se originaban a partir de rupturas cromosómicas o de aneuploidía (103). En este estudio se confirmó que la permetrina tanto en altas concentraciones como en un esquema de exposición aguda, induce aneuploidía y rupturas cromosómicas. Para determinar si el efecto de la permetrina ocurre

también en bajas concentraciones, se incluyeron ensayos con PBMCs en los que se modeló una exposición crónica (0.1 μ M, 72 h).

La mayoría de los estudios que evalúan la genotoxicidad de los plaguicidas han incluido concentraciones altas de los mismos (25-1800 μ M) (89–92,95,96). Sin embargo, es importante analizar concentraciones más cercanas a lo observado en humanos tras exposiciones ambientales u ocupacionales. Por lo cual, en esta parte del trabajo se propuso estudiar el efecto de la exposición continua a concentraciones bajas de permetrina y malatión (0.1 μ M, 72h) en la generación de alteraciones en los genes *IGH* y *KMT2A*. Se observó una ligera disminución en la viabilidad por la exposición a insecticidas, sin embargo, el índice mitótico no se afectó significativamente, reflejando que la proliferación se mantuvo. Adicionalmente, en todas las condiciones se encontraron células en división, por lo que el efecto sobre los genes *IGH* y *KMT2A* también se evaluó en metafases. Con base en los resultados de viabilidad e índice mitótico, se determinó que el efecto citotóxico de los agentes a la concentración estudiada no fue significativo.

El análisis por FISH reveló que la exposición a bajas concentraciones de permetrina y malatión incrementa la frecuencia de alteraciones numéricas y estructurales en ambos genes. Particularmente fueron frecuentes las alteraciones numéricas en *KMT2A* inducidas por la permetrina, y las alteraciones estructurales en *IGH* inducidas por ambos insecticidas. El análisis de *KMT2A* mostró una proporción considerable de células en interfase y metafase con el patrón de daño alternativo, que consiste en dos copias del gen normales más una porción verde o naranja extra, lo cual también se observó en el ensayo con concentraciones altas de insecticidas. Otros patrones observados fueron una señal normal y una naranja, así como una señal normal y una verde, los cuales pueden generarse a partir de deleciones intersticiales o terminales. También se detectaron otros patrones de daño más complejos que sugirieron que más de un evento numérico o estructural ocurrió, la mayoría de estos patrones ya han sido previamente reportados en células expuestas a etopósido, lo cual es relevante porque se conoce que el etopósido es un agente leucemógeno y que induce daño en *KMT2A*. (144,145).

El análisis de daño al gen *IGH* por la exposición a bajas concentraciones de insecticidas, mostró una alta frecuencia de células con alteración en este gen, que fue mayor a lo observado en el análisis de *KMT2A*. No se puede descartar la posibilidad de que *IGH* sea más susceptible a rupturas que *KMT2A* a bajas concentraciones de insecticidas, ya que presentó mayor recurrencia de daño; se requieren estudios adicionales para comprobar esto. El efecto aneuploidógeno de la permetrina se volvió a observar, confirmando lo detectado previamente y demostrando que este efecto se conserva aún cuando se emplean concentraciones muy bajas de este agente. El patrón de daño clásico de *IGH* (una señal normal, una roja y una verde) fue la alteración más observada en células en interfase; sin embargo, se observaron otras alteraciones en células en metafase.

No se había estudiado el efecto de la permetrina y el malatión previamente en los genes *IGH* y *KMT2A* en células en metafase, por lo que estos resultados son relevantes. En el análisis de metafases no se detectó el patrón de daño clásico del gen *KMT2A*, sin embargo, se observaron otros patrones que sugirieron alteraciones como delección e inversión. El análisis de *IGH* en metafases mostró una frecuencia mayor de alteraciones en comparación con lo observado con *KMT2A*; la variedad y la complejidad de daño en *IGH* también fueron mayores. Uno de los patrones más recurrentes fue la pérdida de una señal verde en la región telomérica, que sugiere delección terminal. Se ha reportado que delecciones de la región variable (que corresponde al sitio en el que hibrida la sonda verde) pueden ser la fuente de pérdida de DNA que acompaña a la recombinación VDJ y que podría participar en el proceso oncogénico; estos eventos serían observados en células B. (147) En concordancia con lo observado en el análisis en interfase, los resultados demuestran que el patrón de ruptura “clásico” no es el único que debe ser evaluado, ya que existen células con otros tipos de daño que son capaces de sobrevivir y dividirse. Estas células son capaces de proliferar a pesar de portar daño génico, y podrían formar fusiones oncogénicas, como se observó con la línea K562 en este trabajo, y como se ha observado en agricultores expuestos a plaguicidas, quienes presentan alta recurrencia de la fusión *IGH-BCL2* (86).

Los resultados obtenidos muestran que la exposición a concentraciones consideradas biológicamente relevantes de permetrina y malatión, es capaz de inducir daño en los genes

KMT2A e *IGH*. De acuerdo a Guyton y Hall ((148)) la concentración más baja utilizada en este trabajo (0.1 μM) es equivalente a 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es inferior al límite de ingesta diario recomendado por la OMS (0.05 mg/Kg/día=0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a la dosis de referencia establecido por la US EPA (0.25 mg/Kg/día=0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$); adicionalmente se estima que la exposición ocupacional a piretroides es mayor a los límites recomendados. Por otro lado, los genes *KMT2A* e *IGH* son importantes en el desarrollo de leucemia, y las lesiones inducidas por los insecticidas podrían representar los primeros pasos en el desarrollo de esta enfermedad (43,86). En los escasos estudios previos existentes, hay controversia si los insecticidas son capaces de inducir daño en estos y otros genes, por lo que los hallazgos de este trabajo son relevantes (85,88,101,141). Sin embargo, es importante estudiar otros tipos celulares que modelen más de cerca la etiología de la leucemia, como las células troncales y progenitores hematopoyéticos. De igual forma es necesario estudiar a profundidad el mecanismo por el que estos insecticidas inducen daño en los genes *IGH* y *KMT2A*, y conocer si existen sitios del genoma más susceptibles a daño. Estos resultados sugieren que los sitios evaluados (*IGH*, *KMT2A*) podrían ser más vulnerables a daño que el resto del genoma, ya que en la literatura se ha encontrado daño genotóxico global a concentraciones mayores que 0.1 μM (89–92,96,98,100,138,139,149,150).

7.2 Efecto de la exposición a insecticidas en la expresión y metilación génicas.

En este trabajo se mostró que la permetrina es capaz de inducir daño en genes asociados a la etiología de la leucemia, tanto a concentraciones altas como bajas. Sin embargo, además del potencial genotóxico de los insecticidas, ha surgido preocupación por los efectos epigenéticos que puedan producir. Los efectos de estos agentes implican múltiples procesos biológicos, por lo que pueden afectar a diferentes niveles (102,151). En estudios *in vitro* e *in vivo* (murinos) se ha sugerido que los plaguicidas tienen efecto en la expresión y en la metilación génicas, aunque la evidencia es limitada (113,152–155). Es de gran importancia evaluar si insecticidas como la permetrina, son capaces de modificar la expresión génica y si estas modificaciones suceden por cambios en la metilación de regiones promotoras, dado que estos eventos son pasos esenciales en el desarrollo de la leucemia (54). Se ha demostrado que otros agentes ambientales tienen capacidad de alterar la metilación génica,

lo cual impacta en la expresión génica. De hecho, en poblaciones expuestas se han evaluado estos efectos en PBMCs, y se han detectado perfiles de expresión característicos de ciertos agentes ambientales, estos perfiles son considerados como “huellas”, los cuales ponen en evidencia la exposición a agentes específicos. (156,157).

Se ha reportado que diferentes clases de insecticidas modifican la metilación y la expresión de genes que codifican citocinas y quimiocinas, factores de transcripción, y transductores de señales entre otros (151,152,154,158). Aunque son muy limitados los estudios que han evaluado específicamente el efecto de agentes piretroides, se ha reportado que son capaces de alterar la expresión de genes como *WNT10B*, *THBS1*, *SPP1*, *FEZ1* y *GPNMB* (118,153,154,159). Dada la escasa información que existe sobre el efecto de la permetrina en la expresión génica, en este trabajo se evaluó si la exposición *in vitro* a permetrina altera la expresión génica en PBMCs y en BMMCs. De igual manera que en los ensayos de genotoxicidad se incluyó al insecticida malatión, ya que previamente se ha sugerido que también los agentes organofosforados causan alteración en la expresión y en la metilación génica (155).

Los resultados obtenidos mostraron que ambos insecticidas modifican la expresión global en PBMCs y en BMMCs expuestos *in vitro*. Se encontraron diferentes resultados entre estos tipos de muestras, se detectaron modificaciones mayores en las BMMCs. Esto sugiere que las diversas poblaciones celulares presentes en las BMMCs, que son en general células más inmaduras y no diferenciadas, tienen mayor susceptibilidad a sufrir modificaciones en la expresión génica por efecto de los plaguicidas. En poblaciones expuestas a plaguicidas se han monitoreado principalmente PBMCs, debido a la facilidad de la obtención, ya que la toma de muestra no es tan invasiva como la de las BMMCs (154). Sin embargo, este trabajo muestra que las modificaciones en las BMMCs pueden ser mucho mayores y los estudios podrían estar subestimando los efectos a nivel transcripcional de los plaguicidas. Cabe mencionar que se detectaron modificaciones mayores en la expresión génica por la exposición a malatión, en el que principalmente se observó que induce sobreexpresión en diversos genes en las BMMCs. Se detectaron modificaciones menores con la exposición a permetrina, y se encontraron números cercanos de genes alterados en PBMCs y BMMCs. Se

observó que la permetrina modifica la expresión génica a la alta y a la baja casi en la misma proporción, aunque fue ligeramente más frecuente la expresión baja. Adicionalmente, se detectaron coincidencias entre ambos insecticidas, lo cual sugiere que comparten ciertos mecanismos, que llevan a la desregulación de los mismos genes (Figura 23). Además se detectó que hay ciertos genes que se desregulan únicamente en PMBCs o en BMMCs por efecto del mismo insecticida, pero hay otros que se comparten entre ambos tipos celulares (Figura 23). Derivado del análisis ontológico, también se comparten funciones moleculares que son afectadas por ambos insecticidas, lo cual apoya que existen ciertos efectos compartidos entre malatión y permetrina, como la desregulación de genes que codifican quimiocinas, citocinas, canales iónicos y proteínas de unión a ácidos nucleicos.

7.2.1 Represión de genes en BMMCs por efecto de malatión

Entre los genes con expresión reprimida por efecto del malatión en BMMCs se encontró el gen *KCNMA1* y otros de la familia de canales de potasio activados por calcio, los cuales participan en el control del tono muscular y en la excitabilidad neuronal. Las alteraciones en el gen *KCNMA1* han sido detectadas en individuos con hipocalcemia y parálisis (160). Este resultado es relevante, ya que en individuos expuestos de manera aguda a agentes organofosforados se han reportado niveles bajos de potasio, y de hecho se ha propuesto que pueda ser un marcador bioquímico predictivo de envenenamiento por este tipo de compuestos (161). Adicionalmente, se ha reportado previamente que el insecticida endosulfán (oganoclorado) también reprime la expresión de *KCNMA1*(162). Se observó alta representación de vías que participan en el funcionamiento neuronal, lo cual era esperado ya que es un efecto conocido de estos agentes (163). Además del efecto en genes asociados a neurotoxicidad, se detectó represión de genes que podrían tener un papel importante en el desarrollo de cáncer. Se encontró expresión baja de genes de la familia desintegrina y metaloproteinasas, *ADAM11* y *ADAM32*, que participan en diversos procesos biológicos que involucran interacciones celulares. Se ha sugerido que *ADAM11* es un gen supresor de tumores que sufre represión en células cancerosas, y se ha asociado a invasión y metástasis (164).

Adicionalmente, se encontró en BMMCs tratadas con malatión expresión disminuida del gen *FGF22*, perteneciente a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. Esta familia participa en diversos procesos que incluyen desarrollo embrionario, crecimiento celular, reparación de tejidos, crecimiento tumoral e invasión. Previamente se ha reportado que el tratamiento con organofosforados reprime la expresión de *FGF22* y de otros genes de esta familia, aunque los efectos han sido principalmente asociados a neurotoxicidad, ya que este gen participa en neurogénesis (165,166); queda por investigar su participación en BMMCs. Otra de las familias génicas con represión en las BMMCs por efecto del malatión fue la de las protocadherinas, que son un grupo de proteínas de adhesión célula-célula perteneciente a la familia de las cadherinas, y que se expresan principalmente en sistema nervioso, aunque también se han descrito en otros tipos celulares y órganos. Se ha propuesto que participen en proliferación y muerte, y se ha reportado que sufren desregulación en cáncer (167). Se ha referido en modelo murino que los organofosforados pueden conducir a la desregulación en la expresión de protocadherinas (168). En este trabajo se encontró represión de los genes *PCDH15* y *PCDHB12*, este resultado es interesante ya que en la LLAB, y en otros tipos de cáncer, se ha reportado hipermetilación de diferentes miembros de la familia de las protocadherinas (169). Se ha sugerido que las protocadherinas pueden actuar como supresores de tumor a través de la vía WNT, la cual es una vía comúnmente alterada en la LLA (54). Adicionalmente, en BMMCs expuestas a malatión se detectó represión de la expresión del gen *EDNRB*, que codifica para el receptor de endotelina. En ratas expuestas al organofosforado clorpirififós se ha detectado inhibición en la expresión de este gen en células cerebrales (168), y se refiere que también es frecuente la hipermetilación de este gen en diferentes tipos de leucemia (170).

7.2.2 Sobreexpresión de genes en BMMCs por efecto del malatión

El análisis ontológico mostró que entre los genes con alta expresión en las BMMCs expuestas a malatión, existió sobre representación de genes que codifican proteínas de tipo citocinas y quimiocinas, y proteínas asociadas a procesos como la inflamación, respuesta a estrés oxidante, y a sustancias tóxicas, y vías como *MAPK*, *WNT*, *TNF* y *NOTCH*. Uno de los hallazgos más relevantes es la inducción de la expresión de genes involucrados en

respuesta inflamatoria, tales como *IL6*, *IL1B*, *CXCL8*, *CCL3*, *CCL7*, *CCL3L3* y *CCL20*. Este resultado fue exclusivo del tratamiento con malatión en BMMCs, ya que con el mismo agente en PBMCs se encontró un menor número de genes asociados a inflamación, lo cual refleja el contraste que existe entre las poblaciones celulares presentes en médula ósea y sangre periférica, que presentan diferente respuesta ante la exposición a malatión. En estudios previos se ha reportado que la exposición a organofosforados modifica los niveles de citocinas y quimiocinas (171), lo que concuerda con los hallazgos del presente trabajo. Esta investigación se suma a reportes previos que evidencian que la exposición a niveles bajos de organofosforados induce respuesta inflamatoria (172). El mecanismo por el cual se desencadena esta respuesta no ha sido claramente definido, pero se sugiere que estos agentes interactúan directamente con células inflamatorias y disparan la liberación de mediadores de inflamación (172). Se ha observado que la exposición a malatión estimula macrófagos para generar ROS y catepsina D, puede potenciar la fagocitosis y la presentación de antígeno de macrófagos, e induce la liberación de histamina por las células cebadas y basófilos (172). Dentro de los genes sobreexpresados que codifican citocinas pro-inflamatorias se encuentra el que codifica *IL6* (*Interleucina 6*), la cual es liberada por monocitos y macrófagos en respuesta a señales como TNF, IL1 y TLR, y también puede ser liberada por linfocitos T durante inflamación crónica, así como por HSCs en respuesta a estresores (173). Se sabe que la IL6 tiene un papel importante en células troncales hematopoyéticas preleucémicas, y es también un componente importante del microambiente tumoral. Se ha observado en pacientes con condiciones preleucémicas y leucémicas, aumento de niveles de IL6, y se ha sugerido que esta citocina promueve la progresión de la enfermedad (173). Asociado al incremento de esta citocina se encontró aumento en *TNF* y en *IL1A*, las cuales son señales que promueven la producción de IL6, por lo que se sugiere que sea través de esta vía que se incrementa la expresión por efecto del malatión, el cual parece inducir un ambiente pro inflamatorio en BMMCs. El hallazgo de aumento en la expresión de *TNF* por efecto del malatión es relevante, ya que esta citocina participa en todos los pasos de la leucemogénesis, incluyendo la transformación, proliferación e infiltración extramedular; además, el TNF es un factor importante en el microambiente tumoral, ya que permite que las células leucémicas evadan la respuesta inmune, sobrevivan y resistan al tratamiento (174), de hecho, se ha observado su expresión incrementada en

LLA-B (54); por lo que resulta de interés investigar más a fondo en otros modelos el papel de la exposición a malatión sobre la desregulación en TNF.

Adicional al incremento en la expresión de genes que participan en la respuesta inflamatoria, se encontraron sobreexpresados los genes involucrados en respuesta a sustancias tóxicas, como *MT1E*, *MT1M*, *MT1B* y *MT1L*, que pertenecen a la familia de las metalotioneínas y que participan en la protección contra toxicidad por metales pesados, daño al DNA y estrés oxidante. Las metalotioneínas juegan un papel importante en la formación y progresión tumoral, y sufren sobreexpresión en diversos tipos de cáncer (175). Por último, dentro de las vías con mayor representación con genes sobreexpresados por efecto del malatión se encuentran *MAPK*, *ERK1/ERK2*, *NFKB*, *NOTCH*, *WNT*, *JNK*; estas vías están implicadas en distintas funciones celulares como proliferación, supervivencia, diferenciación, maduración, angiogénesis, respuesta inflamatoria, migración, y participan de manera importante en la hematopoyesis; se ha descrito su participación tanto en leucemia como en otros tipos de cáncer (176–180).

7.2.3 Desregulación de la expresión de genes en PBMCs por efecto del malatión

En las PBMCs expuestas a malatión se encontró que los genes con baja expresión pertenecen a proteínas de unión a ácidos nucleicos, como el factor de transcripción *ZFP42*. El gen *ZFP42* (*REX1*), es un marcador conocido de células troncales embrionarias, sin embargo, también se ha reportado que regula la proliferación en células mesenquimales humanas a través de la señalización por MAPK. Se ha observado que la supresión de *REX1* conduce a la sobreexpresión de proteínas de la vía MAPK como MKK3 y MKK6 (181). En BMMCs se notó sobreexpresión de otros genes de la vía de las MAPK, y en PBMCs se incrementó la expresión del gen *MAP4K3*; sin embargo, queda por investigar si la desregulación observada en la vía MAPK ocurre a través de la inhibición de la expresión de *REX1*, que se reprime por efecto del malatión. Adicionalmente, se ha observado en células leucémicas represión de *REX1* (54). En PBMCs expuestas a malatión también se encontró disminuida la expresión del gen *MEIS1*, que es un factor de transcripción que tiene un papel muy importante en la hematopoyesis normal y en leucemogénesis. Se ha reportado que

MEIS1 regula la respuesta a estrés oxidante y el metabolismo de las HSCs. La represión de *MEIS1* en LT-HSCs (*del inglés, Long Term Hematopoietic Stem Cells*) conduce a las células a un consumo mayor de oxígeno y menor flujo glicolítico, lo cual genera mayores niveles de ROS a través de un mecanismo dependiente de HIF-1 α y HIF-2 α (182). Este resultado es relevante ya que el malatión y otros organofosforados inducen ROS, y este fenómeno podría verse favorecido y potenciado a través de la inhibición en la expresión del gen *MEIS1* (183). Al igual que se observó en BMMCs, la expresión del gen *EDNRB* se encontró disminuida en PBMCs expuestas a malatión, lo que muestra que en ambos tejidos este gen sufre represión por efecto de la exposición al insecticida. Este gen se ha observado hipermetilado en diferentes tipos de leucemia, por lo que su represión podría representar un hallazgo de importancia (170).

En PBMCs expuestos a malatión se encontró que los genes con sobreexpresión están implicados en señalización por el receptor glutamato, señalización sináptica, señalización célula-célula y la vía con mayor representación fue la de las cadherinas. Se encontró sobreexpresión del gen *GRIK2*, que codifica para un receptor de glutamato de tipo KA (ácido kaínico), expresado principalmente en sistema nervioso central. Sin embargo, se ha visto que también puede ser expresado por células B, en las cuales potencia la activación y se ha observado también que niveles elevados de glutamato pueden promover la proliferación de células de linfoma histiocítico; en otros tipos de cáncer se ha visto que hay participación de la señalización a través de los receptores de glutamato. Sin embargo, en LLA se ha detectado hipermetilación de *GRIK2*, y se le ha considerado un gen supresor de tumor (184,185).

Del mismo modo que en BMMCs, en las PBMCs expuestas a malatión se encontró sobreexpresión de genes involucrados en la vía WNT, como *WNT1* y *WNT11*. Esta vía tiene un papel importante en leucemias y linfomas (186), en LLA se ha detectado desregulación de genes de la vía WNT. Se ha reportado que *WNT11* promueve la migración de células cancerosas, y su expresión se ve influenciada por el ERR α y la β catenina (187). Adicionalmente, se encontró desregulación de genes implicados en la vía de las cadherinas, genes asociados a regulación de la apoptosis, a regulación epigenética y a inflamación; todos estos procesos tienen un papel importante en la carcinogénesis (54).

7.2.4 Represión de la expresión de genes en BMMCs por efecto de la exposición a permetrina

En las BMMCs expuestas a permetrina se encontró representación significativa de genes con baja expresión con función de quimiocinas y citocinas. Se ha sugerido previamente que la exposición a insecticidas puede tener un efecto inmunotóxico, modificando la actividad de ciertos tipos celulares y alterando la secreción de citocinas (151). Este trabajo coincide con referencias previas ya que se mostró modificación en la expresión de diversos genes que codifican citocinas y quimiocinas, cabe mencionar que en ciertos tipos de cáncer estas moléculas muestran expresión reprimida. Se presentó reprimida la expresión de la quimiocina CXCL8 por efecto de la permetrina, este hallazgo es importante ya que se ha descrito que tiene un papel antitumoral (188). Sin embargo, esto contrasta con la baja expresión de otras citocinas y quimiocinas como CXCL12, cuyo papel se ha descrito con efecto tumoral. Entre las citocinas con baja expresión se encontró al gen *OSM*, el cual se ha visto que inhibe la proliferación de células mieloides leucémicas y modula la diferenciación de varios tipos celulares (189).

Adicionalmente, se detectó que la permetrina reprime la expresión del gen *TGFB2* en BMMCs, el cual pertenece a la familia de proteínas TGF- β (del inglés Transforming Growth Factor-Beta), que tiene un papel esencial en la regulación de la hematopoyesis, ya que regula negativamente la proliferación y estimula la diferenciación y la apoptosis cuando se requiere. En diferentes cánceres hematopoyéticos se ha descrito desregulación de la vía TGF- β , y se ha definido que tiene función de supresor de tumor (190). Se ha referido que los insecticidas neurotóxicos son capaces de alterar la expresión de genes de la vía TGF- β , sin embargo, esto no se ha descrito previamente para piretroides (191).

De igual forma se detectó baja expresión del gen *GPX8* por efecto de la permetrina en BMMCs; este gen codifica una proteína glutatión peroxidasa (GPx). Las GPx participan en la regulación de estrés oxidante, tienen una función antioxidante a través de la remoción del exceso de radicales. Es posible que la baja expresión de *GPX8* favorezca la toxicidad de la

permetrina a través de la acumulación de ROS y peroxidación de lípidos. Se ha reportado previamente que insecticidas como el clorpirifós inducen baja expresión del gen *GPX8* (192). Otro gen que se encontró reprimido en BMMCs por efecto de la permetrina fue *GATA4*, el cual pertenece a la familia de factores de transcripción con motivos dedos de zinc, y tiene función importante en el sistema cardiaco, respiratorio, gastrointestinal, y también en cáncer. Se ha reconocido a *GATA4* como un gen supresor de tumor en distintos tipos de cáncer; particularmente en leucemia pediátrica se ha detectado hipermetilación del promotor, aunque su función en la etiología de la enfermedad no se ha definido aún (193).

Se notó también alta representación de genes reprimidos que codifican canales iónicos, como *SCN2A*, *SCNN1*, *SCN9A*, *SCN3B*, los cuales codifican para canales de sodio dependientes de voltaje. Estos resultados son relevantes ya que, aunque se sabe que los piretroides actúan a nivel de canales iónicos de sodio y potasio para ejercer su acción neurotóxica, los resultados del presente trabajo muestran que además los piretroides pueden afectarlos a nivel de su expresión génica (194). Finalmente, se encontró represión en la expresión de genes que codifican protocadherinas, como *PCDH15* y *PCDH9*, la desregulación de este tipo de genes también es una característica de las células leucémicas (54).

7.2.5 Sobreexpresión de genes en BMMCs por efecto de la exposición a permetrina

Dentro de los genes con sobre-expresión se encontraron principalmente los de la vía del receptor ionotrópico glutamato. Esto concuerda con lo informado previamente y confirma que ciertos insecticidas neuroactivos, incluyendo piretroides, actúan sobre canales iónicos, incluyendo al receptor ionotrópico glutamato (195). También se observó sobreexpresión del gen de unión a ácidos nucleicos *MBD2*, el cual participa en la supresión de la expresión génica. Sin embargo, también se ha descrito que *MBD2* puede conducir a la activación de la expresión génica reclutando proteínas HAT (Histone acetyl transferases) y otros factores transcripcionales como *TACC3*, y se ha propuesto también que pueda promover desmetilación del DNA (196). La represión en la expresión del gen *MBD2* en BMMCs, podría

explicar en parte la alta frecuencia de desmetilación de promotores observada en los BMMCs expuestos a permetrina, lo cual concordó con el aumento en la expresión en este tejido.

Otro hallazgo relevante fue la sobreexpresión del gen *IFIT1* por efecto de la permetrina en BMMCs; este gen pertenece a la familia del Interferón Tipo 1, que participa en funciones biológicas como mecanismos de defensa, apoptosis e inflamación. Se ha reportado que la activación de *IFIT1* puede ser a través de la señalización por la vía JAK/STAT, y se ha sugerido que la alta expresión de este gen puede ser un biomarcador de apoyo al diagnóstico de síndromes mielodisplásicos, previo al desarrollo de leucemia, ya que es una característica que precede a la transformación hacia la leucemia mieloide aguda (197). Adicionalmente, la activación de la vía JAK/STAT es de gran relevancia en el contexto de la LLA pre-B (198).

7.2.6 Represión de la expresión de genes en PBMCs por efecto de la exposición a permetrina

En las PBMCs se encontraron genes con baja expresión que codifican cadherinas y canales de sodio y genes asociados a señalización de Alzheimer-presenilina. La desregulación de cadherinas es un resultado relevante ya que se han implicado en diversos tipos de cáncer (199). Algunos de los genes que codifican cadherinas participan en la vía WNT, la cual también juega un papel importante en la hematopoyesis y leucemogénesis (179). Previamente se ha sugerido que los piretroides pueden alterar genes de la vía WNT, sin embargo, en este trabajo se detectaron miembros de esta vía (*WNT2*, *WNT4*, *WNT7A*) distintos al reportado (*WNT10*) (112). De manera interesante, se detectó que la exposición a malatión también afecta genes de esta vía, por lo que es un mecanismo compartido entre ambos insecticidas. Se ha descrito que el gen *WNT7A* participa en la carcinogénesis y progresión de diversos tipos de cáncer, aunque su función ha sido controvertida, ya que se ha observado que sufre represión en algunos casos (200). Por otro lado, en LLA-B subtipo *ETV6-RUNX1*, se ha descrito hipermetilación de *WNT2*.

Del grupo de genes reprimidos fueron frecuentes los genes involucrados en la señalización por cadherinas, como *CDH19*, *TCF7L2*, y las protocadherinas *PCDH9*, *PCDH15*, *PCDH12*, *PCDH114*, *PCDHGA5*. Esta familia de genes también se alteró por efecto del malatión, lo que se relaciona con el hecho de que ambos insecticidas comparten mecanismos de acción. Las protocadherinas son proteínas de adhesión célula-célula expresadas principalmente en sistema nervioso central; sin embargo, también se ha reportado participación en envejecimiento y cáncer. Aunque el papel de las protocadherinas es variable, en algunos casos se les ha clasificado como supresores de tumor y se ha detectado hipermetilación de su promotor (167). En LLA subtipo *BCR-ABL1* se ha observado hipermetilación de *PCDH12* (169).

En las PBMCs expuestas a permetrina también se detectaron genes reprimidos que participan en el desarrollo de Alzheimer, como *MMP12*, *MMP2*, *MMP13*, entre otros. La participación de las metaloproteinasas en el desarrollo de Alzheimer se ha descrito previamente (201); por otro lado, también se ha sugerido que los piretroides pueden estar asociados al desarrollo de esta enfermedad (202). La capacidad de la permetrina de reprimir genes que codifican metaloproteinasas podría estar implicada en el mecanismo por el cual la permetrina induce Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. Adicionalmente, se encontraron genes desregulados que codifican canales catiónicos, los cuales también han sido asociados al mecanismo neurotóxico de la permetrina. Este trabajo aporta evidencia relevante que muestra que la permetrina y el malatión tienen un potente efecto sobre genes involucrados en el sistema nervioso central, lo cual fue evidente incluso en células de origen hematopoyético, por lo que es posible que la topología de las regiones en las cuales se ubican los genes afectados, las hagan particularmente sensibles al efecto de los insecticidas. También es factible que se desregulen genes de factores de transcripción asociados a procesos neurológicos, de hecho con ambos insecticidas se encontró sobre representación de genes que codifican proteínas de unión a ácidos nucleicos, entre los que se encuentran factores de transcripción. Adicionalmente, se encontraron coincidencias entre los genes desregulados por malatión y permetrina, por lo que a pesar de ambos insecticidas tienen estructuras distintas pueden compartir mecanismos de acción, lo cual ya se ha reportado previamente (203). Por otro lado, aunque se ha reportado la participación de estos genes

principalmente en sistema nervioso central, los resultados obtenidos y los descritos en la literatura muestran que también pueden participar en otros procesos, incluyendo cáncer (204).

Finalmente, se detectó represión en el gen *PRUNE2* por efecto de la permetrina en PBMCs, el cual participa en muerte celular. Este gen ha sido identificado en otros tipos de cáncer como supresor de tumor, se ha determinado que su inactivación conlleva al incremento en la proliferación de células tumorales (205).

7.2.7 Sobreexpresión de genes en PBMCs por efecto de la exposición a permetrina

Mediante el análisis de sobre representación, se detectó que los genes en los que se incrementó la expresión por efecto de la permetrina en PBMCs se asociaron significativamente a la vía de la síntesis de vasopresina, a funciones de receptores transmembranales, a canales iónicos y a genes con funciones nucleares. Respecto a la síntesis de vasopresina se encontró sobreexpresión del gen *NEU2*, que codifica para una proteína sialidasa. La expresión de *NEU2* es casi indetectable en la mayoría de los tejidos, se ha visto participación de este gen en cáncer de próstata, en el que se encuentra reprimido. Sin embargo, se ha estudiado que la sobreexpresión de *NEU2* impide el crecimiento celular, bloqueando distintos puntos de control del ciclo celular, afectando todas las fases. *NEU2* también puede inhibir la vía PI3K, y activar apoptosis a través de Fas.

Se encontró representación significativa de genes con función de receptores transmembranales, entre los que se encuentran *ROS1*, *KIT* y *ALK*, los cuales mostraron sobreexpresión en PBMCs por exposición a permetrina. Estos genes pertenecen a la familia de receptores tirosina cinasa y se han identificado como oncogenes en diversos tipos de cáncer. El gen *ROS1* sufre activación anormal en las células CD34+ en la mayoría de los casos diagnosticados con leucemia mielomonocítica crónica, esto conlleva a la activación de la vía Erk/Akt a través de los complejos Grb2/SOS (206). El gen *KIT* se expresa normalmente en células troncales progenitoras y hematopoyéticas presentes en médula ósea, y casi no se expresa en células hematopoyéticas diferenciadas de sangre periférica; sin embargo, la

sobreexpresión de *KIT* se ha observado en diversos tumores. En células leucémicas la expresión de *KIT* promueve el fenotipo maligno. El gen *KIT* juega un papel importante en diversas vías de señalización, entre las que se encuentran PI3K, Ras-Erk y JAK/SAT, que llevan a la célula cancerosa a activación de la proliferación, supervivencia, progresión del crecimiento y migración (207). Por otra parte, el gen *ALK* también se ha encontrado sobreexpresado en diversas neoplasias, incluyendo las hematopoyéticas. La señalización por *ALK* lleva a la activación de las vías PI3K/AKT, MAPK/ERK y STAT3, promoviendo el crecimiento celular, supervivencia y metástasis de la célula cancerosa (208).

7.2.8 Alteración en la metilación génica en BMMCs por efecto de la exposición a insecticidas

Se encontró que tanto el malatión como la permetrina inducen cambios en la expresión génica. Ya se ha referido que los organofosforados son capaces de inducir cambios en la metilación del DNA (155). En concordancia, se encontró que el malatión es capaz de inducir dichos cambios, los cuales empataron con modificaciones en la expresión génica. Estos hallazgos son relevantes ya que esto no se había estudiado previamente en BMMCs. Los resultados apoyan lo observado respecto a los cambios en la metilación del DNA por exposición a mezclas de plaguicidas organofosforados, reportados en agricultores expuestos (209). Se observó que la permetrina no induce hipermetilación del DNA, y por el contrario, fueron muy frecuentes los eventos de desmetilación, lo cual se asoció con la presencia de sobreexpresión de los genes analizados. Sin embargo, también se encontraron genes reprimidos, en los que no se encontró hipermetilación de la región promotora, lo que sugiere que la permetrina puede llevar al silenciamiento de genes a través de mecanismos alternos a la metilación. Aunque el efecto de los piretroides en la metilación del DNA no se ha estudiado extensamente en seres humanos, en modelos murinos se ha reportado que la permetrina puede inducir disminución de la metilación del DNA, en coincidencia con los hallazgos de este trabajo (153,159). Se ha propuesto que la permetrina puede inducir desmetilación del DNA a través de mecanismos dependientes de ROS. En estudios previos no se ha determinado que los cambios en la metilación del DNA inducidos por permetrina coincidan con cambios en la expresión de DNMTs (DNA metil transferasas); en este estudio tampoco

se detectó mayor expresión de DNMTs, por lo que el mecanismo implicado queda por establecerse. Una alternativa para explicar en parte la desmetilación, es a través de un hallazgo observado en este estudio, ya que se detectó que la permetrina es capaz de inducir la expresión del gen *MBD2*, el cual está asociado a desmetilación activa del DNA (196). Se ha reportado que *MBD2* puede escindir directamente el grupo metilo mediante hidrólisis, lo que resulta en el reemplazo del grupo metilo por un átomo de hidrógeno y la liberación de metanol (210). Adicionalmente, se encontró en PBMCs expuestos a permetrina la sobreexpresión del gen *ROS1*, el cual codifica una DNA glicosilasa, que participa en la desmetilación del DNA a través de la vía de reparación por escisión de bases (210); este es otro posible mecanismo por el que la permetrina puede incrementar la desmetilación del DNA. Otro mecanismo implicado en la desmetilación del DNA por efecto de la permetrina es a través de la activación del gen *RELN*, cuya activación ha sido asociada a desmetilación en células neuronales de rata (210). En este trabajo se detectó sobreexpresión del gen *RELN* en PBMCs expuestos a permetrina, lo cual podría contribuir a los eventos de desmetilación del DNA.

7.3 Efecto *in vivo* de la permetrina en el daño al DNA y en la diferenciación de linfocitos B

En los ensayos *in vitro* se detectó que la permetrina es capaz de inducir daño asociado a leucemia, como aneuploidía y cambios en la expresión y en la metilación génicas. Para conocer los efectos *in vivo*, se estudió en ratones BALBc si la exposición *in utero* a permetrina conduce a daño en el DNA y a defectos en la diferenciación de linfocitos B. No se encontraron cambios significativos en el peso de los ratones, ni en el tamaño y peso del bazo e hígado a las dosis estudiadas (3,9,18 mg/Kg). Se evidenció que las crías expuestas *in utero* a las dosis más altas de permetrina (9 y 18 mg/Kg) presentaron mayor daño en el DNA en leucocitos totales de médula ósea, en linfocitos B totales y en linfocitos preB. El daño observado fue mayor en los linfocitos B en comparación con el detectado en leucocitos totales, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de este tipo celular; la particular vulnerabilidad de las células B de acumular daño en el DNA ha sido previamente sugerida (211). Esto apoya la asociación entre la exposición *in utero* a permetrina con el desarrollo de

leucemia linfoblástica aguda B en niños, más que con otro tipo de cáncer hematopoyético. En linfocitos proB se encontró daño en menor magnitud; a la dosis más baja (3 mg/Kg) se notó un ligero aumento no significativo en la cantidad de daño al DNA, sin embargo, cabe destacar que solamente en linfocitos proB se detectó daño a esa dosis, ya que fue indetectable en las demás poblaciones estudiadas. Este resultado sugiere una mayor susceptibilidad de los linfocitos proB a esa dosis de permetrina (3 mg/Kg), lo que concordaría con los hallazgos del ensayo *in vitro* con linfocitos proB murinos, en los que se detectó daño al DNA a las concentraciones más bajas. Los resultados de este análisis concuerdan con trabajos previos en los que han observado daño al DNA en ratones expuestos a permetrina (105). Sin embargo, no se había reportado el efecto genotóxico de la exposición *in utero* a este agente.

En la primera parte del presente trabajo, se sugiere que podría haber sitios del genoma, como el gen *KMT2A*, con mayor vulnerabilidad a sufrir rupturas y esto pudo contribuir al efecto de daño que sufrió el gen por la exposición a permetrina; esta puede ser una causa por la que en reportes previos, con concentraciones similares del agente no se detectó daño global al DNA. Este resultado coincide con el daño observado en los estudios *in vivo* de este trabajo, el análisis no se limitó al gen *KMT2A* ya que se determinó a través de la detección de DSB, las cuales pueden ocurrir en cualquier parte del genoma; en este experimento el daño fue monitoreado días después de la exposición a permetrina (aproximadamente 15 días posteriores a la última dosis de permetrina). La limitante en esta parte del estudio es la incapacidad de determinar si existió daño específico en el gen *KMT2A* por efecto de la exposición *in utero* a permetrina, y si éste fue correcta o incorrectamente reparado. Se tiene como perspectiva investigar si ocurrieron fusiones oncogénicas que involucraron a *KMT2A* por efecto de la exposición a permetrina *in utero*. La detección de daño global al DNA de manera postnatal en ratones expuestos *in utero* a permetrina podría ser resultado de diversos mecanismos como la presencia de alteraciones cromosómicas que propicien inestabilidad genómica, un ambiente rico en estrés oxidante, un ambiente proapoptótico, mecanismos de reparación ineficientes, señales proinflamatorias, sistemas de desintoxicación ineficientes y una deficiencia en la respuesta al daño al DNA. Algunos de estos mecanismos de igual forma podrían conducir a fallas en la diferenciación del linfocito B.

En cuanto al estudio del efecto *in vitro* de la permetrina en linfocitos proB murinos, se encontró que este agente induce significativamente rupturas de DNA de doble cadena, sólo a la concentración más baja. Previamente en modelos *in vitro* en PBMCs se ha reportado un efecto hormético de la permetrina, en el que se evidenció daño al DNA en concentraciones más bajas y no se observó a concentraciones mayores (100), lo que coincide con los resultados de este trabajo. Sin embargo, se deben considerar las diferencias entre los diversos tipos celulares, ya que en la inducción del daño también es relevante el metabolismo particular de la célula afectada, el cual puede o no potenciar el efecto del agente (212). Debido a esto, los mecanismos de reparación también podrían ser distintos entre los tipos celulares. En este trabajo, se detectó daño a las 0.5 y 1 h de tratamiento, y fue indetectable a las 3 h, lo que sugiere que el daño ocasionado fue reparado.

Por otra parte, se encontró que el potencial de diferenciación de linfocitos B se puede alterar por la exposición prenatal a 3 mg/kg de permetrina. Reflejada como la disminución significativa en la frecuencia de linfocitos preB y B inmaduros a las 72 h de cultivo sin IL-7, que coincidió con un aumento en la frecuencia de linfocitos proB a las 72 h, que es el subtipo menos diferenciado, en cultivos provenientes de ratones expuestos a permetrina. Esto sugiere que los linfocitos proB de ratones tratados, poseen una menor capacidad de generar linfocitos B inmaduros. Con base en este resultado se debe determinar el mecanismo por el que estos linfocitos presentan menor potencial de diferenciación. Con esta misma dosis (3 mg/Kg) se detectó un leve incremento en el daño global al DNA, que aunque no fue significativo no debe descartarse, ya que a esta dosis solamente se detectó daño en los linfocitos proB y en ninguna otra población celular. Debe indagarse el significado de ese leve incremento no significativo en el daño al DNA, si se trata de señales de inestabilidad genómica o si es despreciable. Por otro lado, no se puede descartar que hayan ocurrido alteraciones en genes susceptibles a sufrir rupturas y rearrreglos como *KMT2A*, lo cual deberá ser analizado, y se tendría que probar si estos rearrreglos son estables y si es capaz de clonarse. Esta probable inestabilidad genómica en los linfocitos proB podría causar en parte el defecto en el potencial de diferenciación. Otros mecanismos a considerar son la desregulación a nivel de la expresión y metilación génica, ya que se comprobó en la primera

parte del trabajo que la permetrina tiene efecto a ese nivel. En estudios previos únicamente se había evaluado el efecto de los piretroides en el desarrollo mieloide (114); sin embargo, en este trabajo se muestra que también pueden actuar a nivel de desarrollo linfoide. Estos resultados son novedosos y se requieren investigaciones adicionales que ayuden a dilucidar con mayor profundidad el mecanismo de acción de la permetrina en la disrupción de la diferenciación linfoide.

7.4 Posibles mecanismos de acción de la permetrina en la inducción de daño genotóxico, en la generación de cambios en la expresión y metilación génica y en la disrupción del potencial de diferenciación linfoide B

En el presente trabajo se encontró que la permetrina promueve daño en genes asociados a leucemogénesis, genera fusiones oncogénicas, modifica la expresión génica, induce desmetilación del DNA y altera el desarrollo linfoide B; todos estos son eventos implicados en la etiología de la leucemia linfoblástica aguda. La LLA ocurre a partir de la formación *in utero* de clonas preleucémicas portadoras de fusiones oncogénicas o de hiperdiploidía, y la adquisición posnatal de cambios genéticos adicionales. Se ha planteado que las infecciones posnatales juegan un papel fundamental en potenciar la adquisición de mutaciones secundarias, las cuales se pueden adquirir durante la vida (44). Sin embargo aún no se conoce con certeza el origen de las primeras fusiones oncogénicas. Se ha sugerido que la exposición ambiental a ciertos agentes durante el desarrollo puede conducir a la generación de las primeras alteraciones potencialmente oncogénicas. Dentro de los agentes que se ha propuesto que podrían inducir alteraciones durante el desarrollo se encuentran los plaguicidas (212). Los insecticidas piretroides son una clase de plaguicidas utilizados por el ser humano en diversas actividades, y a nivel epidemiológico han sido ampliamente asociados con mayor riesgo de presentar leucemia pediátrica (30). Por lo que investigar si piretroides como la permetrina están implicados en eventos fundamentales en la etiología de la leucemia pediátrica es de gran importancia. Los efectos inducidos por la permetrina detectados en este estudio pueden ser atribuidos a diferentes mecanismos que se discuten a continuación (**Figura 36**).

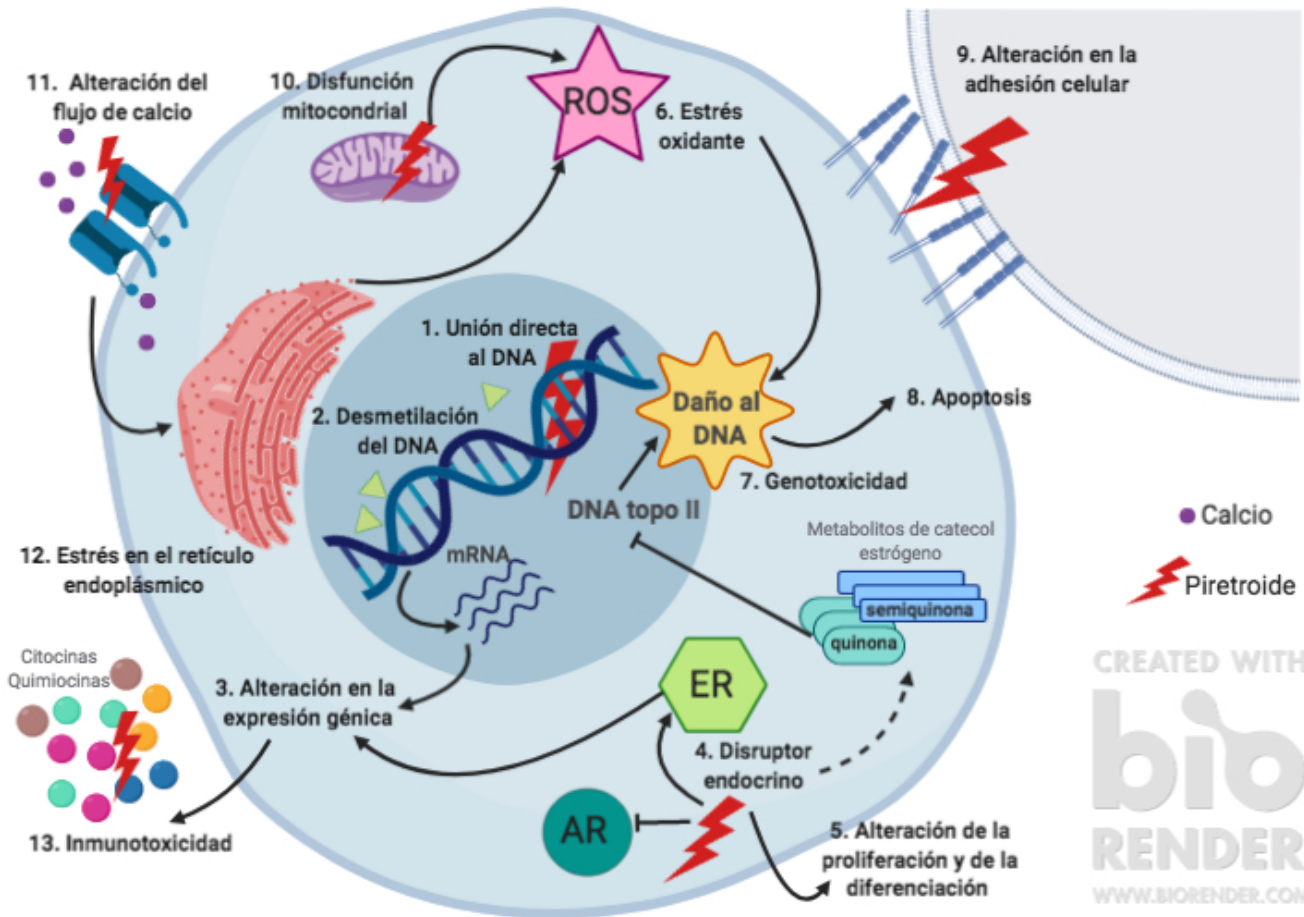


Figura 33 Posibles mecanismos de acción de la permetrina

El daño genotóxico de la permetrina podría estar asociado a la unión directa al DNA o a la inhibición de la enzima DNA Topoisomerasa II. La capacidad de unión de la permetrina al DNA, ha sido reportada previamente; sin embargo, los estudios son limitados (106). Por otro lado, debido a la susceptibilidad particular del gen *KMT2A* a sufrir rupturas por efecto de la permetrina, podría considerarse que este insecticida altera la función de la enzima DNA Topoisomerasa II, ya que *KMT2A* es particularmente susceptible a este tipo de inhibidores (145). En este mismo sentido, se ha reportado que insecticidas organofosforados inducen

ruptura en el gen a través de la inhibición de la Topoisomerasa II (141). Aunque la estructura de la permetrina es distinta a la de los organofosforados, en el presente trabajo y en estudios previos se ha detectado que comparten mecanismos de acción, por lo que es posible que se comporten de la misma manera. Adicional a estos efectos, deben considerarse otros que potencialmente podrían estar asociados a daño genotóxico.

El efecto en la disrupción endocrina es otro mecanismo reportado para los piretroides que podría estar implicado en la generación de daño al DNA. Los piretroides pueden actuar como agonistas o antagonistas de receptores de estrógenos y de andrógenos (120,121). Se ha determinado que el gen *KMT2A* es susceptible a sufrir rupturas por efecto del estradiol y el 4-hidroxi estradiol (123). Como mecanismos se propone que los receptores de estrógenos estén involucrados en la remodelación de la cromatina, cambios epigenéticos y posiblemente reparación del DNA. El gen *KMT2A* presenta un promotor crítico que es un sitio activo de remodelación de cromatina activa. Por otra parte, los catecol estrógenos como el 4-hidroxi estradiol son eliminados por enzimas de fase II o metabolizados por peroxidases dando lugar a quinonas y semiquinonas. Se ha sugerido que las quinonas pueden inhibir a la DNA Topoisomerasa II, por lo que podrían inducir rupturas en *KMT2A*. Adicionalmente las quinonas y semiquinonas pueden formar aductos de DNA e inducir la producción de ROS (123). Las ROS pueden provenir de diferentes fuentes, y desencadenar diversos procesos celulares, como daño al DNA, cambios en la expresión génica, desregulación de vías de señalización, entre otros, que explicarían en parte los efectos de la permetrina observados en este estudio.

Los piretroides pueden inducir la producción de ROS, y el desbalance en la generación de estas moléculas puede provocar múltiples efectos en las células hematopoyéticas. La adecuada regulación de niveles de ROS, y los cambios en la señalización que desencadenan, es fundamental para mantener el balance entre la auto-renovación, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las células troncales y progenitores hematopoyéticos (213), ya que las ROS sirven como moléculas de señalización que regulan procesos biológicos y fisiológicos (214). Adicionalmente, las ROS están implicadas en la regulación de la expresión y metilación génica (215). El desbalance en los niveles de ROS

puede conducir a estrés oxidante y daño al DNA, entre otros efectos asociados a la transformación maligna (216). Se sabe que la permetrina induce estrés oxidante, y en este trabajo se encontraron resultados que apoyan esta observación (124).

Aunque en este estudio no se analizaron directamente ROS inducidas por permetrina, algunos de los hallazgos de cambios en la expresión génica apoyan que la permetrina induce estrés oxidante. Sin embargo, debe considerarse que fueron pocos los genes con función antioxidante cuya expresión aumentó, lo cual era un evento esperado dado que se sugiere que la permetrina induce ROS y estrés oxidativo; es posible que la expresión de estos genes haya incrementado durante las primeras horas de exposición, y a las 72 h ya no fue detectado. Uno de los resultados predominantes fue el efecto de la permetrina sobre la desregulación de genes que codifican canales iónicos que regulan el flujo de sodio y calcio. Se ha reportado que los piretroides pueden interactuar con canales de sodio, que conduce a un desbalance en el flujo de sodio y calcio; la desregulación en los niveles en el calcio puede desencadenar estrés en el retículo endoplásmico (ER, del inglés *endoplasmic reticulum*), y respuesta a proteínas desplegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*) (202,217,218). El estrés en el ER se deriva de la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del ER y a través de la UPR se disminuye la síntesis de proteínas, para incrementar la capacidad de plegamiento y así restablecer la homeostasis en el ER. Si el estrés en el ER es persistente, por ejemplo, por la constante exposición a sustancias que inducen desbalance en el flujo de calcio como la permetrina, la UPR eventualmente puede inducir estrés oxidante y finalmente conducir a apoptosis o autofagia (219). La inducción de apoptosis es de importancia, ya que se ha reportado que el gen *KMT2A* es susceptible a sufrir rupturas por inducción de la apoptosis (220). En este estudio el efecto de la permetrina en la expresión de canales de sodio y calcio fue evidente, lo cual podría estar asociado a desbalances del flujo de calcio capaces de desencadenar estrés en ER y UPR, generando entre otros efectos estrés oxidante.

En asociación con la respuesta de estrés en ER y UPR se detectó que la permetrina lleva a desregulación del gen *GPX8*. Se encontró que la permetrina conduce a la represión en la expresión de *GPX8*, el cual codifica una glutatión peroxidasa que previene estrés en el ER,

ya que reduce el peróxido de hidrógeno generado a partir de la formación de puentes disulfuro en el ER por oxidasas de la familia Ero1. Por lo que la disminución de GPX8 conduce a estrés en el ER y a UPR, lo cual a su vez se acompaña de mayor producción de ROS y daño oxidante (221). Por lo que la represión en *GPX8* por efecto de la permetrina sugiere que haya inducción de estrés en el ER y UPR, así como mayor producción de estrés oxidante. Adicionalmente, se encontró desregulación en la expresión de genes asociados con ROS por efecto de la permetrina.

Se detectó que la permetrina desregula genes implicados en el metabolismo de ROS, lo que potencialmente podría incrementar el estrés oxidante. Mediante la herramienta Genemania se encontró que la permetrina desregula genes asociados a estrés oxidante, como *XDH* (*XOR*) y *PID1* en PBMCs. El gen *XDH* (*XOR*) codifica una enzima xantina oxidoreductasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico, los cuales son los pasos finales del catabolismo de purinas. Adicionalmente, *XDH* puede oxidar diferentes metabolitos endógenos y varios xenobióticos (222). La expresión de *XDH* puede incrementar por diferentes estímulos como hormonas, factores de crecimiento, citocinas inflamatorias y bajo nivel de oxígeno. *XDH* puede tener una función citotóxica y proinflamatoria o bien efecto antitumoral en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (222). La actividad de *XHD* conduce a la producción de ROS y de acuerdo a los niveles que se generen se desencadenarán efectos anti o pro tumorales. En este estudio se encontró que la permetrina induce sobreexpresión del gen *XDH*, cuya actividad podría potenciar la producción de ROS, lo que conduce a daño al DNA, peroxidación de lípidos de la membrana, oxidación de proteínas y apoptosis, principalmente por falla en la función mitocondrial (222). La actividad de *XDH* también puede inducirse través de citocinas pro-inflamatorias, lo que lleva a un incremento de ROS, las cuales pueden potenciar la respuesta inflamatoria estimulando la activación de leucocitos (adhesión, quimiotaxis) y la activación endotelial (222). Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo, en el que se detectó que la permetrina puede inducir genes de la vía IFN γ , la cual está asociada a inflamación. Además se evidenció desregulación de genes que participan en adhesión y quimiotaxis, lo cual concuerda con la desregulación del gen *XDH*.

La sobreexpresión del gen *PID1* (*NYGGF4*) detectada en PBMCs expuestos a permetrina se ha asociado a estrés oxidante. Se ha observado que en otros tipos celulares este hallazgo conduce a disfunción mitocondrial y genera un exceso de ROS intracelular. La sobreexpresión de *PID1* disminuye el número de mitocondrias, produce morfología mitocondrial anormal y disminución en la síntesis de ATP, e incrementa las ROS. El desbalance en la dinámica mitocondrial así como el exceso de ROS están implicados en diversas patologías (223). El exceso de ROS también influye en la maduración hematopoyética, ya que ésta depende en parte de la función mitocondrial. De igual forma se ha establecido que las células preB muestran alta dependencia de la función mitocondrial para sobrevivir (224). Con base en esto, la desregulación en *PID1* resultaría particularmente importante en BMMCs.

La sobreproducción de ROS por efecto de la permetrina puede conducir a diversos eventos, entre los que destaca el daño al DNA. La genotoxicidad de las ROS se produce a través de la generación de varias lesiones oxidativas en el DNA en las que hay daño en las bases o en la desoxirribosa. El tipo de daño oxidante mediado por radicales hidroxilo incluye bases oxidadas, sitios abásicos, aductos DNA-DNA inter hebra, SSB, DSB y entrecruzamientos DNA-proteína. La oxidación de nucleótidos no genera directamente rupturas en las hebras de DNA; sin embargo, el radical hidroxilo ataca el andamio azúcar-fosfato y puede generar SSB. Si dos reacciones de este tipo ocurren en cercanía (clusters), es posible que se origine una DSB. Las DSBs también pueden generarse si las lesiones lábiles son convertidas a SSB o si hay procesamiento enzimático del daño en la base. Si este daño se queda sin ser reparado, o se repara de manera errónea, puede derivar en rearrreglos genéticos (225). Esto explicaría en parte el mecanismo por el que la permetrina genera daño global al DNA, el cual podría ser particularmente mayor en sitios vulnerables como el gen *KMT2A*.

Aunque se detectó daño al DNA por efecto de la permetrina a nivel de expresión génica no se observó mayor actividad de genes de reparación del DNA ni de respuesta de daño al DNA, aunque podría profundizarse la búsqueda con enfoque en este proceso celular. Otra posibilidad es que la activación de la expresión de genes de reparación haya ocurrido en las primeras horas de exposición, y no se detectara a las 72 h, o que la activación de las

proteínas de reparación fuera de manera postraduccional, independiente a su expresión. Además, se deben considerar las diferencias entre los experimentos de genotoxicidad y de expresión, ya que en el caso del efecto genotóxico se analizaron células estimuladas con mitógeno, y en el caso del análisis de expresión y metilación las células no fueron estimuladas. En un reporte previo en PBMCs se detectó que la permetrina induce DSBs, aunque no se observaron niveles mayores de la proteína Ku80 (*XRCC5*), que participa en el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos canónica (NEHJ, del inglés Non Homologous End Joining); por lo que se propone que pudo ocurrir NEHJ alterna (100). En este trabajo de la misma forma se detectó daño genotóxico por el efecto de la permetrina, aunque sin incremento en la expresión de genes de reparación, de hecho se encontró represión del gen *XRCC5* (Ku80) en PBMCs y en BMMCs (225). Además de su rol fundamental en reparación del DNA, *XRCC5* ha sido implicado en otros procesos celulares como el mantenimiento de telómeros, la recombinación VDJ del receptor de antígenos, regulación de la transcripción y apoptosis. Se ha reportado que *XRCC5* protege contra la degradación telomérica y contra recombinación intercromosómica. La pérdida de *XRCC5* puede conducir a pérdida masiva de telómeros y esto a su vez puede causar a inestabilidad genómica (225). En este estudio se encontró que la permetrina reprime *XRCC5*, con lo cual estaría inhibiéndose esta vía de reparación y además se favorecería la inestabilidad genómica a través de la degradación telomérica.

Además de su función en la protección telomérica, *XRCC5* participa en el desarrollo de linfocitos. La recombinación VDJ es iniciada por la inducción de DSB en secuencias específicas, por un complejo enzimático formado por RAG1 y RAG2 en los extremos de los dos segmentos codificantes que deben ser unidos. El procesamiento y reparación subsecuentes de las estructuras resultantes se lleva a cabo a través de NHEJ, por lo que *XRCC5* está involucrado en este proceso. La represión de *XRCC5* por efecto de la permetrina podría afectar la recombinación VDJ de los linfocitos proB, que es necesaria para el correcto desarrollo del linfocito B (225). Esto concuerda con los hallazgos de la exposición *in vivo* a permetrina, que muestran que este insecticida es capaz de afectar el potencial de diferenciación del linfocito B. Se deben esclarecer los mecanismos por los que la permetrina afecta el desarrollo de células B, el cual también puede alterarse por cambios en la expresión

y metilación de otros genes, la presencia de fusiones oncogénicas, la desregulación de vías de señalización implicadas, o la desregulación de citocinas .

Se detectó que los insecticidas inducen inmunotoxicidad, generan alteración de citocinas y quimiocinas que tienen un papel importante en el sistema inmune. Este efecto se encontró más claramente con malatión, el cual induce una clara respuesta pro inflamatoria en BMMCs. Sin embargo, con la exposición a permetrina también se encontraron algunas alteraciones a nivel de sistema inmune. Como se mencionó, la permetrina puede inducir estrés oxidante a través de la producción de estrés en el ER y a UPR, posiblemente por la desregulación en el flujo de calcio, y mediante la inhibición de *GPX8*. La UPR generada puede incrementar los niveles de ROS y causar inflamación. La liberación de citocinas inflamatorias puede a su vez inducir UPR. Existe una interacción estrecha entre el estrés en el ER, UPR y la regulación en el sistema inmune; se ha informado que la activación de este último controla positivamente factores de transcripción que conducen a la producción de citocinas pro-inflamatorias como $IL1\beta$, $TNF\alpha$ e $INF\gamma$, generando una respuesta inflamatoria (226). Esto coincide con la detección de sobre-expresión en genes de la vía del $INF\gamma$ por la exposición de permetrina en BMMCs observada en este trabajo.

En los estudios de expresión se encontró que el malatión y la permetrina tienen un efecto primordial en sistema nervioso central (172,194,225), el cual también se relaciona con daños en el sistema hematopoyético. Como se esperaba, se detectó alteración de un gran número de genes implicados a diferentes niveles en sistema nervioso central, como canales iónicos, moléculas de adhesión, factores de transcripción, receptores de membrana, entre otros. Cabe mencionar que existe una estrecha asociación entre la regulación neural, la hematopoyesis, la inflamación y el cáncer (227). El sistema nervioso simpático es un componente regulatorio crítico en el nicho hematopoyético, en el que las fibras de nervios simpáticos y células derivadas de la cresta neural funcionan como constituyentes del nicho y son esenciales en mantener el comportamiento de las HSC durante la homeostasis y en condiciones de estrés (227). En el sistema hematopoyético, el sistema nervioso autónomo regula la homeostasis del nicho, la regeneración, y modula la respuesta inflamatoria. También se ha sugerido que las células cancerosas aprovechan la inervación por circuitos

neurales para promover la progresión metastásica (227). Por lo que los efectos de la permetrina sobre genes que regulan el sistema nervioso central, también pueden impactar la hematopoyesis, la respuesta inflamatoria y contribuir al desarrollo de cáncer.

Los efectos de la permetrina pueden afectar directamente las células embrionarias durante el desarrollo o ser indirectos. Los resultados sugieren que la permetrina es capaz de inducir alteraciones oncogénicas, modifica la metilación del DNA y altera la expresión de genes asociados a regulación del sistema inmune e inflamación, modifica la regulación de estrés oxidante, la regulación de estrés en el ER y UPR, y a la regulación de la dinámica mitocondrial, entre otros procesos y vías estrechamente asociadas a cáncer. Todos estos efectos podrían presentarse directamente en las células embrionarias durante el desarrollo ya que la permetrina es capaz de atravesar la barrera placentaria (23). Sin embargo, debe considerarse que es posible que la acción de la permetrina sea de manera indirecta, a través de factores liberados por la placenta en respuesta a la exposición. Se ha determinado que el trofoblasto constituye una barrera que puede liberar factores que dañan las células troncales embrionarias cuando hay una exposición a agentes que inducen estrés oxidante, como la permetrina. Se sugiere que la barrera placentaria puede enviar una señal con efecto de tipo vecindad o “*bystander*” para causar daño al DNA en las células vecinas, de un modo similar al que ocurre con la radiación, en la que la recepción y la emisión de la señal es dependiente de estrés oxidante mitocondrial (212). Esta posibilidad es factible en el caso de la permetrina, ya que induce disrupción mitocondrial y estrés oxidante. Se ha reportado que diversas moléculas pueden ser liberadas desde la placenta y que las células del cordón umbilical son potencialmente sensibles a algunas de ellas. Esto podría generar daño genotóxico en las células fetales hematopoyéticas y potencialmente generar clones pre-leucémicas. Se refiere que aunque el daño al DNA originado por la exposición *in utero* a genotóxicos es reparado dentro de las cuatro semanas postnatales, queda un daño remanente, posiblemente concentrado en células con capacidad clonogénica, que si son expuestas posteriormente a un estímulo viral u otro estrés pueden incrementar significativamente el daño al DNA e inducir la proliferación de células progenitoras y troncales (212). Esto puede explicar por qué el daño en el DNA de linfocitos B de ratones expuestos *in utero* a permetrina persiste durante varios días post-tratamiento. También debe considerarse que en los ratones expuestos

probablemente persistió también un estado inflamatorio, pro-oxidante y probablemente con fallas en la respuesta al daño al DNA.

Este estudio aporta evidencia que muestra que la permetrina induce procesos celulares y moleculares estrechamente ligados al desarrollo de leucemia. Además de inducir daño genotóxico y potencialmente oncogénico, la permetrina está asociada a la desregulación de citocinas y la inducción de señales pro- inflamatorias; esto es de gran relevancia, ya que se ha planteado que en la etiología de la LLA, la susceptibilidad de los linfocitos proB y preB a sufrir lesiones genéticas durante la linfopoyesis se exagera por la señalización anormal de citosinas, así como por un estímulos inflamatorios repetidos (228). Este estudio muestra la plausibilidad biológica de la asociación epidemiológica entre la exposición a permetrina y el desarrollo de LLA.

8. CONCLUSIONES

El uso de agentes piretroides como la permetrina ha aumentado significativamente en las últimas décadas, actualmente se emplea en diversas actividades humanas, y se producen anualmente más de 600 toneladas alrededor del mundo. El excesivo uso global de estos agentes ha causado preocupación porque a nivel epidemiológico se han asociado con el desarrollo de leucemia pediátrica. Sin embargo, los estudios a nivel *in vivo* e *in vitro* que muestran la plausibilidad biológica de la asociación entre permetrina y leucemia en niños son limitados. Es importante conocer si los agentes piretroides como la permetrina participan en la etiología de la leucemia linfoblástica aguda B, que es el tipo de leucemia más frecuente en edad pediátrica. Dentro de los eventos biológicos característicos de la etiología de la leucemia se encuentra la aneuploidía, el daño estructural en genes específicos como *KMT2A*, *ETV6-RUNX1*, *IGH*, las modificaciones epigenéticas, que pueden inducir cambios en la expresión génica, lo que a nivel celular conlleva al arresto en la diferenciación de linfocitos B. En este trabajo se estudió si la permetrina participa en los eventos mencionados, que son característicos del desarrollo de leucemia pediátrica.

Se encontró en ensayos *in vitro* que la permetrina en altas y bajas concentraciones es capaz de inducir alteraciones estructurales en genes como *KMT2A* e *IGH*, y también causa aneuploidía. El daño en estos genes se detectó en células en interfase y en metafase, reflejando que las células pueden seguir proliferando a pesar del daño que portan, y potencialmente podrían transmitirlo a células hijas. Se observó que la permetrina además de producir daño en los genes mencionados, es capaz de generar fusiones oncogénicas en un contexto de inestabilidad genética, que potencialmente pueden conducir a la transformación maligna. La exposición *in vitro* a permetrina también puede generar desmetilación de promotores, llevando a sobre-expresión génica. Se detectaron diversas modificaciones en la expresión de genes por efecto de la permetrina, se encontró alta representación de genes que codifican canales iónicos, citocinas, quimiocinas, y moléculas de adhesión. Adicionalmente, se encontró que la permetrina desregula genes asociados a estrés oxidante, lo cual puede conducir a daño genotóxico, desregulación de vías de señalización, e inflamación. Los cuales son eventos asociados al desarrollo de la LLA.

A nivel *in vivo* se evidenció que los ratones expuestos *in utero* a permetrina presentan daño al DNA en células de médula ósea, el cual también está en los linfocitos proB y preB, que son las células en las que se muestran las lesiones iniciales en el desarrollo de la leucemia. Se propone que este daño pueda ser causado por la inducción de rearrreglos genéticos, por el estado pro oxidante inducido por la permetrina, que además genera señales inflamatorias continuas y probablemente sistemas de reparación deficiente en los ratones expuestos. En concordancia, se observó que la exposición *in utero* a permetrina afecta la diferenciación de linfocitos proB, los cuales mostraron menor capacidad de progresar hacia células B inmaduras. Este efecto puede estar asociado al daño genotóxico, a la desregulación en la expresión de genes, a la inducción de estrés oxidante y a la inmunotoxicidad producida por la permetrina. Este trabajo aporta evidencia biológica a distintos niveles que apoya las observaciones epidemiológicas que asocian la exposición a permetrina con mayor riesgo a presentar leucemia pediátrica. Además los hallazgos de este estudio están en línea con lo propuesto en la “hipótesis de Greaves”, que plantea que los primeros eventos mutacionales podrían ser causados por agentes ambientales durante el desarrollo y que podrían conducir al desarrollo de leucemia a través de eventos adicionales y fallas en el sistema inmune. Los

esfuerzos futuros para delinear con mayor precisión los mecanismos por los cuales la permetrina ejerce los efectos observados en este trabajo son de gran importancia.

9. LITERATURA CITADA

1. Insecticides [Internet]. [citado 18 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://npic.orst.edu/ingred/ptype/insecticide.html>
2. Krieger RI. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Elsevier; 2010. 1238 p.
3. Gilbert LI, Gill SS. Insect Control: Biological and Synthetic Agents. Academic Press; 2010. 481 p.
4. Louise Hénault-Ethier. Health and environmental impacts of pyrethroid insecticides: What we know, what we don't know and what we should do about it [Internet]. [citado 19 de febrero de 2019]. Disponible en: https://equiterre.org/sites/fichiers/health_and_environmental_impacts_of_pyrethroid_insecticides_full_report_en.pdf
5. WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES. PERMETHRIN 25:75 [Internet]. [citado 20 de febrero de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/whopes/quality/Permethrin_25_75_specs_eval_WHO_Sep_2011.pdf
6. EPA Permethrin Facts 2009 [Internet]. [citado 19 de febrero de 2019]. Disponible en: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-109701_1-Aug-09.pdf
7. IARC Monographs Volume 53. IARC monograph [Internet]. 1990 [citado 4 de julio de 2017]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-13.pdf>
8. Permethrin General Fact Sheet [Internet]. [citado 19 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://npic.orst.edu/factsheets/PermGen.html>
9. Mazurek CM, Lee NP. How to manage head lice. West J Med. mayo de 2000;172(5):342-5.
10. World Health Organization. SAFETY OF PYRETHROIDS FOR PUBLIC HEALTH USE [Internet]. 2005 [citado 20 de febrero de 2019]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69008/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.10.pdf;jsessionid=7B97438D5401EF1A17488FFCC217DC5C?sequence=1
11. Wei B, Isukapalli SS, Weisel CP. Studying permethrin exposure in flight attendants using a physiologically based pharmacokinetic model. J Expo Sci Environ Epidemiol. julio de 2013;23(4):416-27.
12. Rossbach B, Appel KE, Mross KG, Letzel S. Uptake of permethrin from impregnated clothing. Toxicol Lett. 15 de enero de 2010;192(1):50-5.
13. Rusiecki JA, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. Environ Health Perspect. abril de 2009;117(4):581-6.
14. Morgan MK. Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. Int J Environ Res Public Health. agosto de 2012;9(8):2964-85.
15. Barr DB, Olsson AO, Wong L-Y, Udunka S, Baker SE, Whitehead RD, et al. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. Environ Health Perspect. junio de 2010;118(6):742-8.
16. Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, et al. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. Occup Environ Med. febrero de 2006;63(2):131-4.

17. Lu C, Barr DB, Pearson MA, Walker LA, Bravo R. The attribution of urban and suburban children's exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a longitudinal assessment. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* enero de 2009;19(1):69-78.
18. Permethrin Technical Fact Sheet [Internet]. [citado 20 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/Permttech.html>
19. Ding G, Shi R, Gao Y, Zhang Y, Kamijima M, Sakai K, et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environ Sci Technol.* 18 de diciembre de 2012;46(24):13480-7.
20. Glorennec P, Serrano T, Fravallo M, Warembourg C, Monfort C, Cordier S, et al. Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in western France. *Environ Int.* julio de 2017;104:76-82.
21. Berkowitz GS, Obel J, Deych E, Lapinski R, Godbold J, Liu Z, et al. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ Health Perspect.* enero de 2003;111(1):79-84.
22. Limon-Miro AT, Aldana-Madrid ML, Alvarez-Hernandez G, Antunez-Roman LE, Rodriguez-Olibarria G, Valencia Juillerat ME. Breast milk intake and mother to infant pesticide transfer measured by deuterium oxide dilution in agricultural and urban areas of Mexico. *Chemosphere.* agosto de 2017;181:682-9.
23. Neta G, Goldman LR, Barr D, Apelberg BJ, Witter FR, Halden RU. Fetal exposure to chlordane and permethrin mixtures in relation to inflammatory cytokines and birth outcomes. *Environ Sci Technol.* 15 de febrero de 2011;45(4):1680-7.
24. Mylène Ratelle JC. Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicol Lett.* 2014;232(2):369-75.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
26. Cancer Facts and Statistics 2015 | Research | American Cancer Society [Internet]. [citado 21 de abril de 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>
27. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature.* 17 de mayo de 2001;411(6835):390-5.
28. Sankpal UT, Pius H, Khan M, Shukoor MI, Maliakal P, Lee CM, et al. Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* octubre de 2012;33(5):1265-74.
29. Saillenfait A-M, Ndiaye D, Sabaté J-P. Pyrethroids: exposure and health effects--an update. *Int J Hyg Environ Health.* mayo de 2015;218(3):281-92.
30. Boffetta P, Desai V. Exposure to permethrin and cancer risk: a systematic review. *Crit Rev Toxicol.* julio de 2018;48(6):433-42.
31. Burns CJ, Pastoor TP. Pyrethroid epidemiology: a quality-based review. *Crit Rev Toxicol.* abril de 2018;48(4):297-311.
32. Alavanja MCR, Hofmann JN, Lynch CF, Hines CJ, Barry KH, Barker J, et al. Non-hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. *PLoS One.* 2014;9(10):e109332.
33. Turner MC, Wigle DT, Krewski D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* enero de 2010;118(1):33-41.
34. Facts and Statistics | Leukemia and Lymphoma Society [Internet]. [citado 22 de julio de 2015]. Disponible en: <http://www.lls.org/http%3A/llsorg.prod.acquia-sites.com/facts-and->

statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics

35. Hernández AF, Menéndez P. Linking Pesticide Exposure with Pediatric Leukemia: Potential Underlying Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4).
36. Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 12 de enero de 2006;354(2):166-78.
37. Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, Sánchez-Zubieta F, Cárdenas-Cardós R, Escamilla-Asian G, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 de abril de 2013;132(7):1646-50.
38. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 22 de marzo de 2008;371(9617):1030-43.
39. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México [Internet]. 2010 [citado 22 de febrero de 2019]. Disponible en: https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_del_cancer_en_nic3b1osyadolescentes_mexico.pdf
40. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. octubre de 2009;23(5):991-1010, v.
41. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de septiembre de 2005;23(26):6306-15.
42. Pui C-H, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 13 de diciembre de 2018;
43. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. septiembre de 2003;3(9):639-49.
44. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. agosto de 2018;18(8):471-84.
45. Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008;(39):87-90.
46. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsauro G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32(2):273-84.
47. Liu H, Cheng EHY, Hsieh JJD. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther*. julio de 2009;8(13):1204-11.
48. Burke MJ, Bhatla T. Epigenetic Modifications in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Pediatr* [Internet]. 14 de mayo de 2014 [citado 31 de mayo de 2016];2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030177/>
49. Chatterton Z, Morenos L, Saffery R, Craig JM, Ashley D, Wong NC. DNA methylation and miRNA expression profiling in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. octubre de 2010;2(5):697-708.
50. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 6 de julio de 2012;150(1):12-27.
51. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. octubre de 2011;11(10):726-34.
52. San Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodríguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2013;5(5):525-38.
53. Timms JA, Relton CL, Rankin J, Strathdee G, McKay JA. DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia.

Epigenomics. abril de 2016;8(4):519-36.

54. Navarrete-Meneses MDP, Pérez-Vera P. [Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia]. *Bol Med Hosp Infant Mex.* agosto de 2017;74(4):243-64.
55. Garcia-Manero G, Yang H, Kuang S-Q, O'Brien S, Thomas D, Kantarjian H. Epigenetics of acute lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* enero de 2009;46(1):24-32.
56. Fu H-Y, Wu D-S, Zhou H-R, Shen J-Z. CpG island methylator phenotype and its relationship with prognosis in adult acute leukemia patients. *Hematol Amst Neth.* septiembre de 2014;19(6):329-37.
57. Mirebeau D, Acquaviva C, Suciú S, Bertin R, Dastugue N, Robert A, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica.* julio de 2006;91(7):881-5.
58. Garcia-Manero G, Jeha S, Daniel J, Williamson J, Albitar M, Kantarjian HM, et al. Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1 de febrero de 2003;97(3):695-702.
59. Kuang S-Q, Bai H, Fang Z-H, Lopez G, Yang H, Tong W, et al. Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 25 de marzo de 2010;115(12):2412-9.
60. Bahari G, Hashemi M, Naderi M, Taheri M. TET2 Promoter DNA Methylation and Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2016;17(8):3959-62.
61. Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia.* septiembre de 2003;17(9):1845-50.
62. Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Mol Cancer.* 2010;9:44.
63. Irvani M, Dhat R, Price CM. Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2, CDKN1, p15INK4B) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 20 de noviembre de 1997;15(21):2609-14.
64. Kim M, Yim S-H, Cho N-S, Kang S-H, Ko D-H, Oh B, et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet.* noviembre de 2009;195(1):59-65.
65. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2009;69(10):4443-53.
66. Rodríguez-Otero P, Román-Gómez J, Vilas-Zornoza A, José-Eneriz ES, Martín-Palanco V, Rifón J, et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. *Br J Haematol.* octubre de 2011;155(1):73-83.
67. Chatterton Z, Morenos L, Mechinaud F, Ashley DM, Craig JM, Sexton-Oates A, et al. Epigenetic deregulation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics.* marzo de 2014;9(3):459-67.
68. Hütter G, Kaiser M, Neumann M, Mossner M, Nowak D, Baldus CD, et al. Epigenetic

regulation of PAX5 expression in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* mayo de 2011;35(5):614-9.

69. Thathia SH, Ferguson S, Gautrey HE, van Otterdijk SD, Hili M, Rand V, et al. Epigenetic inactivation of TWIST2 in acute lymphoblastic leukemia modulates proliferation, cell survival and chemosensitivity. *Haematologica.* marzo de 2012;97(3):371-8.

70. Abd El-Hamid TM, Mossallam GI, Sherisher MA. The Clinical Implications of Methylated p15 and p73 Genes in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Egypt Natl Cancer Inst.* septiembre de 2010;22(3):175-84.

71. Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, et al. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de septiembre de 2007;13(17):5048-55.

72. Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martín-Palanco V, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Garate L, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PloS One.* 2011;6(2):e17012.

73. Takeuchi S, Matsushita M, Zimmermann M, Ikezoe T, Komatsu N, Seriu T, et al. Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* octubre de 2011;35(10):1345-9.

74. Nordlund J, Milani L, Lundmark A, Lönnerholm G, Syvänen A-C. DNA methylation analysis of bone marrow cells at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia and at remission. *PloS One.* 2012;7(4):e34513.

75. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, Wang J, Wong N, Yang W, et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood.* 10 de noviembre de 2011;118(19):5218-26.

76. Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, et al. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2014;15(1):75-84.

77. Hatirnaz Ng Ö, Firtina S, Can İ, Karakaş Z, Ağaoğlu L, Dođru Ö, et al. A Possible Role for WNT5A Hypermethylation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Turk J Hematol.* junio de 2015;32(2):127-35.

78. Pelayo R, Dorantes-Acosta E, Vadillo E, Fuentes-Panana E. From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Adv Hematop Stem Cell Res [Internet].* 27 de enero de 2012 [citado 26 de febrero de 2019]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-hematopoietic-stem-cell-research/from-hsc-to-b-lymphoid-cells-in-normal-and-malignant-hematopoiesis>

79. Rosana-Pelayo, Jesús Santa-Olalla, Iván Velasco. Células troncales y medicina regenerativa [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México; [citado 27 de febrero de 2019]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Jose_Chimal/publication/323369074_Celulas_troncales_n_eurales/links/5a906b99a6fdccceff01f4a0/Celulas-troncales-neurales.pdf

80. Juárez-Velazquez MR, Salas-Labadia C, Reyes-Leon A, Navarrete-Meneses MP, Fuentes-Panana EM, Perez-Ver P. Genetic Markers in the Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. En: Mejia-Arangure JM, editor. *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic [Internet].* InTech; 2013 [citado 4 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/clinical-epidemiology-of-acute-lymphoblastic-leukemia-from-the-molecules-to-the-clinic/genetic-markers-in-the-prognosis-of->

childhood-acute-lymphoblastic-leukemia

81. Pérez-Vera P, Reyes-León A, Fuentes-Pananá EM. Signaling Proteins and Transcription Factors in Normal and Malignant Early B Cell Development. *Bone Marrow Res* [Internet]. 2011;2011. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3200079/>
82. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, Russell LJ. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. agosto de 2014;99(8):1334-42.
83. Ferreira JD, Couto AC, Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. In utero pesticide exposure and leukemia in Brazilian children < 2 years of age. *Environ Health Perspect*. febrero de 2013;121(2):269-75.
84. Bailey HD, Infante-Rivard C, Metayer C, Clavel J, Lightfoot T, Kaatsch P, et al. Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the Childhood Leukemia International Consortium. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 de diciembre de 2015;137(11):2644-63.
85. Borkhardt A, Wilda M, Fuchs U, Gortner L, Reiss I. Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. septiembre de 2003;88(5):F436-437.
86. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res*. 15 de marzo de 2004;64(6):2264-9.
87. Chapiro E, Radford-Weiss I, Cung H-A, Dastugue N, Nadal N, Taviaux S, et al. Chromosomal translocations involving the IGH@ locus in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: 29 new cases and a review of the literature. *Cancer Genet*. mayo de 2013;206(5):162-73.
88. Lafiura KM, Bielawski DM, Posecion NC, Ostrea EM, Matherly LH, Taub JW, et al. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr Blood Cancer*. 15 de octubre de 2007;49(5):624-8.
89. Herrera A, Barrueco C, Caballo C, de la Peña E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 1992;20(3):218-22.
90. Barrueco C, Herrera A, Caballo C, de la Peña E. Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1994;14(1):31-8.
91. Undeğer U, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch Toxicol*. marzo de 2005;79(3):169-76.
92. Turkez H, Aydin E. The effects of taurine on permethrin-induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arh Hig Rada Toksikol*. marzo de 2012;63(1):27-34.
93. Ramos-Chavez LA, Sordo M, Calderon-Aranda E, Castañeda-Saucedo E, Ostrosky-Wegman P, Moreno-Godinez ME. A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(1):7-14.
94. Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat Res*. marzo de 1979;66(3):277-90.
95. Caballo C, Herrera A, Barrueco C, Santa-María A, Sanz F, de la Peña E. Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1992;12(6):243-9.
96. Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. enero de 1995;341(3):169-84.

97. Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, et al. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage («comet» assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*. 15 de septiembre de 1998;130(2-3):129-39.
98. Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. marzo de 2002;259(3):150-3.
99. Sundaramoorthy R, Velusamy Y, Balaji APB, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chem Biol Interact*. 25 de septiembre de 2016;257:119-24.
100. Suárez-Larios K, Salazar-Martínez A-M, Montero-Montoya R. Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair. *J Toxicol*. 2017;2017:3574840.
101. Zeljezic D, Vinkovic B, Kasuba V, Kopjar N, Milic M, Mladinic M. The effect of insecticides chlorpyrifos, α -cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere*. septiembre de 2017;182:332-8.
102. Navarrete-Meneses MDP, Pérez-Vera P. Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence. *Rev Environ Health*. 23 de marzo de 2019;
103. Institóris L, Undeger U, Siroki O, Nehéz M, Dési I. Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology*. 10 de septiembre de 1999;137(1):47-55.
104. Turkez H, Togar B, Polat E. Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats. *Cytotechnology*. agosto de 2012;64(4):459-64.
105. Roma GC, de Oliveira PR, Araujo AM, Bechara GH, Mathias MIC. Genotoxic and mutagenic effects of permethrin in mice: micronuclei analysis in peripheral blood erythrocytes. *Microsc Res Tech*. diciembre de 2012;75(12):1732-6.
106. Ahmadi F, Ghanbari K. Proposed model for binding of permethrin and deltamethrin insecticides with ct-DNA, a structural comparative study. *Ecotoxicol Environ Saf*. agosto de 2014;106:136-45.
107. Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*. 15 de diciembre de 2005;216(2-3):244-52.
108. Xia D, Parvizi N, Zhou Y, Xu K, Jiang H, Li R, et al. Paternal fenvalerate exposure influences reproductive functions in the offspring. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. noviembre de 2013;20(11):1308-15.
109. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol Elmsford N*. diciembre de 2012;34(4):708-19.
110. Go V, Garey J, Wolff MS, Pogo BG. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspect*. marzo de 1999;107(3):173-7.
111. Ashihara E, Takada T, Maekawa T. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer Sci*. junio de 2015;106(6):665-71.
112. Kasat K, Go V, Pogo BGT. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B

- proto-oncogene expression. *Environ Int.* noviembre de 2002;28(5):429-32.
113. Mandarapu R, Prakhya BM. In vitro myelotoxic effects of cypermethrin and mancozeb on human hematopoietic progenitor cells. *J Immunotoxicol.* marzo de 2015;12(1):48-55.
114. Chatterjee S, Basak P, Chaklader M, Das P, Pereira JA, Chaudhuri S, et al. Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: an experimental model to study the toxic effects of pesticide. *Environ Toxicol.* enero de 2014;29(1):84-97.
115. El Okda E-S, Abdel-Hamid MA-A, Hamdy AM. Immunological and genotoxic effects of occupational exposure to α -cypermethrin pesticide. *Int J Occup Med Environ Health.* 19 de junio de 2017;30(4):603-15.
116. Punareewattana K, Smith BJ, Blaylock BL, Longstreth J, Snodgrass HL, Gogal RM, et al. Topical permethrin exposure inhibits antibody production and macrophage function in C57Bl/6N mice. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* febrero de 2001;39(2):133-9.
117. Diel F, Horr B, Borck H, Savtchenko H, Mitsche T, Diel E. Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes in vitro. *Toxicol Lett.* 30 de junio de 1999;107(1-3):65-74.
118. Aouey B, Derbali M, Chtourou Y, Bouchard M, Khabir A, Fetoui H. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environ Sci Pollut Res Int.* febrero de 2017;24(6):5841-56.
119. Zhou J-L, Ding Z, Ge X, Shi Q-M, Wang H-X, Chen G, et al. Cypermethrin inhibits interleukin-6-induced androgen receptor transactivation through signal transducer and activator of transcription 3. *Toxicol Mech Methods.* 5 de julio de 2017;1-20.
120. Du G, Shen O, Sun H, Fei J, Lu C, Song L, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* julio de 2010;116(1):58-66.
121. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H, Wang X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 11 de octubre de 2002;65(19):1419-35.
122. Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, van Dongen JJM, Szczepański T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* enero de 2006;30(1):98-102.
123. Schnyder S, Du NT, Le HB, Singh S, Loreda GA, Vaughan AT. Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. *Leuk Res.* octubre de 2009;33(10):1400-4.
124. Wang X, Martínez M-A, Dai M, Chen D, Ares I, Romero A, et al. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ Res.* agosto de 2016;149:86-104.
125. Li H-Y, Zhong Y-F, Shi N. [Effect of deltamethrin on production of reactive oxygen species in PC12 cells]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi Chin J Ind Hyg Occup Dis.* noviembre de 2008;26(11):654-8.
126. Maurya SK, Mishra J, Tripathi VK, Sharma R, Siddiqui MH. Cypermethrin induces astrocyte damage: role of aberrant Ca(2+), ROS, JNK, P38, matrix metalloproteinase 2 and migration related reelin protein. *Pestic Biochem Physiol.* mayo de 2014;111:51-9.
127. Gabbianelli R, Falcioni G, Nasuti C, Cantalamessa F. Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology.* 14 de junio de 2002;175(1-3):91-101.
128. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* septiembre de 1980;56(3):344-50.
129. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized

- RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. diciembre de 1999;13(12):1901-28.
130. Fuscoe JC, Setzer RW, Collard DD, Moore MM. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis*. mayo de 1996;17(5):1013-20.
131. Agilent Technologies. Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling. Version 6.5 [Internet]. 2010 [citado 7 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4140-90050_GeneExpression_TwoColor_6.9.pdf
132. Agilent Technologies. Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation. Version 2.3.1 [Internet]. 2015 [citado 7 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4170-90012_Methylation_2.3.pdf
133. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2019;47(D1):D419-26.
134. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system | Nature Protocols [Internet]. [citado 20 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nprot.2013.092#bx3>
135. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. julio de 2010;38(Web Server issue):W214-220.
136. Glukhov SI, Rubtsov MA, Alexeyevsky DA, Alexeevski AV, Razin SV, Iarovaia OV. The Broken MLL Gene Is Frequently Located Outside the Inherent Chromosome Territory in Human Lymphoid Cells Treated with DNA Topoisomerase II Poison Etoposide. *PLoS ONE* [Internet]. 25 de septiembre de 2013 [citado 31 de marzo de 2016];8(9). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3783379/>
137. IARC Monographs Volume 112. IARC Monographs Volume 112: evaluation of - MonographVolume112.pdf [Internet]. 2016 [citado 22 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-07.pdf>
138. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM, et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*. 15 de enero de 1997;388(1):85-95.
139. Błasiak J, Jałoszynski P, Trzeciak A, Szyfter K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat Res*. 30 de septiembre de 1999;445(2):275-83.
140. Agopian J, Navarro J-M, Gac A-C, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med*. 6 de julio de 2009;206(7):1473-83.
141. Lu C, Liu X, Liu C, Wang J, Li C, Liu Q, et al. Chlorpyrifos Induces MLL Translocations Through Caspase 3-Dependent Genomic Instability and Topoisomerase II Inhibition in Human Fetal Liver Hematopoietic Stem Cells. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. octubre de 2015;147(2):588-606.
142. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res*. diciembre de 1993;17(12):1045-

50.

143. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1 de octubre de 2012;122(10):3407-15.

144. Libura J, Ward M, Solecka J, Richardson C. Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential. *Eur J Haematol.* septiembre de 2008;81(3):185-95.

145. Sung PA, Libura J, Richardson C. Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair.* 8 de septiembre de 2006;5(9-10):1109-18.

146. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 de diciembre de 2010;107(50):21719-24.

147. Huh J, Mun YC, Yoo ES, Seong CM, Chung WS. Submicroscopic deletions of immunoglobulin heavy chain gene (IGH) in precursor B lymphoblastic leukemia with IGH rearrangements. *Ann Lab Med.* enero de 2015;35(1):128-31.

148. Hall J.E. *GAC. Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia: Saunders Company; 1996.

149. Garry VF, Nelson RL, Griffith J, Harkins M. Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1990;10(1):21-9.

150. Pluth JM, Nicklas JA, O'Neill JP, Albertini RJ. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res.* 15 de mayo de 1996;56(10):2393-9.

151. Gangemi S, Gofita E, Costa C, Teodoro M, Briguglio G, Nikitovic D, et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *Int J Mol Med.* octubre de 2016;38(4):1012-20.

152. Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology.* 10 de mayo de 2013;307:35-41.

153. Bordoni L, Nasuti C, Mirto M, Caradonna F, Gabbianelli R. Intergenerational Effect of Early Life Exposure to Permethrin: Changes in Global DNA Methylation and in Nurr1 Gene Expression. *Toxics.* 19 de noviembre de 2015;3(4):451-61.

154. Mandarapu R, Prakhya BM. Exposure to cypermethrin and mancozeb alters the expression profile of THBS1, SPP1, FEZ1 and GPNMB in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunotoxicol.* 2016;13(4):463-73.

155. Zhang X, Wallace AD, Du P, Kibbe WA, Jafari N, Xie H, et al. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environ Mol Mutagen.* agosto de 2012;53(7):542-9.

156. Huang Y-CT, Schmitt M, Yang Z, Que LG, Stewart JC, Frampton MW, et al. Gene expression profile in circulating mononuclear cells after exposure to ultrafine carbon particles. *Inhal Toxicol.* agosto de 2010;22(10):835-46.

157. Wens B, De Boever P, Verbeke M, Hollanders K, Schoeters G. Cultured human peripheral blood mononuclear cells alter their gene expression when challenged with endocrine-disrupting chemicals. *Toxicology.* 7 de enero de 2013;303:17-24.

158. Yang JS, Symington S, Clark JM, Park Y. Permethrin, a pyrethroid insecticide, regulates ERK1/2 activation through membrane depolarization-mediated pathway in HepG2 hepatocytes. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* noviembre de 2018;121:387-95.

159. Singh A, Agrahari A, Singh R, Yadav S, Srivastava V, Parmar D. Imprinting of cerebral cytochrome P450s in offsprings prenatally exposed to cypermethrin augments toxicity on

- rechallenge. *Sci Rep* [Internet]. 17 de noviembre de 2016 [citado 10 de junio de 2019];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112598/>
160. Kim J-B, Kim S-J, Kang S-Y, Yi JW, Kim S-M. The large-conductance calcium-activated potassium channel holds the key to the conundrum of familial hypokalemic periodic paralysis. *Korean J Pediatr*. octubre de 2014;57(10):445-50.
161. Prasad DRMM. Reduced Levels of Serum Potassium and Plasma Cholinesterase in Acute Organophosphate Poisoning: Possible Predictive Markers. *Asia Pac J Med Toxicol*. 1 de junio de 2014;3(2):68-72.
162. Xu D, Li S, Lin L, Qi F, Hang X, Sun Y. Gene expression profiling to identify the toxicities and potentially relevant disease outcomes due to endosulfan exposure. *Toxicol Res*. 2016;5(2):621-32.
163. Naughton SX, Terry AV. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*. 01 de 2018;408:101-12.
164. Sieuwerts AM, Gelder MEM, Timmermans M, Trapman AMAC, Garcia RR, Arnold M, et al. How ADAM-9 and ADAM-11 Differentially From Estrogen Receptor Predict Response to Tamoxifen Treatment in Patients with Recurrent Breast Cancer: a Retrospective Study. *Clin Cancer Res*. 15 de octubre de 2005;11(20):7311-21.
165. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. junio de 2015;4(3):215-66.
166. Slotkin TA, Seidler FJ, Fumagalli F. Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environ Health Perspect*. junio de 2007;115(6):909-16.
167. El Hajj N, Dittrich M, Haaf T. Epigenetic dysregulation of protocadherins in human disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;69:172-82.
168. Ray A, Liu J, Ayoubi P, Pope C. DOSE-RELATED GENE EXPRESSION CHANGES IN FOREBRAIN FOLLOWING ACUTE, LOW-LEVEL CHLORPYRIFOS EXPOSURE IN NEONATAL RATS. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 de octubre de 2010;248(2):144-55.
169. Figueroa ME, Chen S-C, Andersson AK, Phillips LA, Li Y, Sotzen J, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1 de julio de 2013;123(7):3099-111.
170. Hsiao P-C, Liu M-C, Chen L-M, Tsai C-Y, Wang Y-T, Chen J, et al. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol*. 29 de febrero de 2008;51(1):27-31.
171. Taghavian F, Vaezi G, Abdollahi M, Malekirad AA. Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides. *Cell J Yakhteh*. 2016;18(1):89-96.
172. Banks CN, Lein PJ. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology*. junio de 2012;33(3):575-84.
173. Hemmati S, Haque T, Gritsman K. Inflammatory Signaling Pathways in Preleukemic and Leukemic Stem Cells. *Front Oncol* [Internet]. 13 de noviembre de 2017 [citado 29 de mayo de 2019];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5693908/>
174. Zhou X, Li Z, Zhou J. Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Exp Hematol*. enero de 2017;45:17-26.
175. Si M, Lang J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J Hematol Oncol* [Internet]. 23 de agosto de 2018 [citado 29 de mayo de 2019];11. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6108115/>
176. Knight T, Irving JAE. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Front Oncol* [Internet]. 24 de junio de 2014 [citado 30 de mayo de 2019];4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4067595/>
177. Nwabo Kamdje AH, Krampera M. Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal microenvironment? *Blood*. 15 de diciembre de 2011;118(25):6506-14.
178. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. enero de 2014;171(1):24-37.
179. Staal FJT, Famili F, Garcia Perez L, Pike-Overzet K. Aberrant Wnt Signaling in Leukemia. *Cancers* [Internet]. 26 de agosto de 2016 [citado 30 de mayo de 2019];8(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040980/>
180. Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. marzo de 2000;14(3):399-402.
181. Bhandari DR, Seo K-W, Roh K-H, Jung J-W, Kang S-K, Kang K-S. REX-1 Expression and p38 MAPK Activation Status Can Determine Proliferation/Differentiation Fates in Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 5 de mayo de 2010 [citado 30 de mayo de 2019];5(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864743/>
182. Kocabas F, Zheng J, Thet S, Copeland NG, Jenkins NA, DeBerardinis RJ, et al. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*. 13 de diciembre de 2012;120(25):4963-72.
183. Soltaninejad K, Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. marzo de 2009;15(3):RA75-90.
184. Sturgill JL, Mathews J, Scherle P, Conrad DH. Glutamate signaling through the Kainate Receptor Enhances Human Immunoglobulin Production. *J Neuroimmunol*. abril de 2011;233(1-2):80-9.
185. Hu H, Takano N, Xiang L, Gilkes DM, Luo W, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors enhance glutamate signaling in cancer cells. *Oncotarget*. 15 de octubre de 2014;5(19):8853-68.
186. Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt Signaling in Hematological Malignancies. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;153:321-41.
187. Dwyer MA, Joseph J, Wade HE, Eaton ML, Kunder RS, Kazmin D, et al. WNT11 expression is induced by ERR α and β -catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. *Cancer Res*. 15 de noviembre de 2010;70(22):9298-308.
188. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. septiembre de 2017;17(9):559-72.
189. Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de octubre de 1991;88(19):8641-5.
190. Dong M, Blobe GC. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood*. 15 de junio de 2006;107(12):4589-96.
191. Seth B, Yadav A, Agarwal S, Tiwari SK, Chaturvedi RK. Inhibition of the transforming growth factor- β /SMAD cascade mitigates the anti-neurogenic effects of the carbamate pesticide carbofuran. *J Biol Chem*. 24 de 2017;292(47):19423-40.
192. Zhang Z, Liu Q, Cai J, Yang J, Shen Q, Xu S. Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus*

carpio L.) leads to oxidative stress and immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* agosto de 2017;67:604-11.

193. Tao Y-F, Fang F, Hu S-Y, Lu J, Cao L, Zhao W-L, et al. Hypermethylation of the GATA binding protein 4 (GATA4) promoter in Chinese pediatric acute myeloid leukemia. *BMC Cancer* [Internet]. 21 de octubre de 2015 [citado 4 de junio de 2019];15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4618362/>

194. Soderlund DM. Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Arch Toxicol.* febrero de 2012;86(2):165-81.

195. Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebr Neurosci*. noviembre de 2005;5(3-4):119-33.

196. Alvarado S, Wyglinski J, Suderman M, Andrews SA, Szyf M. Methylated DNA binding domain protein 2 (MBD2) coordinately silences gene expression through activation of the microRNA hsa-mir-496 promoter in breast cancer cell line. *PloS One.* 2013;8(10):e74009.

197. Sarma SN, Kim Y-J, Ryu J-C. Gene expression profiles of human promyelocytic leukemia cell lines exposed to volatile organic compounds. *Toxicology.* 27 de mayo de 2010;271(3):122-30.

198. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene.* 23 de mayo de 2013;32(21):2601-13.

199. Jeanes A, Gottardi C, Yap A. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* 24 de noviembre de 2008;27(55):6920-9.

200. Liu Y, Qiao Y, Zhang H, Li W, Zheng J. Wnt7a, frequently silenced by CpG methylation, inhibits tumor growth and metastasis via suppressing epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *J Cell Biochem.* 29 de mayo de 2019;

201. Wang X-X, Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Matrix Metalloproteinases and Their Multiple Roles in Alzheimer's Disease [Internet]. *BioMed Research International.* 2014 [citado 5 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/908636/>

202. Hossain MM, Richardson JR. Mechanism of Pyrethroid Pesticide-Induced Apoptosis: Role of Calpain and the ER Stress Pathway. *Toxicol Sci.* agosto de 2011;122(2):512-25.

203. Meijer M, Dingemans MML, van den Berg M, Westerink RHS. Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels as Common Mode of Action for (Mixtures of) Distinct Classes of Insecticides. *Toxicol Sci.* 1 de septiembre de 2014;141(1):103-11.

204. Lin L-I, Lin D-T, Chang C-J, Lee C-Y, Tang J-L, Tien H-F. Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* junio de 2002;117(4):835-41.

205. Salameh A, Lee AK, Cardó-Vila M, Nunes DN, Efstathiou E, Staquicini FI, et al. PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 de julio de 2015;112(27):8403-8.

206. Cilloni D, Carturan S, Bracco E, Campia V, Rosso V, Torti D, et al. Aberrant activation of ROS1 represents a new molecular defect in chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.* mayo de 2013;37(5):520-30.

207. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 1 de agosto de 2016;10:2443-59.

208. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzenburger BC, Khotskaya YB, et al. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* [Internet]. enero de 2017 [citado 5 de junio de 2019];3(1). Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5171696/>
209. Rusiecki JA, Freeman LEB, Bonner MR, Alexander M, Chen L, Andreotti G, et al. High pesticide exposure events and DNA methylation among pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ Mol Mutagen.* enero de 2017;58(1):19-29.
210. Zhu J-K. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu Rev Genet.* 2009;43:143-66.
211. Hyka-Nouspikel N, Lemonidis K, Lu W-T, Nouspikel T. Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation. *Blood.* 9 de junio de 2011;117(23):6277-86.
212. Mansell E, Zareian N, Malouf C, Kapeni C, Brown N, Badie C, et al. DNA damage signalling from the placenta to foetal blood as a potential mechanism for childhood leukaemia initiation. *Sci Rep.* 13 de marzo de 2019;9(1):4370.
213. Oxidative Stress, Bone Marrow Failure, and Genome Instability in Hematopoietic Stem Cells [Internet]. [citado 12 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346841/>
214. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol CB.* 19 de mayo de 2014;24(10):R453-62.
215. Mikhed Y, Görlach A, Knaus UG, Daiber A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol.* 1 de agosto de 2015;5:275-89.
216. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2012 [citado 11 de julio de 2017];2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361160/>
217. Guven C, Sevgiler Y, Taskin E. Pyrethroid Insecticides as the Mitochondrial Dysfunction Inducers. *Mitochondrial Dis* [Internet]. 29 de agosto de 2018 [citado 12 de junio de 2019]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/mitochondrial-diseases/pyrethroid-insecticides-as-the-mitochondrial-dysfunction-inducers>
218. Hossain MM, DiCicco-Bloom E, Richardson JR. Hippocampal ER Stress and Learning Deficits Following Repeated Pyrethroid Exposure. *Toxicol Sci.* enero de 2015;143(1):220-8.
219. Schmitz ML, Shaban MS, Albert BV, Gökçen A, Kracht M. The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF- κ B: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines.* 16 de mayo de 2018;6(2).
220. Betti CJ, Villalobos MJ, Jiang Q, Cline E, Diaz MO, Loredó G, et al. Cleavage of the MLL gene by activators of apoptosis is independent of topoisomerase II activity. *Leukemia.* diciembre de 2005;19(12):2289.
221. Ramming T, Hansen HG, Nagata K, Ellgaard L, Appenzeller-Herzog C. GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med.* 1 de mayo de 2014;70:106-16.
222. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [citado 10 de junio de 2019];2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707389/>
223. Zhao Y, Zhang C, Chen X, Gao C, Ji C, Chen F, et al. Overexpression of NYGGF4 (PID1) induces mitochondrial impairment in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem.* julio de 2010;340(1-2):41-8.
224. Bejarano-García JA, Millán-Uclés Á, Rosado IV, Sánchez-Abarca LI, Caballero-Velázquez T,

- Durán-Galván MJ, et al. Sensitivity of hematopoietic stem cells to mitochondrial dysfunction by *SdhD* gene deletion. *Cell Death Dis.* diciembre de 2016;7(12):e2516.
225. De Zio D, Bordi M, Cecconi F. Oxidative DNA Damage in Neurons: Implication of Ku in Neuronal Homeostasis and Survival. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:1-8.
226. So J-S. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells.* 31 de agosto de 2018;41(8):705-16.
227. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estapé A, Frenette PS. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron.* 22 de abril de 2015;86(2):360-73.
228. Swaminathan S, Klemm L, Park E, Papaemmanuil E, Ford A, Kweon S-M, et al. Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol.* julio de 2015;16(7):766-74.

ANEXO 2. Criterios de análisis de la FISH

- Sondas de ruptura de doble color:

Cuando el gen (*KMT2A*, *IGH*) no presenta alteraciones se observa como una señal verde/naranja o amarilla. Una célula es considerada normal si presenta dos señales amarillas. Por el contrario, cuando existe ruptura del gen la señal naranja y verde se encuentran separadas por un espacio mayor al área que ocupa una señal. Adicionalmente, se pueden detectar otros patrones de señal anormales como cambio en el número de copias o señales sencillas que reflejan ruptura del gen. Se incluyeron células localizadas en zonas de alta eficiencia de hibridación (más de 80%), con morfología adecuada y que no se encontraran sobrelapadas. Se realizó el análisis con filtro de triple banda (DAPI/GREEN/ORANGE) y para confirmar se utilizaron filtros individuales (GREEN y ORANGE). Una señal se consideró separada de otra si entre ellas existía un espacio correspondiente al tamaño de una señal, cuando este espacio fue más pequeño se consideraron como una sola señal. Se registraron todos los tipos de patrones de fluorescencia.

- Sonda de fusión de doble color:

Se consideraron normales aquellas células con dos señes verdes y dos naranjas, que reflejaban dos copias de cada uno de los genes *ETV6* y *RUNX1*. Se registraron todos los cambios numéricos aunque no presentaran fusión, es decir pérdidas y ganancias de señales verdes y naranjas. Se consideró como fusión *ETV6-RUNX1* en aquellas células en donde una señal verde y otra naranja estuvieran en contacto, o que se hubiera generado una señal fusionada amarilla. Se incluyeron células localizadas en zonas de alta eficiencia de hibridación (más de 80%), con morfología adecuada y que no se encontraran sobrelapadas. Se realizó el análisis con filtro de triple banda (DAPI/GREEN/ORANGE) y para confirmar se utilizaron filtros individuales (GREEN y ORANGE).

- Sondas centroméricas:

Se consideraron normales aquellas células con dos señales naranjas, dos verdes y cuatro amarillas, se consideró que todas las señales tuvieran un tamaño similar. Se registraron todas las pérdidas y ganancias de señales verdes, naranjas y amarillas. Se incluyeron células localizadas en zonas de alta eficiencia de hibridación (más de 80%), con morfología adecuada y que no se encontraran sobrelapadas. Se realizó el análisis con filtro de triple banda (DAPI/GREEN/ORANGE) y para confirmar se utilizaron filtros individuales (GREEN y ORANGE).

ANEXO 3 Secuencia de cebadores utilizados para la detección de fusiones por RT PCR anidado

Fusión <i>KMT2A-AFF1</i>		
Cebador	Posición 5´(tamaño)	Secuencia (5´-3)
<i>KMT2A-A</i>	3916 (17)	CCGCCTCAGCCACCTAC
<i>AFF1-B</i>	1714 (20)	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG
<i>KMT2A-C</i>	3936 (18)	AGGACCGCCAAGAAAAGA
<i>AFF1-D</i>	1677 (20)	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG
<i>KMT2A-E5</i>	3793 (18)	AAGCCCGTCGAGGAAAAG

Fusión <i>ETV6-RUNX1</i>		
Cebador	Posición 5´(tamaño)	Secuencia (5´-3)
<i>ETV6-A</i>	845 (20)	TGCACCCTCTGATCCTGAAC
<i>RUNX1-B</i>	611 (19)	AACGCCTCGCTCATCTTGC
<i>ETV6-C</i>	928 (22)	AAGCCCATCAACCTCTCTCATC
<i>RUNX1-D</i>	577 (18)	TGGAAGGCGGCGTGAAGC
<i>ETV6-E5</i>	692 (20)	CGCACCAGGAGAACAACCAC

ANEXO 4 Secuencia de cebadores utilizados para la detección de la fusión IGH-BCL2 por PCR anidado

<i>Fusión IGH-BCL2</i>	
Cebador	Secuencia (5´-3´)
<i>BCL2- A262</i>	AGAAGTGACATCTTCAGCAAATAAAC
<i>IGH-A263</i>	ACCTGAGGAGACGGTGACC
<i>IGH-A263</i>	ACCTGAGGAGACGGTGACC
<i>BCL2-A264</i>	ACATTGATGGAATAACTCTGTGG

ANEXO 5 Secuencia de cebadores utilizados para el análisis de expresión génica por qPCR

GEN	REF	OLIGONUCLEÓTIDO SENTIDO	OLIGONUCLEOTIDO ANTISENTIDO	SONDA
PCDH15	NM_00114 2771	CAGGAGGAATATGGTGAGGTG	CATTCTTTTTCTTGCCCACTCT	#73
PCDH9	NM_02040 3	TGGAACAAATCATTCTAACTGC	TTCATCACTTATTTGGAGACAGC	#48
IL6	NM_00060 00	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	#40
DSP	NM_00441 5	CTTTGCGCCAATTCAATTAAG	CCAGTCCTGAGGTGTATGAGG	#78
LYPD1	NM_14458 6	CGGATTGTTCTTGCTTCCAG	CCGTGCAATTCACAATGAAC	#52

ANEXO 6 Resultados de la prueba de sobre representación del total de genes con expresión alterada en células expuestas a malatión

Prueba de sobre representación de genes con baja expresión por efecto del malatión en BMMCs				
			# genes	Valor de P
Proceso biológico	Proceso de organismo multicelular		110	7.82E-06
	Proceso metabólico de macromoléculas		79	1.56E-05
Función molecular	Actividad de canal de potasio		19	3.53E-04
Clase de proteína	Proteína de unión a RNA		12	1.14E-04
		Valor P	Genes	Función
Función molecular	Actividad de canal de potasio	3.53E-04	<i>KCNK17</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNA1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNA10</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>SGK2</i>	Annexina Calmodulina Serin/treonin proteina cinasa
			<i>KCNA2</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>LRRC52</i>	
			<i>KCNJ15</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNMA1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNS3</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNU1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>WNK3</i>	Serin/treonin proteina cinasa
			<i>KCNG1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNJ6</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
			<i>KCNQ1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
<i>KCNB2</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje			
<i>KCNJ8</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje			
Clase de	Proteína de unión a	1.14E-04	<i>RAVER2</i>	Factor de splicing mRNA

proteína	RNA		<i>SAGE1</i>	RNA helicasa
			<i>MOV10L1</i>	DNA helicasa RNA helicasa Endoribonucleasa Hidrolasa
			<i>RBMXL2</i>	Factor de splicing mRNA
			<i>SERP2</i>	Chaperona Proteína ribosomal
			<i>RBMX1B</i>	Factor de splicing mRNA
			<i>MEIS1</i>	RNA polimerasa Factor de transcripción homeodominio
			<i>POLR2F</i>	RNA polimerasa
			<i>LHX3</i>	Proteína de unión a RNA
			<i>WDR33</i>	Factor de procesamiento de mRNA
			<i>LHX9</i>	Proteína de unión a RNA
			<i>NOM1</i>	Factor de procesamiento de mRNA Nucleasa

Prueba de sobre representación de genes con alta expresión por efecto del malatión en BMCCs			
		# Genes	Valor de P
Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	30	2.51E-14
	Respuesta a factor de necrosis tumoral	15	3.76E-03
	Regulación positiva de cascada ERK1/ERK2	17	7.25E-08
	Regulación positiva de cascada MAPK	19	3.27E-08
	Receptor de factor de crecimiento epidermal	14	1.48E-03
	Vía de señalización mediada por citocinas	35	1.11E-12
	Respuesta a sustancia tóxica	17	7.61E-04
	Regulación de la proliferación celular	17	1.69E-03
	Cascada MAPK	33	3.24E-04
	Adhesión celular	47	4.82E-04
Vías de señalización	Vía de señalización por interleucina	17	7.61E-04
	Señalización CCKCR	39	4.78E-05
	Inflamación mediada por vías de señalización por quimiocinas y citocinas	40	7.19E-05

Función molecular	Actividad citocina	43	5.83E-13
	Unión a factor de crecimiento	12	3.65E-04
Componente celular	Parte del núcleo	21	7.68E-08

		Gen	Función
Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	<i>FIGF</i>	Factor de crecimiento
		<i>CXCL13</i>	Quimiocina
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>CXCL11</i>	Quimiocina
		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>CXCL9</i>	Quimiocina
		<i>IL36G</i>	Citocina
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL14</i>	Quimiocina
		<i>CXCL5</i>	Quimiocina
		<i>CXCL10</i>	Quimiocina
		<i>CXCL16</i>	Quimiocina
		<i>VEGFA</i>	Factor de crecimiento
		<i>IL1B</i>	Citocina
	<i>CXCL2</i>	Quimiocina	
	<i>CCL3</i>	Quimiocina	
	Respuesta a Factor de necrosis tumoral	<i>CCL25</i>	Quimiocina
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
<i>CCL17</i>		Quimiocina	
<i>CCL3L3</i>		Quimiocina	
<i>CCL18</i>		Quimiocina	
<i>CCL22</i>		Quimiocina	
<i>CCL19</i>		Quimiocina	
<i>XCL1</i>		Quimiocina	
<i>CCL2</i>	Quimiocina		
<i>CCL20</i>	Quimiocina		
<i>CCL1</i>	Quimiocina		
<i>CCL14</i>	Quimiocina		
<i>CCL3</i>	Quimiocina		

	ERK1/ERK2	<i>PDGFA</i>	Factor de crecimiento
		<i>CCL25</i>	Quimiocina
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>PDGFB</i>	Factor de crecimiento
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL14</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
	Regulación positiva de cascada MAPK	<i>FGFR3</i>	Factor de crecimiento
		<i>PDGFA</i>	Factor de crecimiento
		<i>CCL25</i>	Quimiocina
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>IL11</i>	Citocina
		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>PDGFB</i>	Factor de crecimiento
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
	<i>CCL14</i>	Quimiocina	
	<i>CCL3</i>	Quimiocina	
	Receptor de Factor Epidermal	<i>RHBDF2</i>	Serin proteasa
		<i>EREG</i>	Factor de crecimiento
		<i>CBLC</i>	Ligasa
		<i>AREG</i>	Factor de crecimiento
		<i>HBEGF</i>	Factor de crecimiento
<i>ERRFI1</i>			
Vía de señalización mediada por Citocinas	<i>CXCL13</i>	Quimiocina	
	<i>TNFSF14</i>	Factor de necrosis tumoral	
	<i>IL1A</i>	Citocina	
	<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral	
	<i>CCL25</i>	Quimiocina	
	<i>CXCL1</i>	Quimiocina	
	<i>TNFSF15</i>	Factor de necrosis tumoral	
	<i>CCL8</i>	Quimiocina	
	<i>CCL13</i>	Quimiocina	
	<i>CCL7</i>	Quimiocina	
	<i>IRAK2</i>	Citocina	
<i>CXCL11</i>	Quimiocina		

		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>IFITM1</i>	Citocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>CXCL9</i>	Quimiocina
		<i>IL36G</i>	Citocina
		<i>OTUD4</i>	Cistein proteasa Unión a ácidos nucleicos
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL14</i>	Quimiocina
		<i>CXCL5</i>	Quimiocina
		<i>CXCL10</i>	Quimiocina
		<i>LTA</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>SH2B2</i>	
		<i>IL1B</i>	Citocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
		<i>PPIF</i>	
	Respuesta a sustancia tóxica	<i>MT1A</i>	Metalotioneína
		<i>MT1E</i>	Metalotioneína
		<i>MT1M</i>	Metalotioneína
		<i>MT1G</i>	Metalotioneína
		<i>MT1F</i>	Metalotioneína
		<i>GPX8</i>	Peroxidasa
		<i>MT1X</i>	Metalotioneína
		<i>MT1M</i>	Metalotioneína
		<i>PRDX4</i>	Peroxidasa
		<i>ADH6</i>	Deshidrogenasa reductasa
		<i>SOD</i>	Oxidoreductasa
		<i>CHRNA5</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
		<i>ACHE</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
		<i>MT1B</i>	Metalotioneína
		<i>MT1HL1</i>	Metalotioneína
		<i>MT1H</i>	Metalotioneína
		<i>MT1L</i>	Metalotioneína
	Regulación de la proliferación celular	<i>FIGF</i>	Factor de crecimiento
		<i>PDGFA</i>	Factor de crecimiento
		<i>EREG</i>	Factor de crecimiento
		<i>CD80</i>	
		<i>REG1A</i>	
		<i>BTG3</i>	
		<i>IL11</i>	
		<i>CCNA1</i>	Activador cinasa
	<i>CD38</i>	Ciclase Glicosidase	

		<i>PDGFB</i>	Factor de crecimiento
		<i>CD274</i>	Ligando de muerte celular programada
		LIF	Citocina
		<i>AREG</i>	Factor de crecimiento
		BCL6B	Miembro B de linfoma de célula B
		<i>HBEGF</i>	Factor de crecimiento
		<i>VEGFA</i>	Factor de crecimiento
		<i>INCA1</i>	
	Cascada MAPK	<i>HEPACAM</i>	Molécula de adhesión celular Proteína cinasa Inmunoglobulina
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>RAPGEF5</i>	Factor de intercambio guanil-nucleotido
		MCF2	Molécula de señalización Proto oncogén
		<i>FGFR3</i>	Factor de crecimiento
		<i>FGF21</i>	Factor de crecimiento
		<i>SLAMF7</i>	Molécula de adhesión celular Proteína cinasa Inmunoglobulina
		<i>CCL25</i>	Quimiocina
		<i>SLAMF1</i>	Molécula de adhesión celular Proteína cinasa Inmunoglobulina
		<i>RIT1</i>	GTPasa
		<i>INHBA</i>	Factor de crecimiento
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>RASGEF1B</i>	Factor de intercambio guanil-nucleótido
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>IL11</i>	Citocina
		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>FGF11</i>	Factor de crecimiento
		<i>RAPGEF3</i>	Factor de intercambio guanil-nucleótido
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>IL36G</i>	Citocina
		<i>SPAG9</i>	Modulador cinasa
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL14</i>	Quimiocina
	Adhesión celular	<i>PARVB</i>	Proteína asociada a actina
		<i>ZAN</i>	Inhibidor de proteasas
		<i>CNTN2</i>	Proteína adaptadora
		<i>L1CAM</i>	
		<i>DSP</i>	Proteína de unión a filamentos intermedios
		<i>ICAM1</i>	
		<i>HEPACAM</i>	Molécula de adhesión celular Proteína cinasa Inmunoglobulina

		<i>TNS1</i>	
		<i>PCDHB11</i>	
		<i>LRRC7</i>	
		<i>ITGB8</i>	Receptor de moléculas de adhesión celular
Vías de señalización	Vía de señalización de interleucinas	<i>IL1A</i>	
		<i>CDKN1A</i>	
		<i>STAT1</i>	Unión a ácidos nucleicos Factor de transcripción
		<i>IL3RA</i>	Citocina Defensa/inmunidad
		<i>IL15RA</i>	Citocina
		<i>IL2RA</i>	Citocina
		<i>AKT3</i>	Anexina Calmodulina Serin treonin proteína cinasa
		<i>STAT4</i>	Unión a ácidos nucleicos Factor de transcripción
		<i>IL11</i>	Citocina
		<i>IL4</i>	Citocina
		<i>ELK1</i>	Unión a ácidos nucleicos Molécula de señalización Factor de transcripción
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>IL6</i>	Citocina
		<i>IL9</i>	Citocina
		<i>MAPK6</i>	Serin treonin proteína cinasa
	Mapa de señalización CCKR	<i>RYR2</i>	Canal iónico dependiente de ligando
		<i>PDE1A</i>	
		<i>SERPINB2</i>	Inhibidor serin proteasa
		<i>PRKD1</i>	Serin treonin proteína cinasa
		<i>CREM</i>	
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>SRC</i>	Tirosina cinasa
		<i>REG1A</i>	
		<i>MMP7</i>	Metaloproteasa
		<i>BIRC3</i>	Inhibidor proteasa
		<i>ELK1</i>	Unión a ácidos nucleicos Molécula de señalización Factor de transcripción
		<i>CD38</i>	Ciclase Glicosidasa
		<i>NR4A1</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>IER3</i>	
		<i>SNAI1</i>	
		<i>PTGS2</i>	Oxigenasa
		<i>HBEGF</i>	Factor de crecimiento
		<i>MMP3</i>	Metaloproteasa
	<i>CXCL2</i>	Quimiocina	
	Inflamación mediada por quimiocinas y citocinas	<i>SOCS6</i>	Modulador cinasa
		<i>PLCE1</i>	Proteína de unión a calcio Factor de intercambio guanil-nucleótido Fosfolipasa Molécula de señalización

		STAT1	Unión a ácidos nucleicos Factor de transcripción
		NFKB1	Factor de transcripción tipo P53 Factor de transcripción con homología Rel
		<i>NFATC1</i>	Factor de transcripción con homología Rel
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>AKT3</i>	Anexina Calmodulina Serin treonin proteína cinasa
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>GNAO1</i>	Proteína G heterotrimérica
		<i>GNAI1</i>	Proteína G heterotrimérica
		<i>PLCB4</i>	Proteína de unión a calcio Factor de intercambio guanil-nucleótido Fosfolipasa Molécula de señalización
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>IL6</i>	Interleucina
		<i>PTGS2</i>	Oxigenasa
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>REL</i>	Factor de transcripción tipo P53 Factor de transcripción con homología Rel
		<i>CCRL2</i>	Quimiocina
		<i>GNG4</i>	Proteína G heterotrimérica
		<i>IFNG</i>	Interferón gamma
		<i>CXCL10</i>	Quimiocina
		<i>LTA</i>	Familia factor de necrosis tumoral
		<i>SOCS6</i>	Modulador cinasa
		<i>MYO3A</i>	
		<i>RGS1</i>	Modulador de proteína G
		<i>CXCL13</i>	Quimiocina
		<i>TNSF14</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CCL25</i>	Quimiocina
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>CSF1</i>	
		<i>TNSF15</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>INHBA</i>	Factor de crecimiento
		<i>OSM</i>	Interleucina
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>CCL7</i>	Quimiocina
		<i>IL11</i>	Interleucina
		<i>NAMPT</i>	Citocina
		<i>CXCL11</i>	Quimiocina
		<i>CCL17</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
Función molecular	Actividad citocina		

		<i>CCL18</i>	Quimiocina
		<i>CCL22</i>	Quimiocina
		<i>CCL19</i>	Quimiocina
		<i>PSPN</i>	Factor neurotrófico
		<i>CCL8</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
		<i>CSF2</i>	Citocina
		<i>GDNF</i>	Factor neurotrófico
		<i>XCL1</i>	Quimiocina
		<i>CXCL9</i>	Quimiocina
		<i>IL36G</i>	Citocina
		LIF	Factor inhibidor de leucemia
		<i>CCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL1</i>	Quimiocina
		<i>CCL14</i>	Quimiocina
		<i>CXCL5</i>	Quimiocina
		<i>CXCL10</i>	Quimiocina
		<i>LTA</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL16</i>	Quimiocina
		<i>IL1B</i>	Citocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
	<i>CCL3</i>	Quimiocina	
	Unión a factor de crecimiento	<i>SPINT3</i>	
		<i>FGFR3</i>	
<i>IL2RA</i>		Receptor de citocina tipo 1	
<i>KDR</i>			
<i>CBLC</i>		Ligasa	
<i>MET</i>			
<i>WFIKKN2</i>			
<i>PDGFRB</i>			
CRLF2		Citocina Defensa/inmunidad	
<i>NGFR</i>		Factor de necrosis tumoral	
<i>PDGFRA</i>		Factor de crecimiento	
<i>FLT1</i>		Factor de crecimiento	
Componente celular	Parte nuclear	<i>FBLL1</i>	Metiltransferasa Ribonucleoproteína
		<i>OAS1</i>	Defensa/inmunidad
		<i>SRSF12</i>	Factor de splicing mRNA
		<i>OASL</i>	Proteína de defensa/inmunidad
		<i>THRB</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc
		<i>CT45A5</i>	Helicasa RNA
		<i>PSME2</i>	
		<i>NR5A2</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc
		<i>HEATR1</i>	Ribonucleoproteína
		NFKB1	Factor de transcripción tipo p53 Factor de transcripción con homología Rel
		<i>NFATC1</i>	Factor de transcripción con homología Rel
		<i>OAS3</i>	Defensa/inmunidad Unión a ácidos nucleicos
		<i>KANSL1L</i>	
		<i>OAS2</i>	Defensa/inmunidad Unión a ácidos nucleicos

	<i>HSPA1B</i>	
	NBN	Proteína de unión a DNA dañado
	<i>REL</i>	Factor de transcripción tipo P53 Factor de transcripción con homología Rel
	<i>TAF4B</i>	
	<i>UBD</i>	
	<i>RPF1</i>	Ribonucleoproteína
	<i>RBMX2</i>	

Prueba de sobre representación de genes con baja expresión por efecto del malatión en PBMCs				
		# genes	Valor de P	
Función molecular	Unión a ácidos nucleicos	27	9.59E-05	
Componente celular	Núcleo	33	4.32E-07	
Clase de Proteína	Unión a ácidos nucleicos	24	3.47E-05	
Función molecular	Unión a ácidos nucleicos	Valor P	Genes	Función
		9.50 E-04	<i>PNLDC1</i>	Factor de poliadenilación de mRNA
			<i>ATOH1</i>	Nucleasa Factor de transcripción base hélice-loop-hélice
			<i>MARVELD2</i>	Tight junction Cofactor de transcripción
			<i>BICC1</i>	Proteína de unión a RNA Apolipoproteína
			<i>RBFOX1</i>	Proteína de unión a RNA
			<i>APOBEC3A</i>	Deaminasa Unión a ácidos nucleicos
			<i>TFCP2L1</i>	Factor de transcripción
			<i>EN1</i>	Proteína de unión a DNA Factor de transcripción homeodominio
			<i>MCMDC2</i>	DNA helicasa Hidrolasa
			<i>HIST1H4G</i>	Histona
			<i>DLX1</i>	Proteína de unión a DNA Factor de transcripción homeodominio
			<i>ESR2</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc Unión a ácidos nucleicos Receptor
			<i>ZNF711</i>	
			<i>MSH4</i>	Proteína de unión a DNA
			<i>HNF4G</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc Unión a ácidos nucleicos Receptor
			<i>DEC1</i>	Factor de transcripción básico hélice-loop-hélice
			<i>RBMY1B</i>	Factor de splicing mRNA
			<i>TAF1B</i>	

			<i>SRRM3</i>	
			<i>RFX4</i>	Factor de transcripción winged helix/forkhead
			<i>NFATC4</i>	Factor de transcripción Rel homology
			<i>GATA4</i>	Factor de transcripción
			<i>TFAP2D</i>	Factor de transcripción
			<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción
			<i>NR1I3</i>	Receptor nuclear C4 dedos de zinc Unión a ácidos nucleicos Receptor
			<i>TAL1</i>	Factor de transcripción básico hélice-loop- hélice Unión a ácidos nucleicos
			<i>ZFP42</i>	Factor de transcripción C2H2 dedos de zinc

Prueba de sobre representación de genes con alta expresión por efecto del malatión en PBMCs			
		# genes	Valor de P
Proceso Biológico	Regulación de transmisión sináptica, glutamatergica Señalización sináptica	22	3.04E-04
	Señalización célula-célula	35	3.61E-04
Componente celular	Parte de neurona	28	2.29E-05
	Complejo receptor glutamato ionotrópico		

		Valor de P	Gen	Función
Proceso Biológico	Señalización sináptica	3.04E-04	<i>NLGN4X</i>	
			<i>CACNB4</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje
			<i>GABRA3</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
			<i>CDHR3</i>	
			<i>STX19</i>	Proteína SNARE
			<i>SYN2</i>	Proteína regulatoria de tráfico de membrana
			<i>NPS</i>	
			<i>HTR3C</i>	Receptor GANA Receptor acetilcolina
			<i>GRM2</i>	Receptor acoplado a proteína G
			<i>GABRQ</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
			<i>SHISA9</i>	
			<i>GRIK2</i>	
			<i>CACNB2</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje
			<i>SCN9A</i>	Canal de sodio dependiente de voltaje Canal de calcio dependiente de voltaje

			<i>GABRG3</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina	
			<i>GRIK2</i>		
			<i>DLG2</i>	Receptor regulatorio transmembranal	
			<i>SHANK2</i>		
			<i>GRM7</i>	Receptor acoplado a proteína G	
			<i>NLGN3</i>		
			<i>GRM3</i>	Receptor acoplado a proteína G	
			<i>GLRA4</i>	Receptor GANA Receptor acetilcolina	
			3.61E-06	<i>FGF2</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos
				<i>STX19</i>	Proteína SNARE
				<i>TCF7L1</i>	Factor de transcripción
				<i>SYN2</i>	Proteína regulatoria de tráfico de membrana
				<i>FZD10</i>	Receptor acoplado a proteína G Inhibidor de proteasa Molécula de señalización
				<i>NPS</i>	
				<i>HTR3C</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
				<i>GRM2</i>	Receptor acoplado a proteína G
				<i>GABRQ</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
				<i>SHISA9</i>	
				<i>FZD7</i>	Receptor acoplado a proteína G Inhibidor de proteasa Molécula de señalización
				<i>NLGN4X</i>	
				<i>CACNB4</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje
				<i>DACT2</i>	
				<i>GABRA3</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
				<i>AMER3</i>	
				<i>CDHR3</i>	
				<i>WNT1</i>	Molécula de señalización
				<i>ZNRF3</i>	
				<i>DLG2</i>	Proteína regulatoria de receptor transmembranal
<i>SHANK2</i>					
<i>DKK2</i>					
<i>NID1</i>					
<i>GRIK2</i>					
<i>FGF17</i>	Factor de crecimiento de fibroblasots				
<i>CACNB2</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje				
<i>SCN9A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje				
<i>GABRG3</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina				
<i>WNT11</i>	Molécula de señalización				
<i>GRIK2</i>					

ANEXO 7 Resultados de la prueba de sobre representación del total de genes con expresión alterada en células expuestas a permetrina

Prueba de sobre representación de genes con baja expresión por efecto de la permetrina en BMMCs			
		#genes	Valor de p
Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	13	7.17E-06
	Vía de señalización mediada por citocinas	17	7.99E-06
	Respuesta a citocinas	18	1.64E-05
Función molecular	Actividad citocina	22	2.11E-06
	Unión a enzimas	5	1.87E-06
Clase de proteína	Quimiocina	10	1.84E-04
	Citocina	16	1.51E-04
	Canal iónico	22	2.14E-02

Proceso biológico	Quimiotaxis de leucocitos	<i>CCL11</i>	Quimiocina
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>CXCL6</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>CCL21</i>	Quimiocina
		<i>IL36RN</i>	Citocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>IL36RN</i>	Citocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>IL1B</i>	Citocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
	<i>CCL3</i>	Quimiocina	
	Vía de señalización mediada por citocinas	<i>CCL11</i>	Quimiocina
		<i>IFNA21</i>	Citocina
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>TNFSF15</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL6</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
<i>CXCL3</i>		Quimiocina	
<i>IFNA7</i>	Citocina		
<i>CCL21</i>	Quimiocina		

		<i>IL36RN</i>	Citocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>IL1B</i>	Citocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
	Respuesta a citocinas	<i>CCL11</i>	Quimiocina
		<i>IFNA21</i>	Citocina
		<i>IL1A</i>	Citocina
		<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>TNFSF15</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL6</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>IFNA7</i>	Citocina
		<i>CCL21</i>	Quimiocina
		<i>IL36RN</i>	Citocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>JUN</i>	Factor de transcripción zipper de leucina
		<i>IL1B</i>	Citocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
		Función molecular	Actividad citocina
<i>IFNA21</i>	Citocina		
<i>IL1A</i>	Citocina		
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral		
<i>CXCL1</i>	Quimiocina		
<i>TNFSF15</i>	Factor de necrosis tumoral		
<i>OSM</i>	Familia interleucinas		
<i>IL31</i>	Citocina		
<i>TGFB2</i>	Factor de crecimiento		
<i>NAMPT</i>	Citocina		
<i>CXCL6</i>	Quimiocina		
<i>A2ML1</i>	Componente del complemento Citocina Inhibidor serin proteasa		
<i>CCL3L3</i>	Quimiocina		
<i>CXCL8</i>	Quimiocina		
<i>CXCL3</i>	Quimiocina		
<i>IFNA7</i>	Citocina		
<i>CCL21</i>	Quimiocina		
<i>IL36RN</i>	Citocina		
<i>CCL20</i>	Quimiocina		
<i>IL1B</i>	Citocina		
<i>CXCL2</i>	Quimiocina		
<i>CCL3</i>	Quimiocina		
Unión a enzimas	<i>AKAP5</i>		
	<i>CARD8</i>		
	<i>SH3RF2</i>		
	<i>PRDM12</i>		
	<i>RIMS2</i>	Modulador de proteína G	
Clase de	Quimiocina	<i>CCL11</i>	Quimiocina

proteína			
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>CXCL6</i>	Quimiocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>CCL21</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
		<i>CXCL2</i>	Quimiocina
		<i>CCL3</i>	Quimiocina
	Citocina	<i>CCL11</i>	Quimiocina
		<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>CXCL1</i>	Quimiocina
		<i>TNFSF15</i>	Factor de necrosis tumoral
		<i>OSM</i>	Interleucina
		<i>NAMPT</i>	Citocina
		<i>CXCL6</i>	Quimiocina
		<i>A2ML1</i>	Componente del complemento Citocina
		<i>CCL3L3</i>	Quimiocina
		<i>CXCL8</i>	Quimiocina
		<i>CXCL3</i>	Quimiocina
		<i>LEPR</i>	Citocina Defensa/inmunidad
		<i>CCL21</i>	Quimiocina
		<i>CCL20</i>	Quimiocina
	<i>CXCL2</i>	Quimiocina	
	<i>CCL3</i>	Quimiocina	
	Canal iónico	<i>FXVD3</i>	Modulador de enzimas Canal iónico
		<i>TRPM1</i>	Canal iónico Receptor
		<i>SCN2A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>TRPM3</i>	Canal iónico Receptor
		<i>SCNN1A</i>	Canal iónico
		<i>TRPM8</i>	Canal iónico Receptor
		<i>ATP2B3</i>	Transportador catiónico Hidrolasa Canal iónico
		<i>HTR3C</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina
<i>CHRNA9</i>		Receptor GABA Receptor acetilcolina	
<i>PKD1L3</i>		Modulador de proteína G Canal iónico Molécula de señalización unida a membrana	
<i>ATP2B2</i>	Transportador de cationes Hidrolasa Canal iónico		
<i>CHRNA3</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina		
<i>SCN3B</i>	Canal de sodio dependiente de voltaje		

		<i>CLCA4</i>	Canal iónico Metaloproteasa
		<i>SCN9A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>SCNBA</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>ATP4A</i>	Transportador de cationes Hidrolasa Canal iónico
		<i>TRPC4</i>	Canal iónico
		<i>SCN7A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>TRPV3</i>	Canal iónico
		<i>ATP2B2</i>	Transportador de cationes Hidrolasa Canal iónico
		<i>HTR3B</i>	Receptor GABA Receptor acetilcolina

Prueba de sobre representación de genes con sobreexpresión por efecto de la permetrina en BMMCs			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Vía del receptor ionotrópico glutamato	13	4.06E-05
Función molecular	Receptor con señalización transmembranal	80	4.09E-06

Vías de señalización	Vía del receptor ionotrópico glutamato	<i>GRIN2D</i>	
		<i>GRM2</i>	Receptor acoplado a proteína G
		<i>GRIN1</i>	
		<i>GRIK2</i>	
		<i>SHANK2</i>	
Función molecular	Receptor de señalización transmembranal	<i>OR52K1</i>	
		<i>CCL13</i>	Quimiocina
		<i>GRM2</i>	Receptor acoplado a proteína G
		<i>OR51B5</i>	
		<i>OR111</i>	
		<i>OR511</i>	
		<i>GPR112</i>	Receptor acoplado a proteína G Proteasa
		<i>OPRD1</i>	Receptor acoplado a proteína G
		<i>PTCH1</i>	
		<i>CGB2</i>	Peptido hormona
		<i>TAS2R8</i>	
		<i>PREX2</i>	Factor de intercambio guanil-nucleótido
		<i>OR1L3</i>	

		<i>GNG12</i>	Proteína G heterotrimérica
		<i>AVPR2</i>	Receptor acoplado a proteína G
		<i>OR56A4</i>	
		<i>IL22RA2</i>	Defensa/inmunidad Receptor citocina tipo I Receptor citocina tipo II

Prueba de sobre representación de genes con baja expresión por efecto de la permetrina en PBMCs			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Señalización por cadherinas	15	1.50E-04
	Vía Alzheimer-presenilina	19	7.59E-05
Componente celular	Complejo canal catiónico	10	8.44E-04

Vías de señalización	Vía de señalización de cadherinas	<i>PCDH9</i>	Protocadherina
		<i>PCDH15</i>	Protocadherina
		<i>PCHD12</i>	Protocadherina
		<i>WNT2</i>	Molécula de señalización
		<i>CDH19</i>	Cadherina
		<i>PCDHA6</i>	Protocadherina
		<i>WNT4</i>	Molécula de señalización
		<i>PCDH11Y</i>	Protocadherina
		<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción
		<i>CDH19</i>	Cadherina
		<i>PCDHGA5</i>	Protocadherina
		<i>WNT7A</i>	Molécula de señalización
		<i>PCDH7</i>	Protocadherina
		<i>PCDHA13</i>	Protocadherina
		<i>ACTG2</i>	Actina
	Alzheimer	<i>LDLRAD1</i>	
		<i>ACTG2</i>	Actina
		<i>MMP12</i>	Metaloproteasa
		<i>WNT2</i>	Molécula de señalización
		<i>WNT4</i>	Molécula de señalización
		<i>LRP3</i>	
		<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción
		<i>RBPJL</i>	Factor de transcripción
<i>WNT7A</i>		Molécula de señalización	
<i>MMP2</i>		Metaloproteasa	
<i>MMP13</i>	Metaloproteasa		
Componente celular	Complejo canal catiónico	<i>SCN1A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>KCNC2</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
		<i>KCNS2</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje

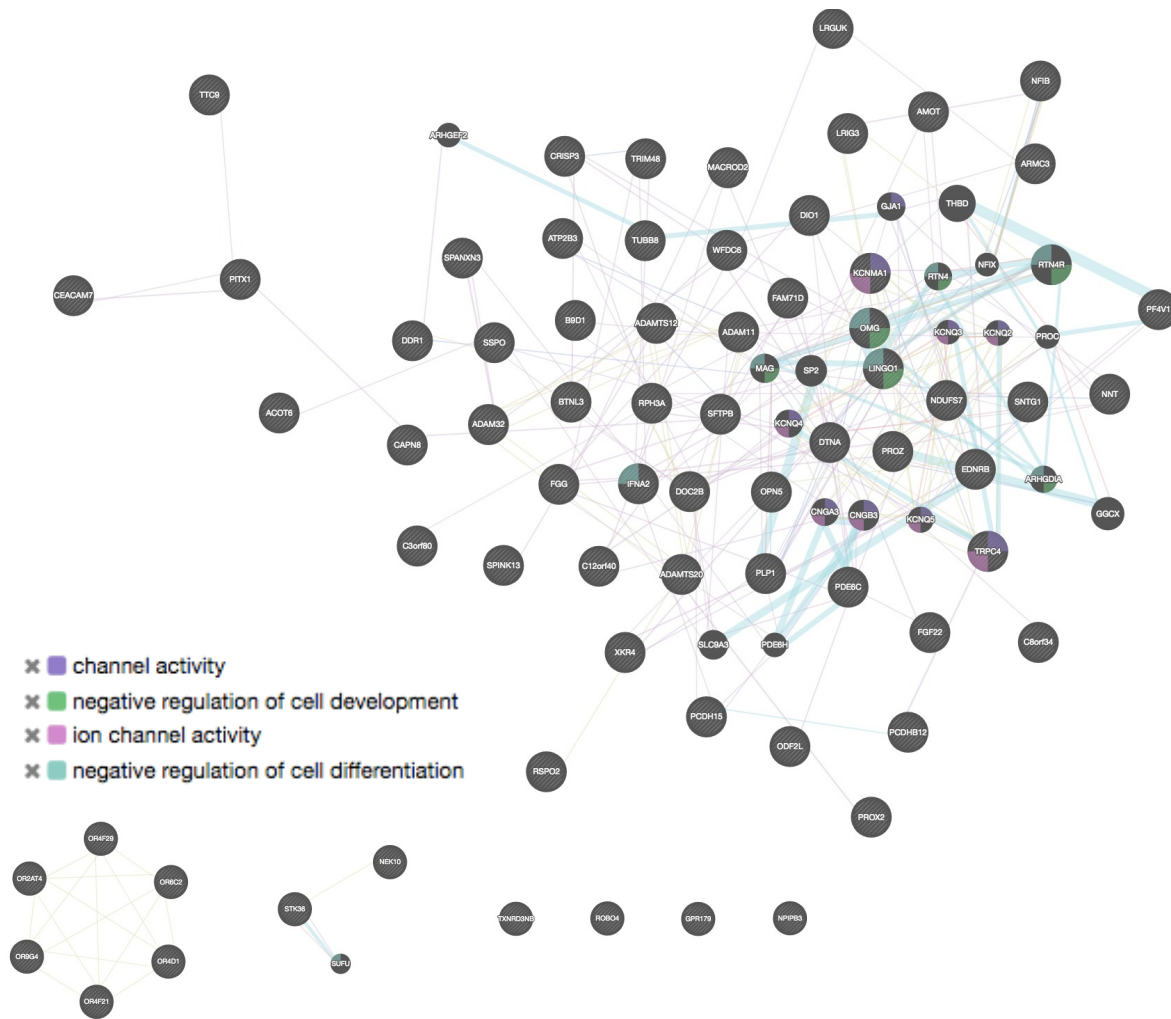
		<i>GRIK2</i>	Receptor glutamato
		<i>SCN8A</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje Canal de calcio dependiente de voltaje
		<i>KCNV1</i>	
		<i>SCN7A</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje Canal de calcio dependiente de voltaje
		<i>GRIA4</i>	
		<i>KCNB2</i>	

Prueba de sobre representación de genes con alta expresión por efecto de la permetrina en PBMCs			
		#genes	Valor de p
Vías de señalización	Síntesis de vasopresina	7	2.49E-05
Función molecular	Receptor con actividad tirosina cinsasa	9	1.66E-04
	Unión a RNA	3	1.44E-04
Componente celular	Complejo canal iónico	11	6.33E-04
	Núcleo	33	1.76E-05

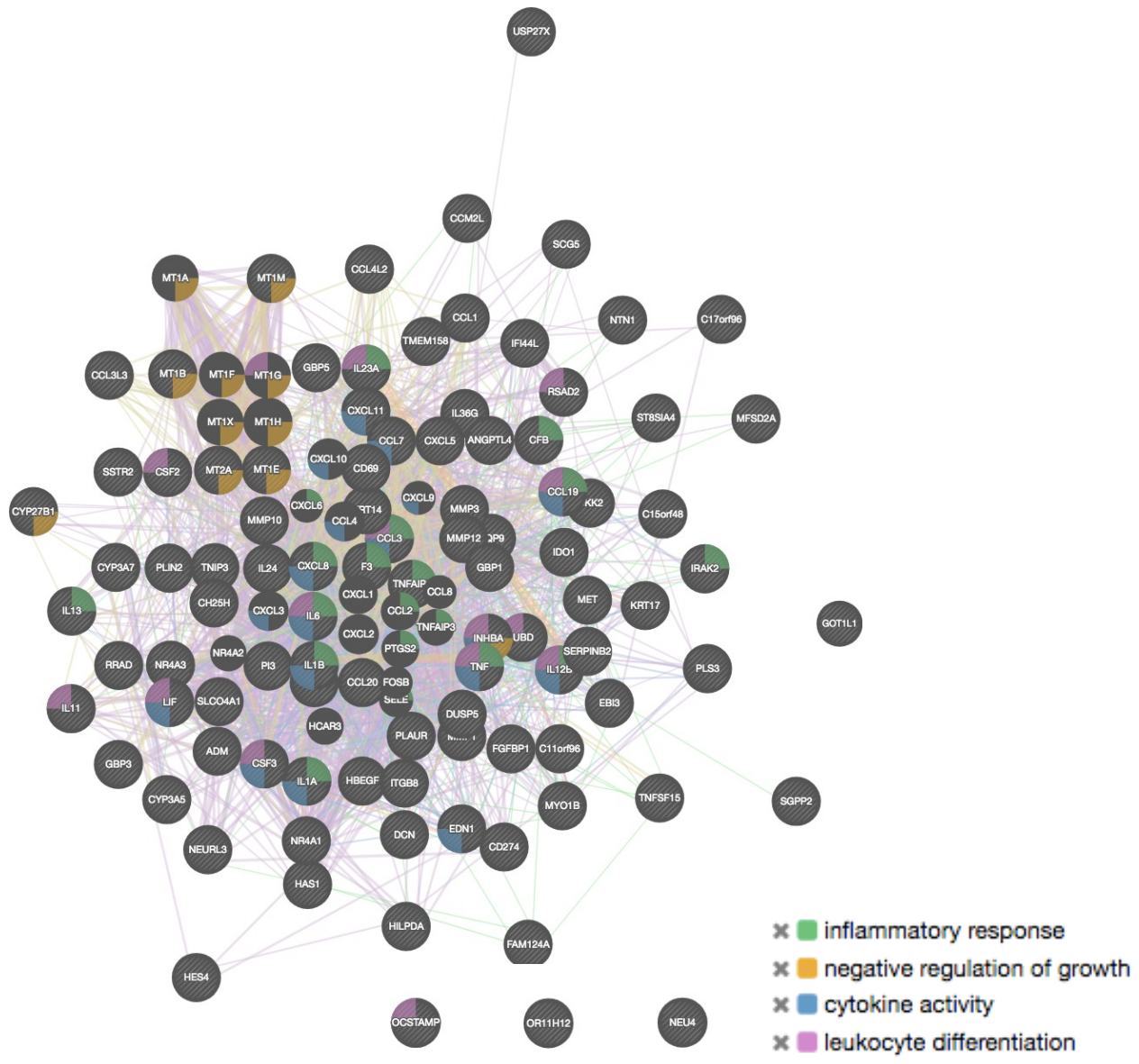
Vías de señalización	Síntesis de vasopresina	<i>NEU2</i>	Neuropeptido
Función molecular	Proteína tirosina cinasa	<i>EPHA7</i>	Receptor efrina
		<i>EPHA10</i>	Receptor efrina
		<i>RET</i>	Proto oncogén
		<i>EPHA3</i>	
		<i>KIT</i>	Factor de crecimiento de células troncales
		<i>ROS1</i>	Proto oncogen Receptor irosina cinasa
		<i>EPHA6</i>	Efrina
		<i>PDGFRA</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
		<i>ALK</i>	Receptor tirosina cinasa
	Unión a RNA	<i>PABPC5</i>	
		<i>RALYL</i>	
		<i>ZGRF1</i>	DNA helicasa RNA helicasa Endoribonucleasa hidrolasa
Componente celular	Complejo canal iónico	<i>SCN5A</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje Canal de sodio dependiente de voltaje
		<i>GRIA3</i>	Receptor glutamato
		<i>KCNG3</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
		<i>KCNE4</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje

		<i>KCNG3</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
		<i>KCNB1</i>	Canal de potasio dependiente de voltaje
		<i>SMDT1</i>	
		<i>KCND3</i>	
		<i>GRIA1</i>	
		<i>KCNA5</i>	
		<i>SCN9A</i>	

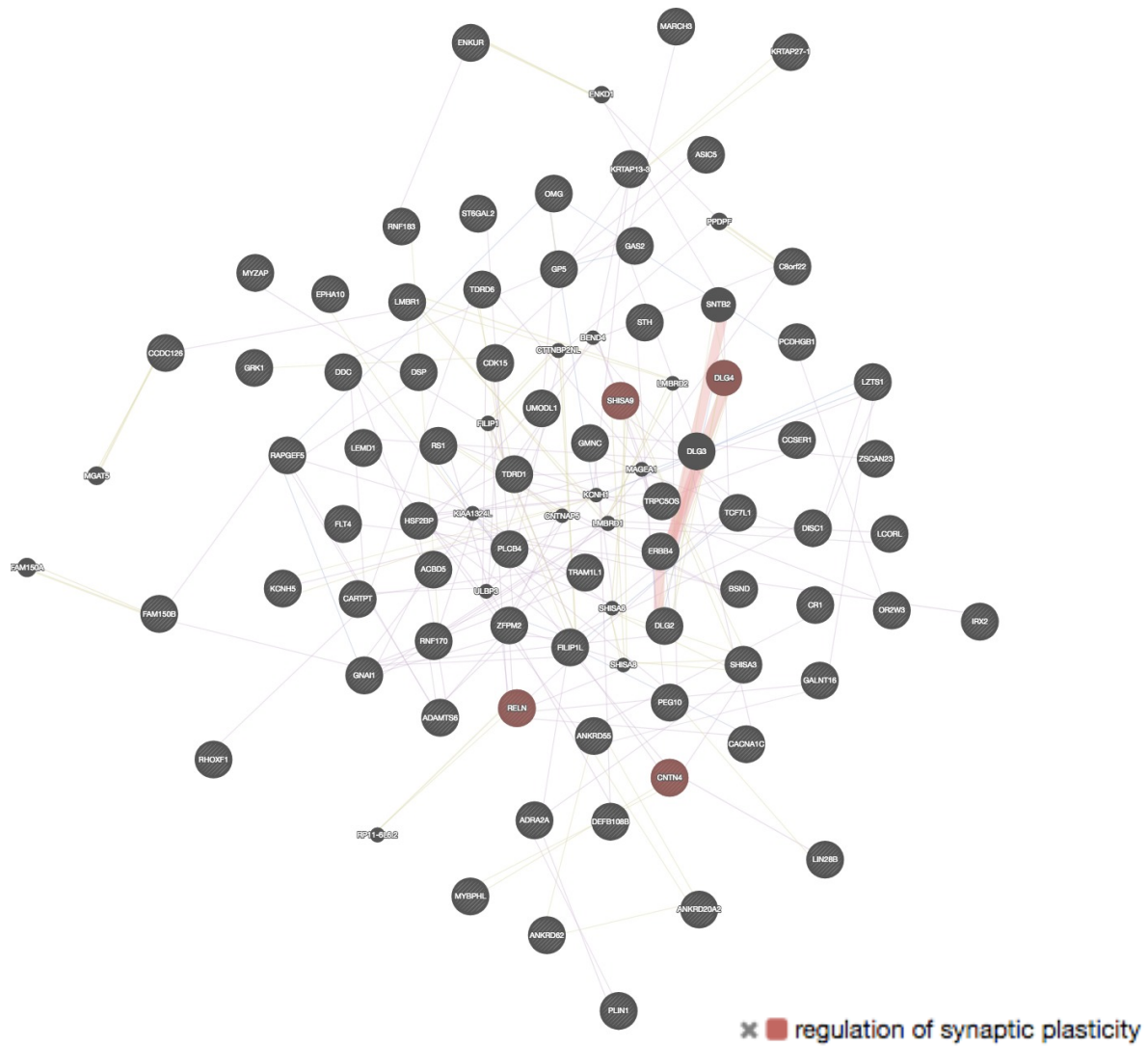
ANEXO 8 Análisis con Genemania



Análisis de interacciones de genes reprimidos por efecto del malatión en BMMCs

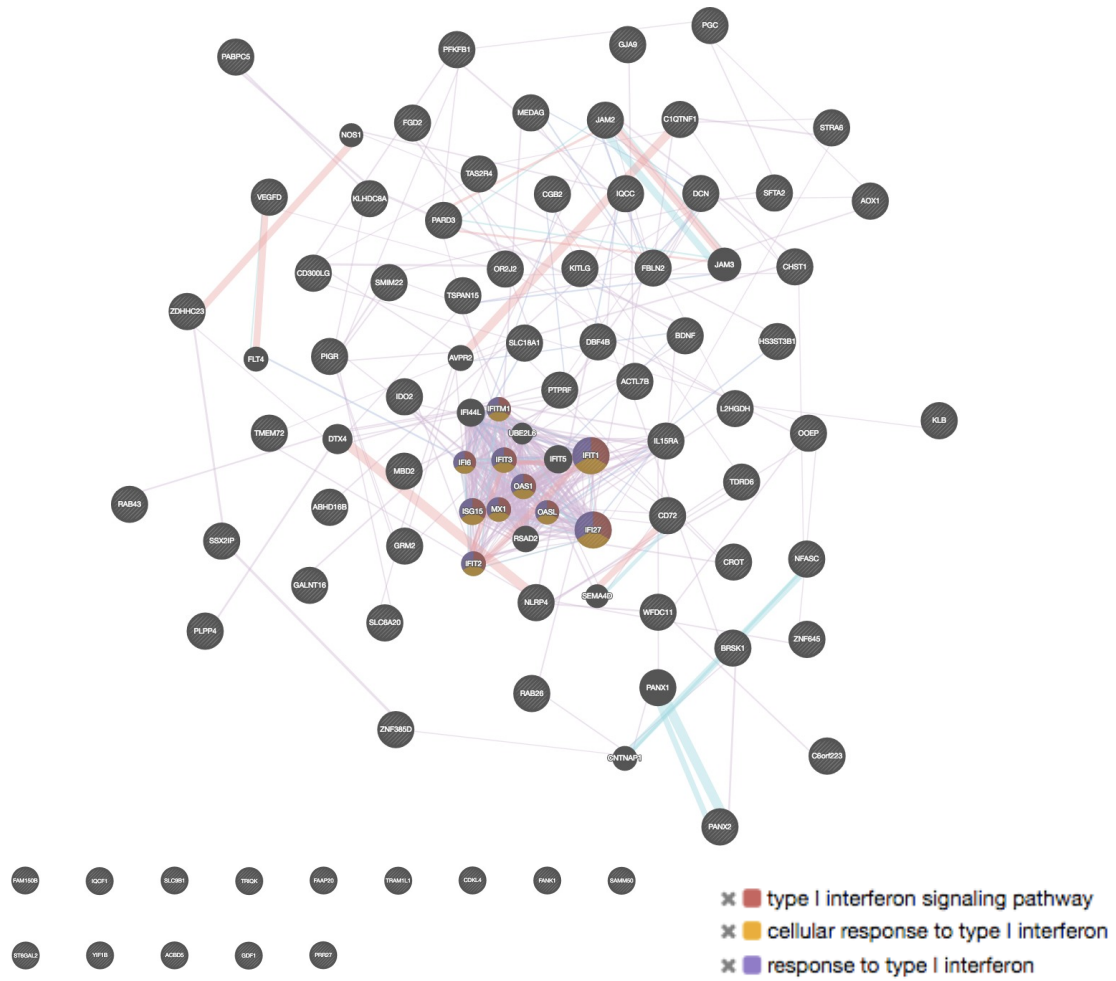


Análisis de interacciones de genes sobreexpresados por efecto del malatión en BMMCs

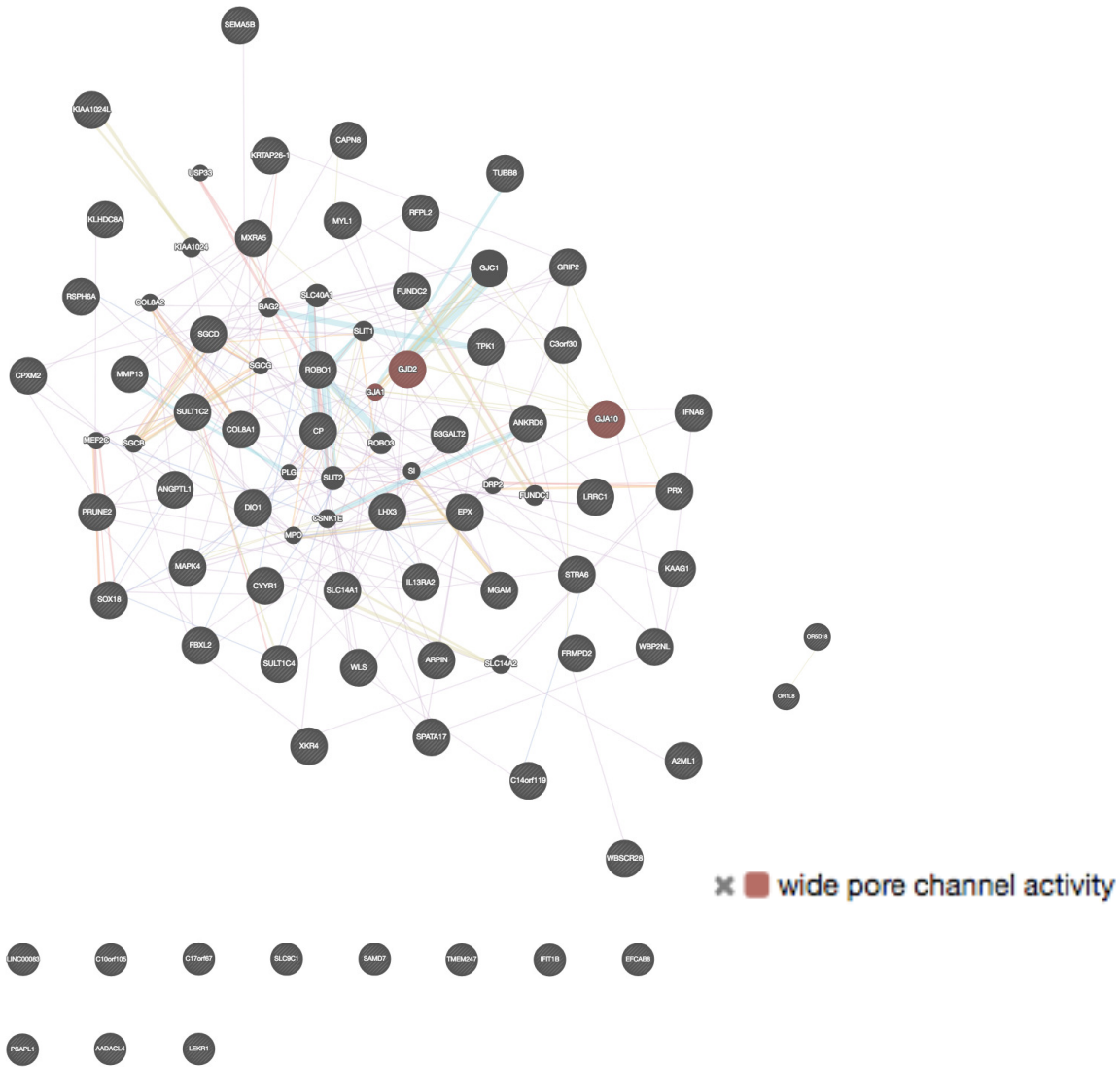


EPCAB9
 CLDN17
 USP2
 SPDYA
 TMEM69
 CCDC128

Análisis de interacciones de genes sobreexpresados por efecto del malatión en PBMCs



Análisis de interacciones de genes sobreexpresados por efecto de la permetrina en BMMCs



Análisis de interacciones de genes reprimidos por efecto de la permetrina en PBMCs

ANEXO 9. Lista de genes en los que se realizó análisis de metilación

Genes con baja expresión en BMMCs expuestos a malatión	Genes con alta expresión en BMMCs expuestos a malatión	Genes con baja expresión en BMMCs expuestos a permetrina	Genes con alta expresión en BMMCs expuestos a permetrina
<i>NFIB</i>	<i>F3</i>	<i>ADAM30</i>	<i>ST6GAL2</i>
<i>ADAM32</i>	<i>IDO1</i>	<i>PCDH9</i>	<i>MBD2</i>
<i>FGF22</i>	<i>IRAK2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KITLG</i>
<i>KCNMA1</i>	<i>SLCO4A1</i>	<i>ABCC9</i>	<i>FIGF</i>
<i>ADAMTS20</i>	<i>DUSP5</i>	<i>ANKRD31</i>	<i>IL15RA</i>
<i>AMOT</i>	<i>PLAUR</i>	<i>PDGFD</i>	<i>BDNF</i>
<i>TRPM6</i>	<i>TFPI2</i>	<i>TRPM8</i>	<i>SLC6A20</i>
<i>STK36</i>	<i>IL15RA</i>	<i>GATA4</i>	<i>GDF1</i>
<i>RSPO2</i>	<i>MYO1B</i>	<i>SCN9A</i>	<i>KLB</i>
<i>EDNRB</i>	<i>INHBA</i>	<i>AJAP1</i>	<i>PANX2</i>
<i>TUBB8</i>	<i>HES4</i>	<i>TBX15</i>	<i>JAM2</i>
<i>ADAM11</i>	<i>EDN1</i>	<i>USP29</i>	<i>PARD3</i>
<i>PITX1</i>	<i>LIF</i>	<i>LMOD1</i>	<i>MAPK</i>
<i>LINGO1</i>	<i>CSF2</i>	<i>MAPRE3</i>	<i>IFI27</i>
<i>LRIG3</i>	<i>NR4A3</i>	<i>TBX15</i>	<i>FBLN2</i>
<i>DDR1</i>	<i>NR4A1</i>	<i>RBMXL2</i>	<i>TDRD6</i>
<i>PROZ</i>	<i>CCL19</i>	<i>FGFR2</i>	
	<i>ADM</i>	<i>MAPRE3</i>	
	<i>ANGPTL4</i>	<i>GATA4</i>	
	<i>MET</i>	<i>LMOD1</i>	
	<i>ITGB8</i>	<i>ADAM30</i>	
		<i>PROZ</i>	
		<i>DCHS2</i>	
		<i>EDNRB</i>	



“Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations *in vitro*”



M.P. Navarrete-Meneses^{a,b}, C. Salas-Labadía^a, M. Sanabrais-Jiménez^a, J. Santana-Hernández^a, A. Serrano-Cuevas^a, R. Juárez-Velázquez^a, A. Olaya-Vargas^c, P. Pérez-Vera^{a,*}

^a Laboratorio de Genética y Cáncer, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 Letra C. Delegación Coyoacán, CP 04530 Ciudad de México, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico

^c Unidad de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 Letra C. Delegación Coyoacán, CP 04530 Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Permethrin
Malathion
MLL
KMT2A
IGH
Insecticides

ABSTRACT

Epidemiological studies have associated the exposure to permethrin and malathion with increased risk of leukemia and lymphoma. The aim of this study was to evaluate whether *in vitro* exposure to permethrin and malathion induces aberrations in genes involved in the etiology of these hematological malignancies. Genetic abnormalities in the *IGH*, *KMT2A* (*MLL*), *ETV6* and *RUNX1* genes, and aneuploidy induced by the *in vitro* exposure to permethrin and malathion (200 μ M, 24 h), were analyzed by FISH in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The gene fusions *IGH-BCL2*, *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* were further analyzed with nested RT-PCR in PBMCs, and in K562 cells exposed to acute and chronic treatments (0.1 μ M, 24 h or every third day for two weeks) of insecticides. FISH analysis revealed that permethrin induces aneuploidy and structural alterations in *IGH* and *KMT2A* genes, and malathion induces breaks in *KMT2A*. RT-PCR detected *ETV6-RUNX1* fusion in PBMCs acutely exposed to permethrin. Permethrin also induced *ETV6-RUNX1* and *IGH-BCL2* fusions in K562 cells, and malathion induced *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* fusions. Overall, we identified that both insecticides induce breaks and fusions in the studied genes, and permethrin induces aneuploidy. This study presents evidence of damage in cancer genes caused by these insecticides.

1. Introduction

Each year, thousands of tons of insecticides are produced and used in numerous human activities worldwide [Matthews, 2008; Ding et al., 2012]. Several types of insecticides are essential for agriculture and are applied to a large number of different crops [Agopian et al., 2009]. In addition, insecticides such as pyrethroids and organophosphates are commonly used in household products [Menegaux et al., 2006; Ding et al., 2012; Lu et al., 2015]. These insecticides are also important for public health, given that they are used to control several vector-borne diseases, and are also applied directly to children to control head lice [Menegaux et al., 2006; Roberts et al., 2012].

Permethrin and malathion are among the most commonly used insecticides, and almost any individual may be exposed to these compounds through different routes [Quirós-Alcalá et al., 2011; Morgan, 2012; Ferland et al., 2015]. Permethrin is a pyrethroid, and malathion belongs to the organophosphate insecticide family [Krieger, 2010]. These insecticides became extensively used because they are considered

to have low toxicity to humans compared to other insecticides (e.g., organochlorines) [Matthews, 2008]. The main pathways of exposure in humans include dermal, inhalation and oral routes [Morgan, 2012]. Occupational and non-occupational exposures to these insecticides have been reported in adults and children [Barr et al., 2010; Egeghy et al., 2011; Ding et al., 2012; Morgan, 2012; Ferland et al., 2015]. Because almost any individual can be exposed to these insecticides, there is concern regarding the potential adverse effects of these agents.

Epidemiological studies suggest that pyrethroids and organophosphates may be associated with hematological cancer [Turner et al., 2011; Alavanja and Bonner, 2012; Ding et al., 2012; Schinasi and Leon, 2014]. Permethrin has been associated with an increased risk of leukemia in children [Menegaux et al., 2006; Ding et al., 2012; Hernández and Menéndez, 2016]. Higher levels of pyrethroid metabolites were detected in childhood leukemia patients compared to controls [Ding et al., 2012]. Furthermore, *in utero* environmental exposures to insecticides have been associated with the development of childhood leukemia [Armstrong and Look, 2005; Roberts et al., 2012], and traces

* Corresponding author at: Laboratorio de Genética y Cáncer, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, C.P. 04530, Ciudad de México, Mexico.
E-mail addresses: pperezvera@yahoo.com, pperezv@pediatria.gob.mx (P. Pérez-Vera).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.013>

Received 17 April 2017; Received in revised form 5 June 2017; Accepted 13 June 2017
Available online 15 June 2017

0887-2333/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

of several insecticides have been detected in the blood, urine and hair of pregnant women [Berkowitz et al., 2003; Berman et al., 2011; Watkins et al., 2016]. Regarding adults, permethrin has been associated to multiple myeloma risk [Alavanja et al., 2014; Rusiecki et al., 2009], and malathion has been related to lymphoma risk in case-control studies [McDuffie et al., 2001]. However, the associations of malathion with lymphoma have not been replicated in longitudinal studies [Alavanja et al., 2014]. Epidemiological studies have limitations because they are often questionnaire-based, making it difficult to accurately determine the time and level of exposure as well as the insecticide or combination of insecticides used [Turner et al., 2011; Ding et al., 2012; Deziel et al., 2015; Hernández and Menéndez, 2016]. Furthermore, there is limited biological evidence supporting the epidemiological associations [Fusco et al., 1996; Lafura et al., 2007].

Biological studies demonstrating that permethrin and malathion have the potential to induce breakages in cancer-associated genes are of great importance. These studies would help to understand the possible relationship of these insecticides with leukemia and lymphoma.

The genotoxicity of permethrin and malathion has been studied, and it is suggested that these chemicals induce DNA breaks (comet assay), micronuclei, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges. However, opposing results have been found in some cases, making the conclusions controversial, and therefore more investigations are needed [Titenko-Holland et al., 1997; Garry et al., 1990; Błasiak et al., 1999; Surrallés et al., 1995; Herrera et al., 1992; Barrueco et al., 1994; Turkez and Aydin, 2012; Ramos-Chavez et al., 2015]. Furthermore, most of these studies analyze the global damage in the DNA or at chromosome level. However, there are scarce studies assessing the potential of these insecticides to induce breakages or rearrangements in the specific genes involved in the alterations relevant in the development of leukemia and lymphoma.

Although the etiology of leukemia has not been completely elucidated, it is known that certain driver mutations potentially transform normal cells into leukemic cells [Pui, 2009]. The most common abnormalities in leukemia include numerical (aneuploidy) and structural chromosome aberrations, such as translocations, which give rise to gene fusions. Among the most common leukemia gene fusions in children are *ETV6-RUNX1*, *KMT2A-AFF1* (*MLL-AF4*), *BCR-ABL1* and *IGH-CRLF2* [Pui et al., 2008; Mrózek et al., 2009; Mullighan, 2012]. Lymphoma-specific genetic aberrations have also been defined. It has been demonstrated that the gene fusion *IGH-BCL2*, has the potential to drive the development of B cell non-Hodgkin lymphoma [Fusco et al., 1996; Roulland et al., 2004].

The first events that occur before the formation of these gene fusions are double strand breaks (DSB), which are subsequently mis-repaired, giving rise to genetic aberrations [Greaves and Wiemels, 2003; Hernández and Menéndez, 2016]. Although it has been suggested that exposure to environmental factors, such as insecticides, could induce the formation of these cancer-associated gene rearrangements, more investigation is needed. [Borkhardt et al., 2003; Roulland et al., 2004; Lafura et al., 2007; Lu et al., 2015; Hernández and Menéndez, 2016]. In the present study we investigated whether permethrin and malathion induce *in vitro* gene breakages in the specific breakpoints of genes involved in rearrangements present in leukemia and lymphoma. This study offers biological evidence that helps to understand the relationship between insecticides and the formation of genetic rearrangements associated with hematopoietic malignancies.

2. Materials and methods

In order to compare the results obtained in this study with those referred in the literature, we included the same cellular model used in previous genotoxicity studies testing these insecticides [Herrera et al., 1992; Barrueco et al., 1994; Surrallés et al., 1995; Titenko-Holland et al., 1997; Błasiak et al., 1999; Undeğer and Başaran, 2005]. We analyzed human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

stimulated with phytohemagglutinin (PHA), for assessing the effect of both insecticides *in vitro*. The treatment (24 h, 200 μ M) was selected according to references in the literature, as well as pilot experiments. The exposure time and/or concentration are below to those reported as genotoxic in assays that analyzed whole genomes using the same cellular model [Garry et al., 1990; Barrueco et al., 1994; Surrallés et al., 1995; Pluth et al., 1996; Titenko-Holland et al., 1997; Błasiak et al., 1999; Undeğer and Başaran, 2005; Turkez and Aydin, 2012]. Although the acute dose included is higher than the reported in exposed populations, the lower concentration included in the chronic model has been reported as biologically relevant [Błasiak et al., 1999; Ramos-Chavez et al., 2015].

We performed fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for detecting gene breakages. Based on the positive results obtained in these experiments, we achieved nested polymerase chain reaction (nested-PCR) assays to detect rearrangements of the *IGH*, *KMT2A* (*MLL*) and *ETV6-RUNX1* genes induced by insecticides in PBMCs, applying the same acute exposure model, and in the K562 cell line, using lower concentration of insecticides in an acute and chronic exposure models. These gene breakpoints and fusions are biologically significant in the etiology of leukemia and lymphoma [Pui et al., 2008; Roulland et al., 2004]. We also assessed whether permethrin and malathion induce aneuploidy, since numerical chromosome aberrations are common events in hematological cancer [Vučković et al., 1995; Mullighan, 2012].

2.1. Chemicals

Analytical grade malathion (CAS No. 121-75-5) and permethrin (mixture of 27% cis and 71% trans isomers, CAS No.52645–53-11) were purchased from Sigma, USA. Stock solutions of malathion and permethrin were prepared in ethanol (Merck, USA) (0.2% v/v, final concentration in RPMI 1640 medium, Gibco, USA) and DMSO (Sigma-Aldrich, USA) (0.4% v/v final concentration in medium), respectively.

2.2. Cell cultures and exposure to insecticides

a) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) analyzed by FISH (structural and numerical chromosome gene aberrations) and nested PCR analysis (gene fusions).

Peripheral blood samples from young healthy male non-smoker volunteers were obtained. Informed consent was obtained according to the recommendations of the Helsinki Declaration. Mononuclear cells from peripheral blood were isolated using a density gradient medium (Lymphoprep, Nycomed, Norway). Cells were cultured at a final density of $5\text{--}7 \times 10^5$ cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% non-essential amino acids (Gibco, USA), 1% sodium pyruvate (Gibco, USA), 1% L-glutamine (Gibco, USA) and 2% PHA (Gibco, USA).

The initial cell viability was consistently > 98%. Cells were treated with the insecticides after 48 h of culture. The final concentration of both insecticides was 200 μ M. Cells exposed to ethanol (0.2%) and DMSO (0.4%) were included as negative controls for malathion and permethrin respectively. Cells exposed to 10 μ M of etoposide dissolved in DMSO were included as a positive control [Libura et al., 2008; Lu et al., 2015]. In addition, untreated cells were also included for comparison against cultures exposed to solvents (DMSO and ethanol). Each treatment condition was performed in triplicate for each individual included (2 volunteers). After treatment, the cells were incubated for another 24 h. After 72 h, cell viability was determined, and cells were harvested by centrifugation at $126 \times g$ for 15 min. Cells were incubated with a hypotonic solution (KCl, Merck, Germany 0.075 M) at 37 °C for 20 min. The cells were then fixed with Carnoy's fixative solution (3:1 methanol:acetic acid, Merck, Germany). Cell suspensions were kept at 4 °C until slide preparation.

b) K562 cells exposed to chronic treatment and analyzed by nested

RT-PCR (gene fusions).

To investigate whether permethrin and malathion induce specific gene fusions with chronic treatments, low concentrations of permethrin and malathion were applied to human lymphoblastoid K562 cell line (0.1 μM , every third day for two weeks). An acute treatment of 0.1 μM 24 h was also included in these cells. K562 cells were cultured at a final density of $5\text{--}7 \times 10^5$ cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% non-essential amino acids (Gibco, USA), 1% sodium pyruvate (Gibco, USA), 1% L-glutamine (Gibco, USA) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco, USA); at 37 °C with 5% of CO_2 .

2.3. Cell viability

Cell viability was analyzed by both the Trypan blue (Gibco, USA) exclusion test and by flow cytometry (BD FACSAria) using 7AAD (BD, Pharmingen USA) stain.

2.4. Fluorescence in situ hybridization

Cells were dropped onto glass slides to perform the FISH assays, which were conducted following the manufacturer's recommendations. Analysis was performed using an AXIO ImagerMI (Zeiss, Germany) microscope, and the images were captured and analyzed using ISIS software (Meta Systems, Germany). A total of 1000 interphase cells were reviewed in each slide. The *KMT2A* and *IGH* genes were analyzed using dual-color break-apart rearrangement probes (Vysis-Abbott, USA). The *ETV6* and *RUNX1* genes were analyzed with a dual-color extra signal translocation probe (Vysis-Abbott, USA). The *KMT2A*, *IGH* and *ETV6-RUNX1* probes were analyzed separately.

For the break-apart probes, cells with two fused yellow signals (resulting from the co-localization of orange and green signals) were considered normal. Cells with the classical gene breakage, presented 1 yellow fused, 1 orange, and 1 green signal. We also scored cells with two yellow fused *KMT2A* signals together with either a 3' or 5' portion of a broken gene allele (i.e., two yellow and one orange or green signal). This pattern has already been reported when using this *KMT2A* break-apart probe [Glukhov et al., 2013]. Cells with a number of *KMT2A* yellow signals different from two, were scored as numerical alterations.

For the dual-color extra signal probe, cells with 2 orange and 2 green signals were considered normal. Cells with 1 orange, 1 green, 1 fusion and 1 extra orange signal were considered positive for the *ETV6-RUNX1* fusion. Cells with deviations in the normal number (2) of separate signals were considered with numerical abnormalities.

The aneuploidy assay was independently performed with a cocktail of centromeric probes for chromosomes 12 (green), 14/22 (yellow) and 18 (red) (Oncor, USA). Three slides per treatment condition for each volunteer were included for every analyzed probe or cocktail of probes. All different patterns of probe signals were registered. The observations were performed in a double-blind analysis.

2.5. Nested RT-PCR

Treated cells were washed twice with PBS prior to nucleic acid extraction. The *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* fusions were analyzed by reverse transcriptase nested PCR (nested RT-PCR). RNA was extracted using the Trizol method according to the protocol of the manufacturer (Invitrogen, UK). RNA integrity was verified by gel electrophoresis, and quantification was performed using an Epoch (BioTek, USA) spectrophotometer. The cDNA was obtained with the Transcriptor First Strand cDNA kit (Roche, Germany). The *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* gene fusions were analyzed by nested RT-PCR using primer sets as previously reported [van Dongen et al., 1999]. The cDNA obtained from the RS4 and REH cell lines were used as positive controls for the *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* gene fusions, respectively. A 502 bp fragment corresponding to the *KMT2A-AFF1* fusion is observed in RS4

cells, whereas the REH cell line shows two transcripts, one of 180 bp and a variant of 140 bp resulting from the *ETV6-RUNX1* fusion. The RT-PCR conditions were followed exactly as previously reported [van Dongen et al., 1999]. Briefly, for the first reaction of RT-PCR (final volume 50 μL) of RT-PCR, 5 μL of cDNA were mixed with 400 nM of primers (A, B), 200 μM of dNTPs, 2.5 mM of MgCl_2 , 1 unit of Taq enzyme and PCR buffer (20 mM Tris HCL, 50 mM KCl). The PCR consisted of an initial cycle of 30s to 95 °C, and 35 cycles of 30s to 94 °C, 60s to 65 °C and 60s to 72 °C. The PCR reaction was stopped at 10 °C. For the nested RT-PCR, 5 μL of the first round PCR product were mixed with the same reagents and in the same concentrations used for the first PCR reaction, using a second pair of primers (C, D), and the same PCR cycle conditions as for the first reaction.

The *IGH-BCL2* gene fusion was analyzed by nested PCR. DNA was extracted using the QIAMP DNA extraction midi kit (Qiagen, Germany). DNA integrity was verified by gel electrophoresis, and quantification was performed using Epoch (BioTek, USA). Nested PCR reactions were performed as previously reported using the same primer sets and PCR conditions [Fusco et al., 1996; Roulland et al., 2004]. Briefly, 2.5 μL of DNA were mixed with 200 nM of each primer, 200 μM of dNTPs, 2 units of Taq DNA polymerase and PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2). The first round of PCR consisted of a 5 min cycle to 95 °C, followed by 40 cycles of 1 min to 60 °C, 1 min to 72 °C and 1 min to 94 °C. A final extension time of 5 min to 72 °C was used. For the second round of PCR, 1 μL of the first reaction was mixed with the same reagents and in the same conditions used for the first PCR. For the second PCR, 20 cycles (1 min to 60 °C, 1 min to 72 °C and 1 min to 94 °C) were used. DNA from an available commercial kit (LightCycler t (14;18) Quantification Kit (mbr) (Roche, Germany)) was used as a positive control. Final products of 300–1000 bp were considered as the result of the *IGH-BCL2* gene rearrangement as reported by Fusco et al., 1996.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using SPSS 16.0 software. Comparisons were performed between the control (DMSO or ethanol) and insecticide treated groups. A one-tailed U-Mann Whitney test was used to compare cell viability, the number of total altered cells, the number of cells with structural alterations (*IGH* break, *KMT2A* break or *ETV6-RUNX1* fusion), and the number of cells with numerical alterations (*IGH*, *KMT2A*, *ETV6*, *RUNX1* copy number deviations and aneuploidy of chromosomes 12, 14/22 or 18). All comparisons were statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

To determine whether malathion and permethrin induce breaks or other abnormalities involving the specific breakpoints of the *IGH*, *KMT2A*, and *ETV6/RUNX1* genes, we analyzed cells exposed to insecticides using FISH. We also performed nested-PCR to detect the specific leukemia and lymphoma gene fusions *KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1*, and *IGH-BCL2*. We observed a non-significant reduction in the cell viability with the insecticides compared to the solvents, as assessed by trypan blue and 7AAD staining.

3.1. Effect of permethrin and malathion on *IGH*, *KMT2A*, and *ETV6-RUNX1* genes and aneuploidy detected by FISH on PBMCs exposed to insecticides (200 μM , 24 h)

In all FISH assays (*IGH*, *KMT2A*, *ETV6-RUNX1*, and aneuploidy), the frequency of altered cells tended to increase in the cultures treated with insecticides compared to the controls (DMSO or ethanol). However, statistically significant differences were found particularly with permethrin treatment. Regarding *IGH*, we found that permethrin induced a higher number of cells with the *IGH* classical break (1 fusion, 1 orange,

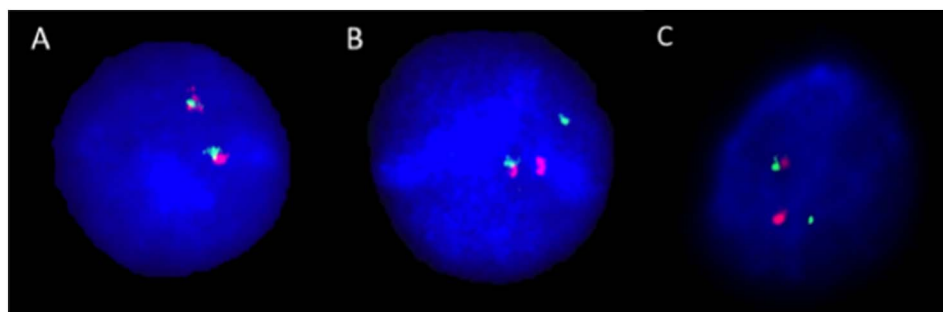


Fig. 1. *IGH* gene detection on PBMCs. A) Cell exposed to DMSO showing two normal copies of *IGH* gene (two fused signals resulting from the co-localization of orange + green signals). B) *IGH* gene classical break (1 fusion, 1 orange, and 1 green) in a cell exposed to permethrin. C) *IGH* gene classical break (1 fusion, 1 orange, and 1 green) in a cell exposed to etoposide. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

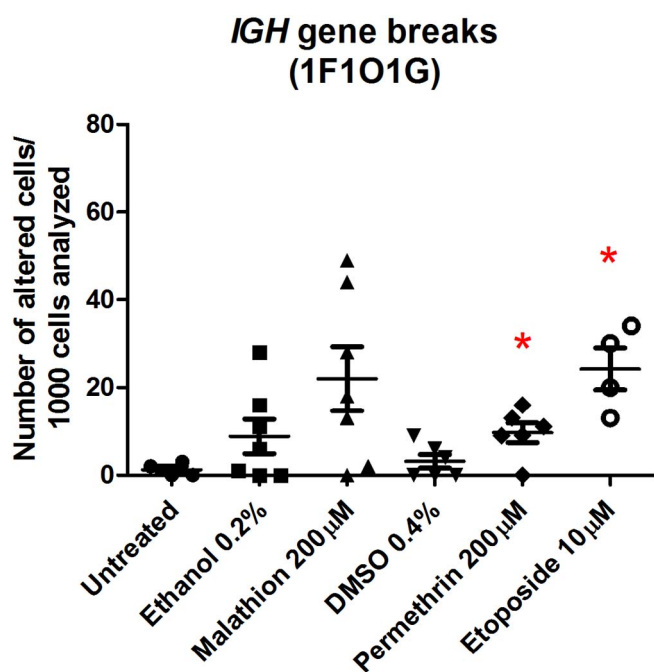


Fig. 2. Frequency of *IGH* breaks in cells exposed to insecticides. Cells with the *IGH* gene classical break (1 fusion, 1 orange, and 1 green signals). Permethrin significantly induced *IGH* breaks compared to DMSO. No difference was found between DMSO and untreated conditions. * $p < 0.05$ U-Mann Whitney. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1 green signal) ($p = 0.032$) (Figs. 1 and 2). No statistically significant difference was observed between malathion and ethanol in the induction of *IGH* breaks.

The highest frequencies of altered cells were observed in the *KMT2A* gene assay. Both malathion and permethrin significantly increased the recurrence of *KMT2A* gene structural alterations ($p = 0.032$ and $p = 0.046$). In addition, permethrin increased numerical aberrations in the *KMT2A* gene ($p = 0.020$), while malathion did not increase significant *KMT2A* numerical changes. The numerical alterations (*i.e.*, gain or loss of complete *KMT2A* gene (yellow signals)) (Fig. 3C) were more recurrent than the structural aberrations. When analyzed together, significantly higher numbers of total abnormal cells with numerical and/or structural *KMT2A* gene aberrations were found in cultures exposed to permethrin ($p = 0.0045$) (Figs. 3 and 4). Additional patterns of damage in *KMT2A* gene were scored (*e.g.*, two yellow fusion signals and one orange signal and two yellow fusion signals and one green signal). These alternative patterns have already been reported for *KMT2A* gene in cells exposed to etoposide [Glukhov et al., 2013] (Fig. 3D, Fig. 5).

Neither permethrin nor malathion significantly increased the recurrence of *ETV6-RUNX1* gene fusion. Surprisingly, an increase in the recurrence of numerical aberrations (*i.e.*, a gain or loss of *ETV6* or *RUNX1* genes) was detected. Malathion treatment did not induce

significant numerical changes in *ETV6* or *RUNX1* genes. However, permethrin exposure significantly induced numerical copy number deviations in the *ETV6* and *RUNX1* genes ($p = 0.046$) (Figs. 6 and 7). The number of numerical alterations in the *ETV6* gene (*i.e.*, a gain or loss of green signals) was slightly higher than that observed for the *RUNX1* gene (*i.e.*, a gain or loss of orange signals). The high frequency of copy number deviations observed in the *KMT2A*, *ETV6* and *RUNX1* genes prompted the analysis of aneuploidy with a panel of centromeric probes (chromosomes 12, 14/22 and 18).

The analysis of centromeric probes showed that permethrin significantly increased the total number of cells with aneuploidy ($p = 0.013$) (Figs. 8 and 9), and chromosome gains were more commonly observed than losses. An analysis of an individual probe was performed, and the frequency of aneuploidy for 14/22 was significantly higher in cells exposed to permethrin ($p = 0.013$). Although higher number of cells with numerical aberrations of chromosomes 12 and 18 was observed in cells exposed to insecticides, no significant difference was detected. No significant aneuploidy induction was detected in cells treated with malathion.

3.2. Detection of genetic fusions *KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1* and *IGH-BCL2* by nested-PCR on PBMCs and K562 cell line

Gene fusions were not detected in cells exposed to the solvent. The *ETV6-RUNX1* gene fusion was detected in PBMCs acutely exposed to permethrin (200 μM, 24 h) (one fragment of 180 bp) (Fig. 10). The chronic exposure of K562 cells to malathion (0.1 μM, 2 weeks) induced the *ETV6-RUNX1* gene fusion (Fig. 11). The acute exposure (0.1 μM, 24 h) of this cell line to malathion induced *KMT2A-AFF1* and *ETV6-RUNX1* fusions (Fig. 12, Fig. 13), and the acute exposure to permethrin induced *IGH-BCL2* rearrangement (Fig. 14).

4. Discussion

To obtain biological evidence of the relationship of insecticides with hematological cancer, we investigated whether permethrin and malathion induce gene breakages in the specific breakpoints of genes involved in rearrangements present in leukemia and lymphoma. Our results show that both insecticides, but particularly permethrin, induce numerical and structural changes, ruptures and rearrangements, of genes altered in leukemia and lymphoma. Overall, our study provides biological evidence that correlates insecticide exposure and damage in cancer genes.

Previous reports using comet assay, sister chromatid exchange and micronuclei test in PBMCs, have suggested that permethrin and malathion induce DNA damage [Herrera et al., 1992; Barrueco et al., 1994; Surrallés et al., 1995; Titenko-Holland et al., 1997; Błasiak et al., 1999; Undeğer and Başaran, 2005; Turkez and Aydin, 2012; Ramos-Chavez et al., 2015]. In the present study, we found more meaningful to focus our analysis on specific oncogenic DNA alterations, such as breakages in specific gene breakpoints involved in leukemia and lymphoma, as well as the detection of well-known oncogenic fusions.

There are specific rearrangements considered driver mutations in

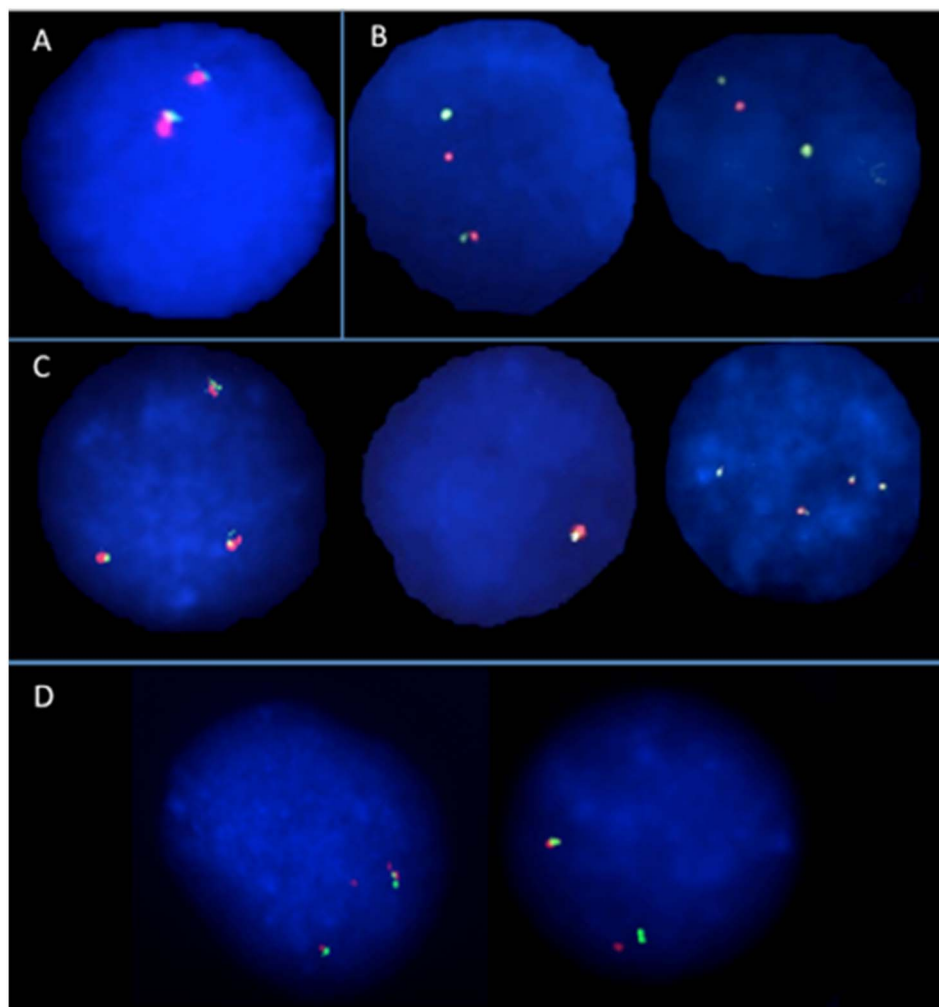


Fig. 3. Analysis of *KMT2A* gene on PBMCs exposed. A) Normal cell exposed to DMSO, with two copies of *KMT2A* gene (two fused orange + green signals that are detected as yellow signals). B) Cells exposed to insecticides, with *KMT2A* gene break (one yellow fusion signal that represents the normal *KMT2A* allele, and orange and green signals that are separated because *KMT2A* gene is broken). C) Cells exposed to insecticides, with numerical alterations in *KMT2A* gene. Cells with three, one and four *KMT2A* gene copies. D) Cells exposed to etoposide, with *KMT2A* gene break (right) and a cell with two normal *KMT2A* (yellow signals) and one orange signal, showing an additional breakage pattern (left). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the etiology of leukemia and lymphoma. The *IGH-BCL2* gene fusion is a genetic hallmark of follicular lymphoma, one of the most common types of non-Hodgkin lymphoma [Roulland et al., 2004; Agopian et al., 2009]. An increased recurrence of the *IGH-BCL2* rearrangement has been detected in individuals occupationally exposed to pesticides [Roulland et al., 2004; Agopian et al., 2009]. Therefore, we assessed whether exposure to permethrin and malathion could induce breakage of *IGH*.

Our FISH results showed a non-significant increase in the frequency of total *IGH* gene alterations (*i.e.*, numerical and structural) in cells exposed to insecticides. However, we found that permethrin significantly increased the recurrence of *IGH* breaks in PBMCs. Although this finding confirms *IGH* breakage, the *IGH-BCL2* rearrangement was not detected by nested-PCR, possibly because genes other than *BCL2* were involved. Furthermore, it must be considered that the gene breakages are only the first step, and further events are needed to give rise to gene fusions. Breakage of an additional gene, proximity of broken genes, breakpoint junctions and non-homologous recombination events are essential for gene fusion formation [Glukhov et al., 2013; Lu et al., 2015]. Based on the positive result for the induction of *IGH*, a chronic exposure model using the cell line K562 were performed. The *IGH-BCL2* gene rearrangement was detected in this cell line exposed to lower concentrations of permethrin for two weeks. It should be considered the particular genetic instability displayed by K562 cells, which makes this leukemic cell line more susceptible to the induction of mutations by chemicals [Law et al., 1993].

The rearrangements involving the *KMT2A* gene and the *ETV6-RUNX1* gene fusion are driver mutations involved in the development

of childhood acute leukemia. These aberrations are among the most frequently observed in infant and children patients [Greaves and Wiemels, 2003; Mullighan, 2012]. Also, *KMT2A* gene is frequently rearranged in adult therapy-related leukemias that emerge as a consequence of receiving chemotherapeutic drugs that inhibit topoisomerase II, such as etoposide [Libura et al., 2008].

Limited biological evidence in the literature shows that pyrethroid and organophosphate insecticides may have the potential to induce specific genetic damage associated with leukemia and lymphoma. It was suggested in an individual case report that permethrin induced leukemia with a *KMT2A* rearrangement, in a patient who was exposed *in utero* to permethrin and was diagnosed with leukemia at birth. In the same report, an *in vitro* experiment confirmed that permethrin induces *KMT2A* breaks in BV173 cells [Borkhardt et al., 2003]. Regarding organophosphates, it was recently reported that chlorpyrifos induces *KMT2A* gene translocations [Lu et al., 2015]. Furthermore, other types of insecticides have also been associated with an increased incidence of leukemia-associated mutations in exposed populations [Lafuira et al., 2007].

Since the biological evidence showing the association of insecticides with leukemogenic aberrations is limited, we evaluated whether the commonly used insecticides permethrin and malathion have the potential to induce *KMT2A* and *ETV6-RUNX1* gene rearrangements. Our results show that both insecticides significantly induce *KMT2A* alterations in PBMCs. We found that permethrin increases the recurrence of structural and numerical *KMT2A* alterations. The highest frequencies of abnormal cells were observed in the *KMT2A* assay compared with the other analyzed genes, suggesting a possible susceptibility of this gene to

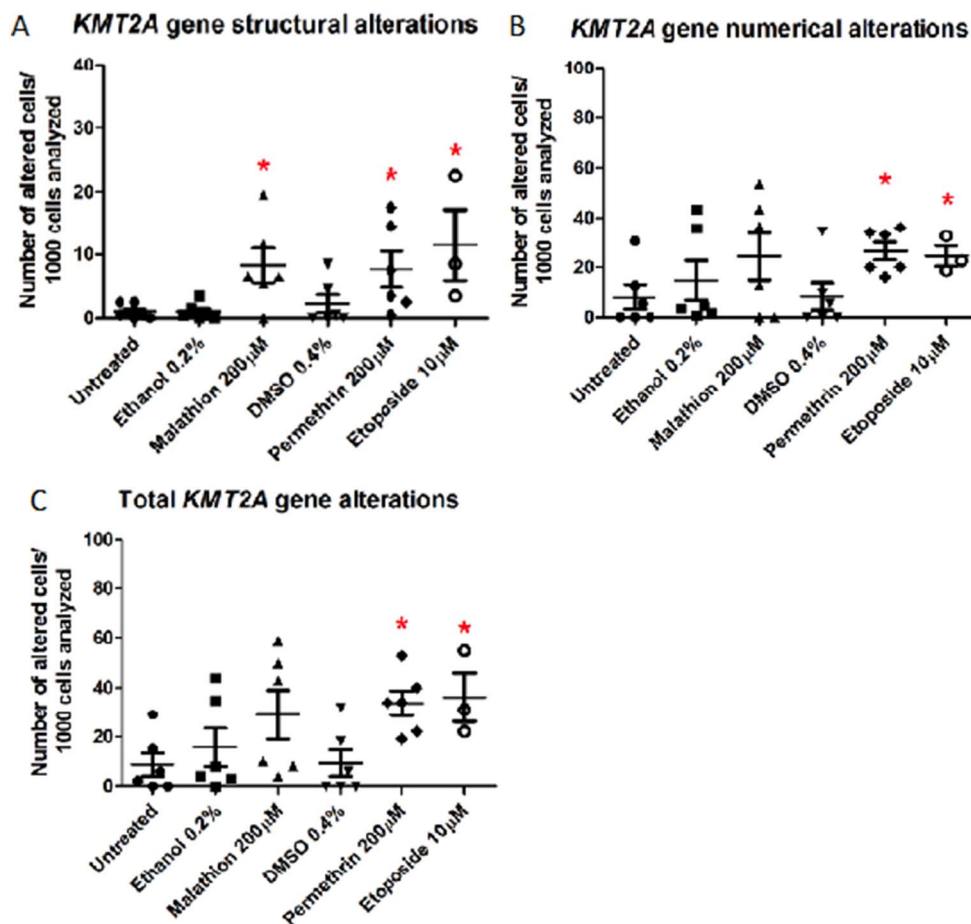


Fig. 4. Frequency of *KMT2A* gene alterations in cells exposed to insecticides. A) Number of cells with structural *KMT2A* gene alterations (cells with split of orange and green signals). B) Number of cells with *KMT2A* gene numerical alterations (no split of signals, but gains or losses of fusion signals). C) Number of cells with *KMT2A* gene alteration (numerical and/or structural). Permethrin induced structural and numerical *KMT2A* alterations. Malathion induced structural *KMT2A* aberrations. No statistical differences were observed between untreated and control (DMSO/ethanol) cells * $p < 0.05$ U-Mann Whitney. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

breakage. Also, malathion induced *KMT2A* gene breaks, and a non-significant increase in the number of breaks in *IGH* gene. Furthermore, oncogenic rearrangements in *KMT2A* gene were detected after malathion exposure in K562 cells. A distinctive vulnerability of *KMT2A* has been previously observed, resulting from certain characteristics of this gene, such as the presence of an AT-rich breakpoint cluster region that contains Alu, LINE and MER repetitive sequences and topoisomerase II recognition sites. These elements contribute to *KMT2A* breakage, and make it prone to rearrange with other genes [Sung et al., 2006; Le et al., 2009; Glukhov et al., 2013].

In our study, it was possible to detect different patterns of damage involving the *KMT2A* gene given that interphase FISH makes it possible

to analyze a large number of individual cells, and simultaneously detects structural and numerical abnormalities. The detected patterns have already been reported in cells exposed to etoposide, which is a well-known leukemogenic agent [Sung et al., 2006; Glukhov et al., 2013]. We observed cells with two intact *KMT2A* alleles together with either a 3' or 5' portion of a broken *KMT2A* allele (*i.e.*, two yellow and one orange or green signal) (Fig. 5). Two mechanisms for the formation of these specific patterns have been proposed. First, an alternative breakpoint could somehow occur distant from the breakpoint cluster region (BCR), resulting in the splitting of either the orange or green signal. Alternatively, this pattern could arise as a consequence of a *KMT2A* break in a single sister chromatid that was not correctly

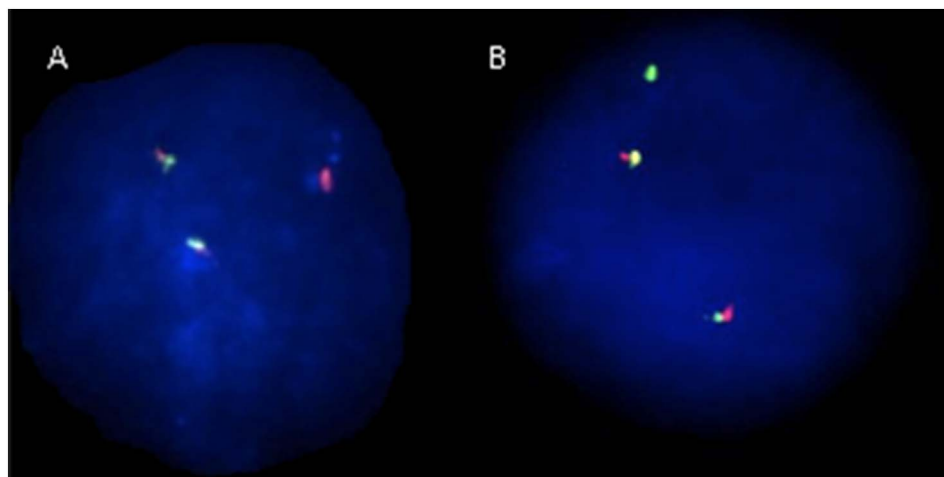


Fig. 5. Additional *KMT2A* gene fluorescent patterns observed in cells treated with insecticides. A) Cell with two normal fusion signals and one red signal. B) Cell with two normal fusion signals and one green signal. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

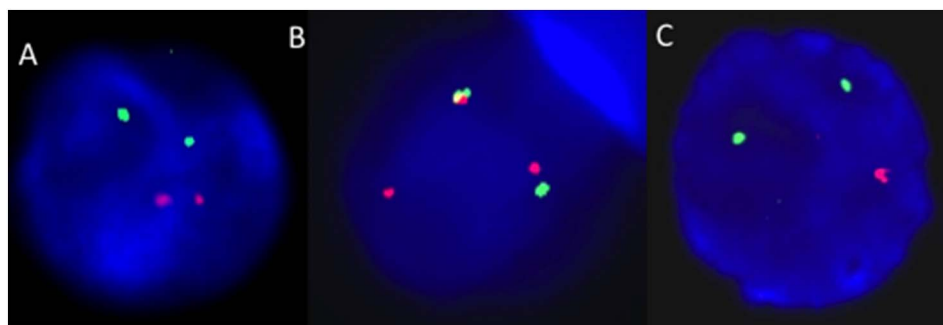


Fig. 6. Analysis of *ETV6* and *RUNX1* genes. A) Normal cell with two copies of *ETV6* and two copies of *RUNX1*. B) Cell with *ETV6*-*RUNX1* fusion. C) Cell with loss of one copy of *ETV6*.

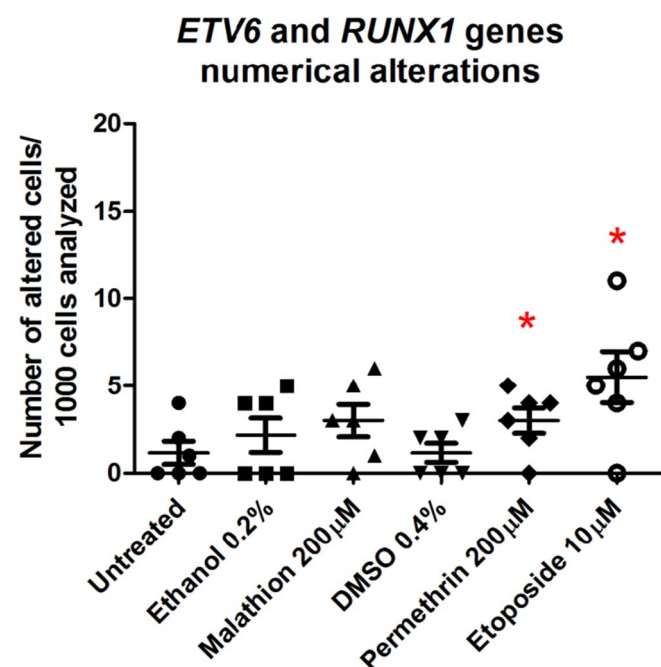


Fig. 7. Frequency of cells with numerical alterations in *ETV6* and *RUNX1* genes. Number of cells with gains or losses of *ETV6* (green) and/or *RUNX1* (orange) signals. Permethrin induced numerical aberrations in *ETV6* and *RUNX1* genes. No statistical significance was found between DMSO and untreated cells. * $p < 0.05$ U-Mann Whitney. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

retained by cohesins to the other sister chromatid [Glukhov et al., 2013]. Given the relationship between the patterns observed in etoposide-treated cells compared to insecticides, it is possible that permethrin and malathion exert a similar mechanism of action, inhibiting the DNA topoisomerase II enzyme. However, further studies are needed to elucidate the mechanism by which these insecticides induce *KMT2A* rearrangements.

Although the FISH analysis revealed a high frequency of *KMT2A* breaks, the nested RT-PCR assay did not detect the *KMT2A-AFF1* fusion

in PBMCs exposed to permethrin, which suggests that *KMT2A* was not rearranged or was possibly translocated to another partner gene, since > 80 different genes have been reported that can be fused to *KMT2A* [Meyer et al., 2013]. Furthermore, it has to be considered that not all the breaks in the *KMT2A* gene give rise to true oncogenic fusions, as additional events are required [Sung et al., 2006]. We cannot rule out the possibility that *KMT2A* breaks in some cells were correctly repaired, and thus, oncogenic fusions were not formed. However, it is important to consider that the high incidence of *KMT2A* breaks induced by insecticides could significantly augment the probability of leukemogenic fusion formation.

The FISH analysis revealed very few cells bearing the *ETV6*-*RUNX1* gene fusion. The percentage of abnormal cells was considerably lower compared to that found for the *KMT2A* and *IGH* FISH analyses. A lower level of abnormal cells was expected in the *ETV6*-*RUNX1* assay, given that the FISH probe used detects gene fusion and not only breakage, as do the *KMT2A* and *IGH* break-apart probes. Although using FISH we detected the *ETV6*-*RUNX1* fusion in PBMCs exposed to insecticides, the statistical analysis was not significant. However, the *ETV6*-*RUNX1* gene fusion was further detected by RT-PCR in PBMCs exposed to permethrin and in K562 cells exposed acutely and chronically to malathion. The different results observed between FISH and nested RT-PCR may be attributed to differences in the sensitivity of both techniques. Unexpectedly, the FISH assay revealed that permethrin induced numerical deviations in the normal number of these genes, and a further analysis confirmed aneuploidy events.

Aneuploidy is a very common event in several cancers and is reflective of chromosome instability. Our study revealed that permethrin induces numerical chromosome aberrations. We decided to analyze chromosomes 12, 14/22 and 18 since these chromosomes are commonly gained in acute lymphoblastic leukemia [Paulsson et al., 2010] and also because we previously observed copy number deviations in *ETV6*, which is located on chromosome 12. Our study agrees with a previous report that suggested that aneuploidy was induced by permethrin exposure in mouse cells based on the detection of micronuclei. However, that report did not confirm whether the micronuclei were the consequence of chromosome breaks or aneuploidy [Institóris et al., 1999]. In the present study, we established that permethrin exposure induce both aneuploidy and breaks.

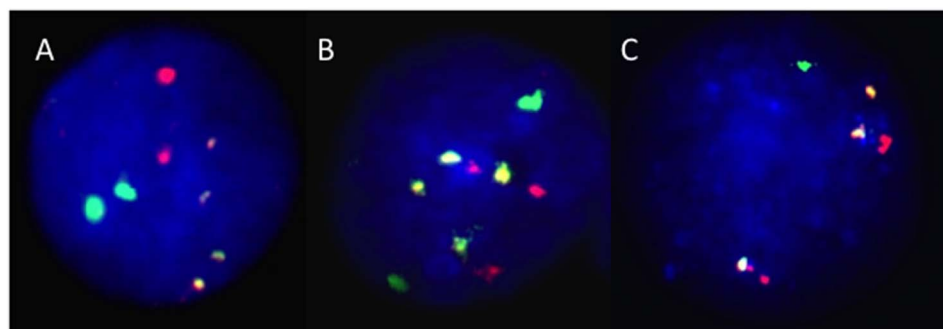


Fig. 8. Analysis of aneuploidy. A) Normal cell with 4 yellow signals (chromosomes 14 and 22), two green (chromosome 12), and two orange (chromosome 18) signals. B) Cell with gain of chromosome 18. C) Cell with loss of chromosome 12 and loss of an acrocentric (14 or 22). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

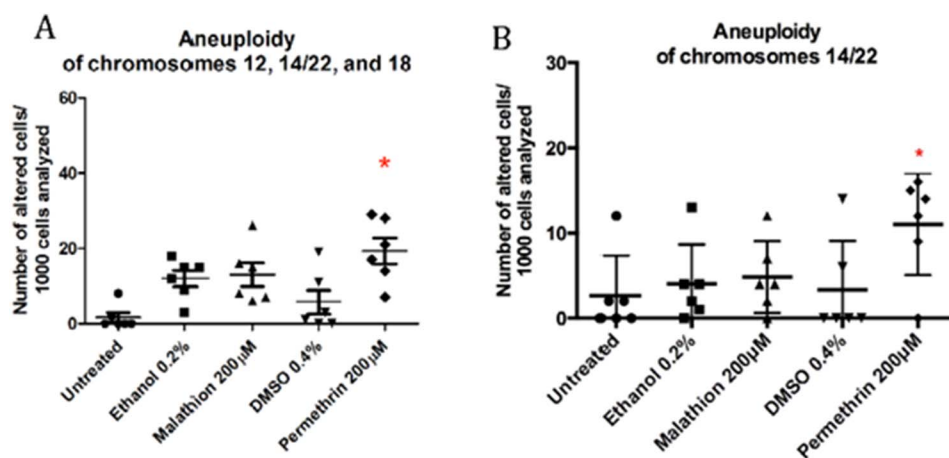


Fig. 9. Frequency of aneuploidy of chromosomes in cells exposed to insecticides. A) Permethrin induced aneuploidy of chromosomes 12, 14/22 and/or 18. No statistical significance was found between DMSO and untreated cells. * $p < 0.05$ U-Mann Whitney. B) An analysis of individual probes showed that permethrin induced aneuploidy of chromosomes 14/22. No statistical significance was found between DMSO and untreated cells. * $p < 0.05$ U-Mann Whitney.

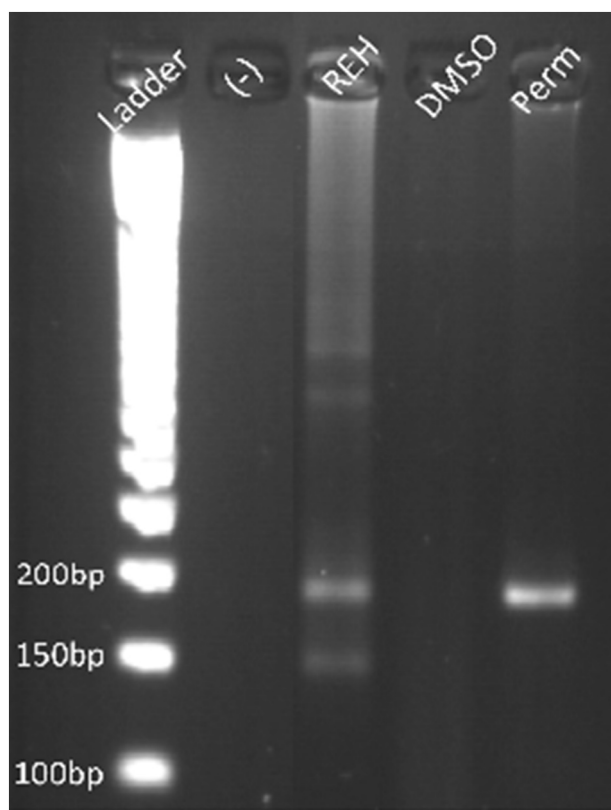


Fig. 10. Detection of *ETV6-RUNX1* fusion by nested RT-PCR in PBMCs exposed to permethrin. The gene fusion was detected in cells exposed to permethrin (24 h, 200 μ M) and not in cells exposed to DMSO. One transcript of 180 bp was detected in PBMCs. *REH: positive control; (-): negative control; Perm: permethrin.

Our study revealed a particular potential of permethrin to induce aneuploidy and damage in genes involved in well-known leukemogenic rearrangements. The mechanisms by which permethrin induces aneuploidy and genetic rearrangements requires further investigation. Besides acting as neurotoxins, affecting the sodium channels in axonal membranes, pyrethroids exert many biological effects that could be implicated in the generation of gene breakages. It has been reported that pyrethroids are endocrine disruptors, produce reactive oxygen species, exert epigenetic modifications, disturb gene expression, and bind directly to DNA [Kale et al., 1999; Chen et al., 2002; Kasat et al., 2002; Manikkam et al., 2012; Mignini et al., 2013; Ahmadi and Ghanbari, 2014; Chatterjee et al., 2014; Yang et al., 2015]. More than one mechanism likely contributes to generating damage, since we observed both aneuploidy and structural aberrations. Moreover, it needs

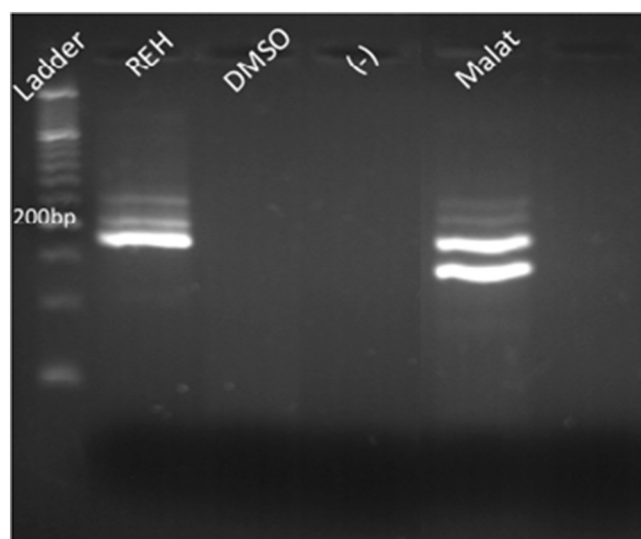


Fig. 11. Detection of *ETV6-RUNX1* gene fusion by nested RT-PCR in K562 cells exposed chronically to malathion. The gene fusion was detected in cells exposed to malathion and not in cells exposed to DMSO. Two transcripts of 180 bp and 130 bp were detected in K562 cells exposed to malathion. *REH: positive control; (-): negative control; Malat: malathion.

to be studied in depth whether a specific mechanism underlies a preferential damage in more vulnerable sites of the genome, such as the *KMT2A* gene. Furthermore, the mechanism by which malathion also induced *KMT2* gene breaks is also unknown. Malathion is an acetylcholinesterase inhibitor but exerts other cellular effects such as endocrine disruptor, produces reactive oxygen species, and also exerts epigenetic and gene expression modifications [Chen et al., 2002; Gwinn et al., 2005; Moore et al., 2010; Zhang et al., 2012].

Overall our results show that malathion and permethrin have the potential to induce breaks in the *KMT2A* and *IGH* genes, which could be the first step in the origin of oncogenic fusions that are the driver mutations for lymphoma and leukemia. Additionally, we have shown that permethrin induces aneuploidy. The mechanisms by which this pyrethroid induces aneuploidy, and malathion and permethrin cause potentially leukemogenic genetic damage have yet to be elucidated.

Our results show that insecticides have the potential to induce leukemia and lymphoma gene aberrations. The large number of cells analyzed by a methodology that achieves the assessment of individual cells (FISH), the inclusion of different genes associated to hematological cancer, the assessment of low doses in a chronic exposure model, as well as the inclusion of the analysis of specific gene rearrangements by a sensitive methodology (nested RT-PCR), are strengths of the present

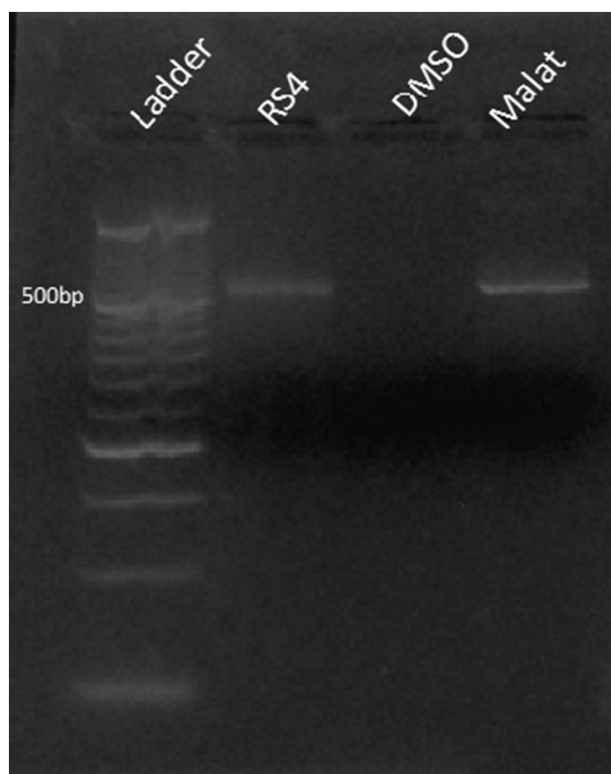


Fig. 12. Detection of *KMT2A-AFF1* gene fusion by nested RT-PCR in K562 cells acutely exposed to malathion (24 h, 0.1 μ M). The gene fusion was detected in cells exposed to malathion and not in cells exposed to DMSO. A transcript of 502 bp was detected in K562 cells exposed to malathion.

*RS4: positive control; Malat: malathion.

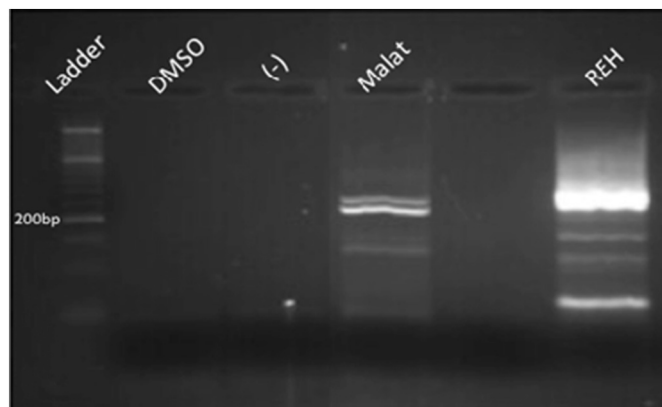


Fig. 13. Detection of *ETV6-RUNX1* gene fusion by nested RT-PCR in K562 cells acutely exposed to malathion. The gene fusion was detected in cells exposed to malathion and not in cells exposed to DMSO. Two transcripts of 200 bp and 250 bp were detected in K562 cells exposed to malathion.

* REH: positive control; (-): negative control; Malat: malathion.

study. However, these results should be taken with caution, since some limitations exist. It is mandatory to study if the gene breakages and fusions are present as sub-lethal damage in cells that may be biologically relevant in the oncogenic process. The possible pathogenic potential on cells that are considered the target of the initial events of leukemogenesis, as hematopoietic and progenitor stem cells, has yet to be studied. Also, the present study does not include the analysis of permethrin and malathion metabolites, which could also be relevant in the induction of gene rearrangements. It has been reported that the metabolites of these insecticides also exert biological effects [Barrueco et al., 1994; Blasiak, et al., 1999].

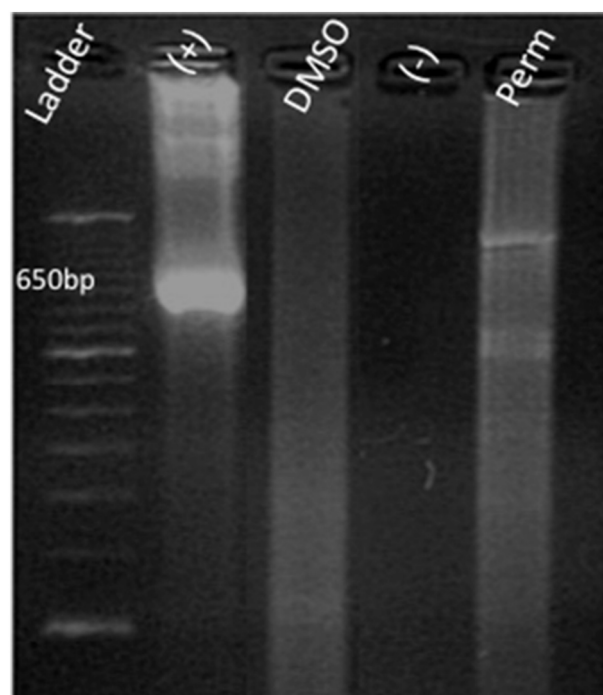


Fig. 14. Detection of *IGH-BCL2* gene fusion by nested PCR in K562 cells exposed acutely to permethrin. The gene fusion was detected in cells exposed to permethrin and not in cells exposed to DMSO. Two transcripts of 500 bp and 800 bp were detected in K562 cells exposed to permethrin. *(+) = positive control; (-) = negative control; Perm: permethrin.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.013> associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

This article constitutes a partial fulfillment of the requirements of the PhD Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México). The doctoral student, María del Pilar Navarrete Meneses acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT) PhD grant 385279, and UNAM.

Financial support was provided by: Fundación Miguel Alemán (2012), Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría (2013), Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACyT CB-2012-01/183467.

References

- Agopian, J., Navarro, J.-M., Gac, A.-C., Lecluse, Y., Briand, M., Grenot, P., Gauduchon, P., Ruminy, P., Lebailly, P., Nadel, B., et al., 2009. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 206, 1473–1483.
- Ahmadi, F., Ghanbari, K., 2014. Proposed model for binding of permethrin and deltamethrin insecticides with ct-DNA, a structural comparative study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 136–145.
- Alavanja, M.C., Bonner, M.R., 2012. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 238–263.
- Alavanja, M.C., Hofmann, J.N., Lynch, C.F., Hines, C.J., Barry, K.H., Barker, J., Buckman, D.W., Thomas, K., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., et al., 2014. Non-Hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. *PLoS One* 9, e109332.
- Armstrong, S.A., Look, A.T., 2005. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 6306–6315.
- Barr, D.B., Olsson, A.O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead, R.D., Magsumbol, M.S., Williams, B.L., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ. Health Perspect.* 118,

- 742–748.
- Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C., de la Peña, E., 1994. Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 14, 31–38.
- Berkowitz, G.S., Obel, J., Deych, E., Lapinski, R., Godbold, J., Liu, Z., Landrigan, P.J., Wolff, M.S., 2003. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic urban cohort. *Environ. Health Perspect.* 111, 79–84.
- Berman, T., Hochner-Celnikier, D., Barr, D.B., Needham, L.L., Amitai, Y., Wormser, U., Richter, E., 2011. Pesticide exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. *Environ. Int.* 37, 198–203.
- Błasiak, J., Jałoszyński, P., Trzeciak, A., Szyfter, K., 1999. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.* 445, 275–283.
- Borkhardt, A., Wilda, M., Fuchs, U., Gortner, L., Reiss, I., 2003. Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 88, F436–F437.
- Chatterjee, S., Basak, P., Chaklader, M., Das, P., Pereira, J.A., Chaudhuri, S., Law, S., 2014. Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: an experimental model to study the toxic effects of pesticide. *Environ. Toxicol.* 29, 84–97.
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., Wang, X., 2002. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1419–1435.
- Deziel, N.C., Colt, J.S., Kent, E.E., Gunier, R.B., Reynolds, P., Booth, B., Metayer, C., Ward, M.H., 2015. Associations between self-reported pest treatments and pesticide concentrations in carpet dust. *Environ. Health* 14, 27.
- Ding, G., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., Wang, G., Feng, C., Tian, Y., 2012. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13480–13487.
- van Dongen, J.J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., et al., 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the Biomed-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13, 1901–1928.
- Egeghy, P.P., Cohen Hubal, E.A., Tulve, N.S., Melnyk, L.J., Morgan, M.K., Fortmann, R.C., Sheldon, L.S., 2011. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1727–1754.
- Ferland, S., Côté, J., Ratelle, M., Thuot, R., Bouchard, M., 2015. Detailed urinary excretion time courses of biomarkers of exposure to permethrin and estimated exposure in workers of a corn production farm in Quebec, Canada. *Ann. Occup. Hyg.* 59, 1152–1167.
- Fusco, J.C., Setzer, R.W., Collard, D.D., Moore, M.M., 1996. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis* 17, 1013–1020.
- Garry, V.F., Nelson, R.L., Griffith, J., Harkins, M., 1990. Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 10, 21–29.
- Glukhov, S.I., Rubtsov, M.A., Alexeyevsky, D.A., Alexeevski, A.V., Razin, S.V., Iarovaia, O.V., 2013. The broken MLL Gene is frequently located outside the inherent chromosome territory in human lymphoid cells treated with DNA topoisomerase II poison etoposide. *PLoS One* 8, e75871.
- Greaves, M.F., Wiemels, J., 2003. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 3, 639–649.
- Gwinn, M.R., Whipkey, D.L., Tennant, L.B., Weston, A., 2005. Differential gene expression in normal human mammary epithelial cells treated with malathion monitored by DNA microarrays. *Environ. Health Perspect.* 113, 1046–1051.
- Hernández, A.F., Menéndez, P., 2016. Linking pesticide exposure with pediatric leukemia: potential underlying mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 461.
- Herrera, A., Barrueco, C., Caballo, C., de la Peña, E., 1992. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 218–222.
- Institóris, L., Undeger, U., Siroki, O., Nehéz, M., Dési, I., 1999. Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology* 137, 47–55.
- Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D., 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 105, 197–205.
- Kasat, K., Go, V., Pogo, B.G., 2002. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression. *Environ. Int.* 28, 429–432.
- Krieger, R.I., 2010. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lafuria, K.M., Bielawski, D.M., Posecion, N.C., Ostrea, E.M., Matherly, L.H., Taub, J.W., Ge, Y., 2007. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr. Blood Cancer* 49, 624–628.
- Law, J.C., Ritke, M.K., Yalowich, J.C., Leder, G.H., Ferrell, R.E., 1993. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk. Res.* 17, 1045–1050.
- Le, H., Singh, S., Shih, S.-J., Du, N., Schnyder, S., Loredo, G.A., Bien, C., Michaelis, L., Toor, A., Diaz, M.O., et al., 2009. Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes Chromosom. Cancer* 48, 806–815.
- Libura, J., Ward, M., Solecka, J., Richardson, C., 2008. Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential. *Eur. J. Haematol.* 81, 185–195.
- Lu, C., Liu, X., Liu, C., Wang, J., Li, C., Liu, Q., Li, Y., Li, S., Sun, S., Yan, J., et al., 2015. Chlorpyrifos induces MLL translocations through caspase 3-dependent genomic instability and topoisomerase II inhibition in human fetal liver hematopoietic stem cells. *Toxicol. Sci.* 147, 588–606.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K., 2012. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod. Toxicol.* 34, 708–719.
- Matthews, G., 2008. *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. John Wiley & Sons, New York.
- McDuffie, H.H., Pahwa, P., McLaughlin, J.R., Spinelli, J.J., Fincham, S., Dosman, J.A., Robson, D., Skinnider, L.F., Choi, N.W., 2001. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10, 1155–1163.
- Menegaux, F., Baruchel, A., Bertrand, Y., Lescoeur, B., Leverger, G., Nelken, B., Sommelet, D., Hémon, D., Clavel, J., 2006. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup. Environ. Med.* 63, 131–134.
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Gröger, D., Park, T.S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villares, P., Macintyre, E., et al., 2013. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 27, 2165–2176.
- Mignini, F., Nasuti, C., Fedeli, D., Mattioli, L., Cosenza, M., Artico, M., Gabbianelli, R., 2013. Protective effect of alpha-tiopic acid on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26, 871–881.
- Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* 25, 221–226.
- Morgan, M.K., 2012. Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 2964–2985.
- Mrózek, K., Harper, D.P., Aplan, P.D., 2009. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23, 991–1010.
- Mullighan, C.G., 2012. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 122, 3407–3415.
- Paulsson, K., Forestier, E., Liljebjörn, H., Heldrup, J., Behrendtz, M., Young, B.D., Johansson, B., 2010. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21719–21724.
- Pluth, J.M., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P., Albertini, R.J., 1996. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res.* 56, 2393–2399.
- Pui, C., 2009. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. *Semin. Hematol.* 46, 1–2.
- Pui, C., Robison, L.L., Look, A.T., 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030–1043.
- Quirós-Alcalá, L., Bradman, A., Nishioka, M., Harnly, M.E., Hubbard, A., McKone, T.E., Ferber, J., Eskenazi, B., 2011. Pesticides in house dust from urban and farmworker households in California: an observational measurement study. *Environ. Health* 10, 19.
- Ramos-Chavez, L.A., Sordo, M., Calderon-Aranda, E., Castañeda-Saucedo, E., Ostrosky-Wegman, P., Moreno-Godínez, M.E., 2015. A permethrin/allevrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 78, 7–14.
- Roberts, J.R., Karr, C.J., Paulson, J.A., Brock-Utne, A.C., Brumberg, H.L., Campbell, C.C., et al., 2012. Pesticide exposure in children. *Pediatrics* 130 (6), e1757–e1763.
- Roulland, S., Lebaillly, P., Lecluse, Y., Briand, M., Pottier, D., Gauduchon, P., 2004. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res.* 64, 2264–2269.
- Rusiecki, J.A., Patel, R., Koutros, S., Beane-Freeman, L., Landgren, O., Bonner, M.R., Coble, J., Lubin, J., Blair, A., Hoppin, J.A., et al., 2009. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environ. Health Perspect.* 117, 581–586.
- Schinasi, L., Leon, M.E., 2014. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 4449–4527.
- Sung, P.A., Libura, J., Richardson, C., 2006. Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair* 5, 1109–1118.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 341, 169–184.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.* 388, 85–95.
- Turkez, H., Aydin, E., 2012. The effects of taurine on permethrin induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 63, 27–34.
- Turner, M.C., Wigle, D.T., Krewski, D., 2011. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Cien. Saude Colet.* 16, 1915–1931.
- Undeğer, U., Başaran, N., 2005. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79, 169–176.
- Vučković, J., Forenpoher, G., Marušić, M., Užarević, B., Sabioncello, A., Štula, N., Dubravčić, M., 1995. Significance of aneuploidy in non-Hodgkin lymphomas. *J. Clin. Lab. Anal.* 9, 343–346.
- Watkins, D.J., Fortenberry, G.Z., Sánchez, B.N., Barr, D.B., Panuwet, P., Schnaas, L., Osorio-Valencia, E., Solano-González, M., Ettinger, A.S., Hernández-Ávila, M., et al., 2016. Urinary 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) levels among pregnant women in Mexico City: distribution and relationships with child neurodevelopment. *Environ. Res.* 147, 307–313.
- Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I., Seo, Y.R., 2015. Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* 20, 12–24.
- Zhang, X., et al., 2012. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 542–549.



Boletín Médico del Hospital Infantil de México

www.elsevier.es/bmhim



REVIEW ARTICLE

Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia[☆]



María del Pilar Navarrete-Meneses, Patricia Pérez-Vera*

Laboratory of Genetics and Cancer, Department of Human Genetics, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

Received 17 October 2016; accepted 8 February 2017

KEYWORDS

Acute lymphoblastic leukemia;
Epigenetics;
Gene expression;
DNA methylation;
Histone modifications;
miRNAs

Abstract Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer. It is well-known that genetic alterations constitute the basis for the etiology of ALL. However, genetic abnormalities are not enough for the complete development of the disease, and additional alterations such as epigenetic modifications are required. Such alterations, like DNA methylation, histone modifications, and noncoding RNA regulation have been identified in ALL. DNA hypermethylation in promoter regions is one of the most frequent epigenetic modifications observed in ALL. This modification frequently leads to gene silencing in tumor suppressor genes, and in consequence, contributes to leukemogenesis. Alterations in histone remodeling proteins have also been detected in ALL, such as the overexpression of histone deacetylases enzymes, and alteration of acetyltransferases and methyltransferases. ALL also shows alteration in the expression of miRNAs, and in consequence, the modification in the expression of their target genes. All of these epigenetic modifications are key events in the malignant transformation since they lead to the deregulation of oncogenes as *BLK*, *WNT5B* and *WISP1*, and tumor suppressors such as *FHIT*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *TP53*, which alter fundamental cellular processes and potentially lead to the development of ALL. Both genetic and epigenetic alterations contribute to the development and evolution of ALL.

© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[☆] Please cite this article as: Navarrete-Meneses MdP, Pérez-Vera P. Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017;74:243–264.

* Corresponding author.

E-mail address: pperezvera@yahoo.com (P. Pérez-Vera).

<https://doi.org/10.1016/j.bmhime.2018.01.004>

2444-3409/© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALABRAS CLAVE

Leucemia
linfoblástica aguda;
Epigenética;
Expresión génica;
Metilación del DNA;
Modificaciones de
histonas;
miRNAs

Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda

Resumen La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de cáncer más frecuente en niños. Aunque se sabe que las alteraciones genéticas constituyen la base de la etiología de la LLA, se ha demostrado que no son suficientes para el desarrollo leucémico; son necesarias alteraciones adicionales, como las modificaciones epigenéticas. En la LLA se han identificado alteraciones de este tipo, como la metilación del DNA, la modificación de histonas y la regulación por RNAs no codificantes. La hipermetilación del DNA en regiones promotoras es una de las alteraciones epigenéticas más frecuentes en LLA: conlleva al silenciamiento de genes que generalmente son supresores de tumor y, en consecuencia, contribuye a la leucemogénesis. También se han detectado alteraciones en proteínas remodeladoras de histonas, como la sobreexpresión de enzimas desacetilasas de histonas, así como alteraciones en enzimas acetil transferasas y metil transferasas. En la LLA también se altera la expresión de miRNAs, lo cual produce desregulación en la expresión de sus genes blanco. Estas modificaciones epigenéticas son eventos clave en la transformación maligna, e involucran la desregulación de oncogenes como *BLK*, *WNT5B* y *WISP1* y de supresores de tumor como *FHIT*, *CDKN2A*, *CDKN2B* y *TP73*, lo que afecta diversos procesos celulares fundamentales que conllevan al desarrollo de LLA. Las alteraciones epigenéticas y genéticas contribuyen en conjunto al desarrollo y evolución de la LLA.

© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Leukemias are the most common pediatric neoplasms; acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent type.¹ Diverse specific genetic alterations have been identified in ALL that lead to the development of this disease.^{1,2} However, it is well recognized that these are not sufficient for leukemic transformation. Therefore, additional events are required.³ Currently, it is known that—in addition to genetic alterations—epigenetic changes are also fundamental in the leukemogenic process.⁴⁻⁶

Epigenetics studies heritable changes that lead to modifications in gene expression, which not imply alterations to the DNA sequence.^{7,8} DNA methylation, histone modification, nucleosome remodeling and regulation of noncoding RNA are among the most studied epigenetic mechanisms (Figure 1).^{9,10} These epigenetic alterations constitute fundamental events in the development of ALL. In this review, the main epigenetic alterations found in ALL are presented and defined. DNA methylation, histone modification like acetylation, microRNA regulation, and genes modified by these mechanisms are included. Although epigenetic alterations are fundamental in ALL of B (ALL-B) and T (ALL-T) lineage in both adults and children, this review is focused mainly on pediatric ALL-B due to the high incidence of this disease in this age group. The study of epigenetic modifications in ALL is of vital importance for knowledge concerning the etiology of the disease, as well as for the search of potential therapeutic targets.^{4,9}

2. Acute lymphoblastic leukemia

ALL is characterized by the uncontrolled proliferation of immature lymphoid cells called lymphoblasts, which predominate in the bone marrow and alter normal

hematopoiesis.^{2,11} ALL affects T or B lineage lymphocytes and occurs in adults and children.¹¹ It is of special relevance in the pediatric stage since it is the most common cancer, representing 25% of the cases. Eighty-five percent of ALL cases in children are of the B precursor type (ALL-B). Pediatric ALL cases are phenotypically and genetically heterogeneous and the etiology has not been completely determined.¹²

ALL has been classified in subgroups according to the presence of genetic alterations, which have a strong influence on the patient's prognosis.¹³ Approximately 75% of pediatric ALL cases present some type of numerical or structural chromosomal alteration.¹⁴ The most common numeric alteration in pediatric ALL is hyperdiploidy¹⁵; translocations are the most frequent chromosomal structural alterations¹⁶. The t(12;21)(p13;q22) translocation generates the fusion of *ETV6-RUNX1* genes and is present in 20-25% of the cases.^{15,16} The t(1;19)(q23;p13) translocation leads to the fusion of *TCF3-PBX1* genes and is present in 5-6% of the cases of pediatric ALL.¹³ The t(9;22)(q34;q11) translocation generates the fusion of *BCR-ABL1* genes and is present in 3% of the cases.^{11,16} Translocations involving the *MLL* gene (*KMT2A*) are detected in 3% of patients between 2-5 years of age and 80% of those under one year of age. Although these genetic alterations are capable of starting the process of leukemogenesis, they are generally not sufficient; hence, additional genetic or epigenetic modifications are necessary for the development and evolution of ALL.¹⁶

3. DNA methylation

DNA methylation is the most studied epigenetic mechanism in ALL.⁴ This modification involves the covalent addition of methyl groups to the carbon 5 of the DNA's cytosine. In mammals, DNA methylation occurs primarily in the sequence

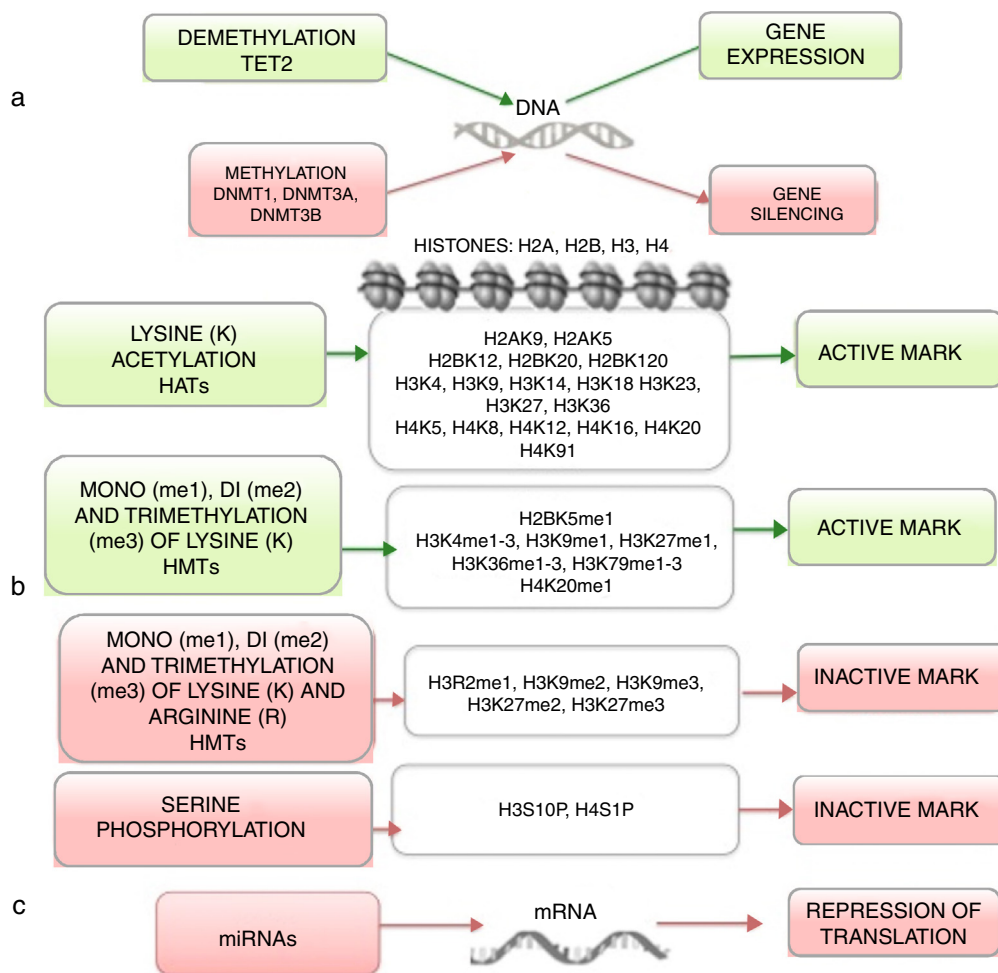


Figure 1 Levels of epigenetic regulation. Epigenetic regulation involves mechanisms such as DNA methylation (a), histone modification (b), and regulation by non-coding RNAs (c). In each case, the conditions under gene expression is induced (green) or silenced (red) are indicated.

5'-CpG-3', known as CpG island.¹⁷ CpG dinucleotides are found in low density throughout the genome; however, there is a high density of this sequence in the promoter regions.¹⁷ Approximately, 70% of the promoter regions in mammals present CpG islands.¹⁰ DNA methylation of the promoting regions generally correlates with gene expression silencing.¹⁷ On the contrary, CpG methylation along the body of the gene promotes elongation during transcription.⁸

The enzymes responsible of adding the methyl groups to the DNA are known as DNA methyltransferases (DNMTs), and at least three have been discovered in eukaryotes.¹⁸ The DNMT1 is in charge of maintaining DNA methylation during replication: it methylates newly synthesized CpG dinucleotides.^{10,18} The DNMT3a and DNMT3b establish, primarily, *de novo* methylation during embryogenesis^{8,10}; additionally, they repair errors by the DNMT1 during DNA synthesis.⁸ In contrast, demethylation of the DNA involves the enzyme TET2 (ten-eleven-translocation 2), which catalyzes the conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine.¹⁹

DNA methylation is one of the most studied epigenetic modifications in cancer. In some types of cancer,

tumor cells show a global hypomethylation of the DNA, which is associated with chromosomal instability, transposon reactivation, and loss of the genomic imprint.^{4,8} In general, cancer cells present hypermethylation of the DNA in promoter regions. It has been reported that abnormal methylation in cancer is present in 5-10% of the normally demethylated promoters.¹⁰ This abnormal hypermethylation can lead to silencing of tumor suppressor genes, and consequently to a neoplastic process.¹⁸ Abnormal hypermethylation not only affects coding gene expression but also noncoding RNA expression, which can contribute to malignant transformation.¹⁰ Alteration of DNA methylation is a highly prevalent event in several types of cancer, including ALL (Figure 2).

3.1. Alterations in DNA methylation in ALL

3.1.1. Directed studies

Numerous studies have established that disruption of DNA methylation has a fundamental role in the development of ALL in both B and T lineages in adults and children. The

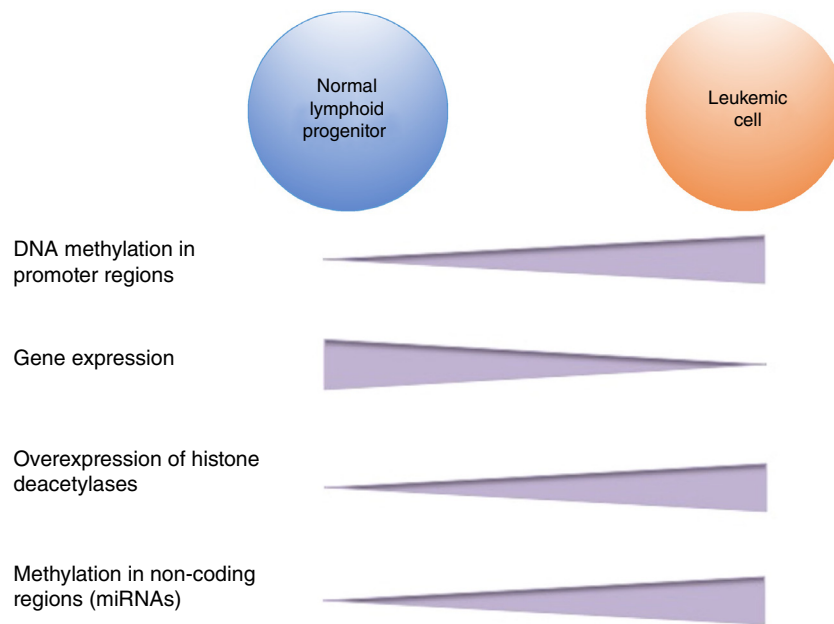


Figure 2 Epigenetic differences between normal lymphoid progenitor cells and leukemic cells.

study of the alterations in gene methylation in ALL has been approached in two ways: through the directed study of specific genes preselected for their importance in ALL and through genome wide studies in which the analysis is not limited to certain genes.²⁰ In most cases, the state of gene methylation has been tied with studies of gene expression. Altogether, these studies have revealed aberrant methylation and expression, mainly simultaneous hypermethylation in multiple genes, which has been defined as a ‘‘methylator phenotype’’. This alteration leads to gene silencing and is a common characteristic of ALL and other types of leukemia in adults and children.^{4,20,21}

Through directed studies, several hypermethylated genes have been found in patients with ALL (Table 1). Some of these include genes such as *TP73*, *FHIT*, *MME* (*CD10*), *TET2*, *sFRP2*, *EFNA5*, *ESR1*, *THBS2*, *CDKN1A* (*p21*), *ABCB1*, *EPHB4*, *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *SYK*, *DAPK1*, *BRINP1* (*DBC1*), *ABL1*, *PTEN*, *sFRP5*, *BNIP3*, *MYOD1*, *CALCA* (calcitonin), *CDKN1C* (*p57*), *DKK3*, *WIF1*, *LATS2*, *EFNB2*, *PPP1R13B* (*ASPP1*), *THBS1*, *CDH1*, *TP53* and *HCK*.^{22–46} Most of these tumor suppressor genes are involved in cellular functions and fundamental signaling pathways, such as those regulating the cell cycle, apoptosis, DNA-damage response, and gene expression (Table 1). Based on the results of these directed studies, several correlations have been observed between the patterns of methylation and the subtypes of ALL have been obtained, as well as the prognosis of the disease.

3.1.2. Genome wide association studies

Genome wide association studies include an extensive analysis of the genome, as well as a greater number of

patients.^{17,20} It is noteworthy that an association between directed studies and great scale analysis has not been found in all cases, possibly due to significant variations in the methodology and the size of the studied population.²⁰

Genome wide association studies have compared samples of patients with ALL-B and leukemic cell lines with non-leukemic tissues and identified numerous changes in DNA methylation, mainly hypermethylation, in all subtypes of ALL-B.^{47,48} Some studies have focused in pediatric ALL or adult ALL and others have analyzed both groups. In most of these studies, patients with ALL-B and ALL-T have been included. Taylor et al. studied a limited number of patients, six children and four adults with ALL-B or T, and identified 11 genes (*DCC*, *DLC1*, *DDX51*, *KCNK2*, *LRP1B*, *NKX6-1*, *NOPE*, *PCDHGA12*, *RPIB9*, *ABCB1*, *SLCA1*) with aberrant methylation (Table 2) in comparison with normal cells of peripheral blood and bone marrow origin. In this study, no differences in methylation between ALL of B and T lineage were found, except in gene *DDX51*, which did not show methylation in ALL-T. Moreover, no differences between adults and children were found.⁴⁹

Kuang et al. analyzed 23 cell lines of lymphoid and myeloid origin (MOLT4, Jurkat, Peer, T-ALL1, CEM, J-TAG, B-JAB, RS4, ALL1, Raji, REH, Ramos, K562, BV173, HL60, NB4, THP1, U937, ML1, OCI, HEL, MOLM13, KBM5R) and identified altered methylation in 65 genes. In 15 of these genes (*GIPC2*, *RSPO1*, *MAG11*, *CAST1*, *ADCY5*, *HSPA4L*, *OCLN*, *EFNA5*, *MSX2*, *GFPT2*, *GNA14*, *SALL1*, *MYO5B*, *ZNF382* and *MN1*) methylation was confirmed by analyzing 61 samples of adults with ALL-B and T (Table 2). The ontological analysis of these genes revealed enrichment of pathways involved in proliferation, cell growth and differentiation, apoptosis, gene expression

Table 1 Hypermethylated genes in acute lymphoblastic leukemia, identified through directed methylation studies.

Gene	Chromosome	Cell function/implicated pathway	Type of patient	Lineage	Reference
<i>TP73</i>	1	p53	P, A	B, T	García-Manero et al., 2003 ²⁹ Kawano et al., 1999 ³¹ Corn et al., 1999 ³² Shen et al., 2002 ³⁸ Gutiérrez et al., 2003 ⁴⁰ Canalli et al., 2005 ⁴¹
<i>FHIT</i>	3	Purine metabolism	P	B, T	Zheng et al., 2004 ³⁰
<i>MME (CD10)</i>	3	NF-kappa B	P, A	B, T	García-Manero et al., 2003 ²⁹
<i>TET2</i>	4	DNA demethylation	P	—	Bahari et al., 2016 ³⁹
<i>sFRP2</i>	4	WNT pathway	P	B <i>ETV6-RUNX1</i>	San José-Enériz et al., 2006 ⁴⁵
<i>EPH/EPHRIN</i> <i>EFNA5</i> family	5	Family of epinephrine receptors and ligands	A	B, T	Kuang et al., 2010 ³⁶
<i>ESR1 (ER)</i>	6	Estrogen receptor and gene transcription	P, A	—	Issa et al., 1996 ³⁵ García-Manero et al., 2002 ²⁴ Shen et al., 2002 ³⁸
<i>THBS2</i>	6	Cell-cell interactions	A	B, T	García-Manero et al., 2002 ²⁴
<i>CDNK1A (p21)</i>	6	Cell cycle	P, A	B, T	Román-Gómez et al., 2002 ³⁷
<i>ABCB1 (MDR1)</i>	7	ABC transporters	P, A	B, T	García-Manero et al., 2003 ²⁹
<i>EPH/EPHRIN</i> <i>EPHB4</i> family	7	Family of epinephrine receptors and ligands	A	B, T	Kuang et al., 2010 ³⁶
<i>CDKN2B (p15)</i>	9	CDK kinases and cell cycle	P, A	B, T	Batova et al., 1997 ²² Wong et al., 2000 ²³ García-Manero et al., 2002 ²⁴ Mai et al., 2016 ²⁵ Shen et al., 2002 ³⁸ Gutiérrez et al., 2003 ⁴⁰
<i>CDKN2A (p16)</i>	9	CDK kinases and cell cycle	P, A	B, T	Batova et al., 1997 ²² García-Manero et al., 2002 ²⁴ Mirebeau et al., 2006 ²⁶ Nakamura et al., 1999 ³⁴
<i>SYK</i>	9	JAK/STAT	P, A	T	Jiménez-Velasco et al., 2005 ⁴³
<i>DAPK1</i>	9	Apoptosis and autophagy	P	B, T	Gutiérrez et al., 2003 ⁴⁰
<i>BRINP1 (DBC1)</i>	9	Cell proliferation and apoptosis	P, A	B, T	San José-Enériz et al., 2006 ⁴⁵
<i>ABL1</i>	9	Cell division, adhesion, differentiation, responses to stress	A	B, T	García-Manero et al., 2002 ²⁴
<i>PTEN</i>	10	Tumor suppressor and AKT/PKB pathway	P	B <i>ETV6-RUNX1</i>	San José-Enériz et al., 2006 ⁴⁵
<i>sFRP5</i>	10	WNT pathway	P, A	T	Jiménez-Velasco et al., 2005 ⁴³
<i>BNIP3</i>	10	Apoptosis	—	—	Murai et al., 2005 ⁴⁶
<i>MYOD1</i>	11	Transcription factor	A	B, T	García-Manero et al., 2002 ²⁴
<i>CALCA (calcitonin)</i>	11	Calcium regulation	P, A	T, B	Roman et al., 2001 ²⁸
<i>CDKN1C (p57)</i>	11	Cell cycle	A	—	Gutiérrez et al., 2005 ⁴²
<i>DKK3</i>	11	WNT pathway	P	B <i>ETV6-RUNX1</i>	San José-Enériz et al., 2006 ⁴⁵
<i>WIF1</i>	12	WNT pathway	P, A	T	Jiménez-Velasco et al., 2005 ⁴³

Table 1 (Continued)

Gene	Chromosome	Cell function/implicated pathway	Type of patient	Lineage	Reference
<i>LATS2</i>	13	Tumor suppressor	P, A	B, T	Jiménez-Velasco et al., 2005 ⁴³
<i>Familia EPH/EPHRIN EFN2</i>	13	Epinephrine family and tyrosine-kinase receptors	A	B, T	Kuang et al., 2010 ³⁶
<i>PPP1R13B (ASPP-1)</i>	14	Apoptosis/p53	P, A	T	Jiménez-Velasco et al., 2005 ⁴³
<i>THBS1</i>	15	Cell-cell interaction	A	B, T	García-Manero et al., 2002 ²⁴
<i>CDH1</i>	16	Cell adhesion	P	B, T	García-Manero et al., 2003 ²⁹
<i>TP53</i>	17	Tumor suppressor, apoptosis and cell cycle	—	B, T	Corn et al., 2000 ³³ Agirre et al., 2003 ²⁷
<i>HCK</i>	20	Tyrosine-kinase Src family	—	B <i>BCR-ABL1</i>	Hoshino et al., 2007 ⁴⁴

* Additional studies did not find aberrant methylation in *CDKN1A* [Ref. 38].
P, pediatric; A, adult; B, B cells; T, T cells.

regulation, DNA replication and repair, signal transduction, transport, and metabolism.⁵⁰

In the study of Chatterton et al., in 2014, levels of expression and methylation in 69 children with ALL-B were associated. Hypermethylation and decreased gene expression in 325 genes was identified, as well as hypomethylation and increased gene expression in 45 genes. These results were compared with 42 non-leukemic bone marrow samples in which these modifications were not found (Table 2).⁵¹ Ontological analysis of these 370 genes showed greater representation of molecular pathways associated with hematologic neoplasms, such as cell to cell signaling and interaction, death and cell survival, as well as cell development. In particular, hypermethylation was found in genes codifying proteins involved in signaling of the glutamate receptor, G-protein signaling, and adenosine-monophosphate (cAMP) mediated signaling; suppression of several proteins involved in the cation transport was also found. Hypermethylation of these genes and its subsequent suppression are indicative of a reduction in the potential of cell-microenvironment interaction, as well as the apoptotic potential. In this study, alterations in methylation of genes associated with the leukemic process were also identified, such as chemokines *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5* and *CXCL6* and cytokines *LTA* and *IL-7*, which genes showed hypo and hypermethylation, respectively. Additionally, 11 dysregulated kinase genes were identified: *BLK*, *DDR1* and *HSPB8*, which showed hypomethylation and overexpression, and *EPHA5*, *ERBB4*, *FGFRDZ*, *KDR*, *MAPKI5*, *MYO3A*, *PAK7* and *PRKD1*, which were found to be hypermethylated and, consequently, silenced. Alterations in factors of the *WNT* signaling pathway were also found: hypomethylation and overexpression of *WNT5B* and *WISP1*, as well as hypermethylation and low expression of *SFRP1*, *PP2A*, and *SOX*. The signature of methylation/expression was common in all ALL

subtypes.⁵¹ This study also analyzed expression signatures dependent on the different subtypes of ALL and a comparison with non-leukemic samples was conducted. The study identified 55, 51, and 13 genes with epigenetic dysregulation associated with subtypes *ETV6-RUNX1*, hyperdiploidy and "other alterations" (this group included patients with fusion of *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL* and *MLL* translocations), respectively (Tables 3–5).⁵¹

Figuroa et al. evaluated patients with ALL with both immunophenotypes. In their study, included 137 children with ALL-B and 30 with ALL-T and identified a signature of 85 genes with alterations in methylation, which correlated with the expression analysis (Table 2). The identified signature was common between all ALL subtypes (B and T) and included genes *TIE1*, *MOS*, *CAMLG*, *GPRC5C*, which are involved in signaling; *MCTS1* and *DGKG*, which participate in regulation of the cell cycle and cell proliferation; *PABPN1* and *PABPC5*, which participate in RNA metabolism; *PROP1*, *TAF3*, *H2AFY2*, *ELF5*, *ZBTB16*, *CNOT1* and *TADA2A*, involved in transcriptional regulation, as well as homeotic genes *HOXA5* and *HOXA6*.⁵² Additionally, this study determined specific methylation and expression signatures characteristic to every ALL-B subtype in children. Seven independent ALL-B groups that presented a characteristic methylation/expression signature, depending on the molecular rearrangement present in each group of patients were identified: rearranged *CRFL2*, *ETV6-RUNX1*, high hyperdiploidy, translocated *MLL*, altered *ERG*, *BCR-ABL1* and *TCF3-PBX1* (Tables 3–5).

The study by Norlund et al., which included a greater number of patients with pediatric ALL (663 children with ALL-B and 101 children with ALL-T), confirmed that each ALL subtype presents with a specific methylation signature. Based on this study, it was proposed that methylation signatures could be useful to predict the genetic subtype

Table 2 Altered methylation/expression profiles in acute lymphoblastic leukemia identified through genome wide association studies.

Study	Studied population	Lineage	Altered methylation genes
Taylor et al., 2007 ⁴⁹	Adults: 4 Children: 6	B and T	11 hypermethylated genes: <i>DCC, DLC1, DDX51, KCNK2, LRP1B, NKX6-1, NOPE, PCDHGA12, RPIB9, ABCB1, SLCA1</i>
Kuang et al., 2008 ⁵⁰	Myeloid and lymphoid cell lines Adults: 61	B and T	15 hypermethylated genes: <i>GIPC2, RSPO1, MAGI1, CAST1, ADCY5, HSPA4L, OCLN, EFNA5, MSX2, GFPT2, GNA14, SALL1, MYO5B, ZNF382, MN1</i>
Figueroa et al., 2013 ⁵²	Children: 167	B (137) and T (30)	85 genes with alterations in methylation, common among all subtypes (73 hypermethylated, 12 hypomethylated*): <i>TIE1, LPPR4, ANP32E, *DQX1, *AUP1, *HTRA2, *KCNJ3, GRM7, CEP97, DNAJC19, SENP2, DGKG, CETN3, CAMLG, PCDHA11, PCDHB17, PCDHB11, PCDHB11, PCDHGA5, PCDHGB3, *GNPDA1, PROP1, CMAH, *HIST1H2BJ, *HIST1H2AG, *HIST1H4I, SMAP1, FUT9, ATG5, SLC22A2, HOXA5, HOXA6, CHCHD2, BPGM, AGPAT6, MOS, SDR16C5, WDR67, WDYHV1, ELAVL2, C9orf25, DNAI1, MCART1, TAF3, KIAA1279, H2AFY2, NDUFB8, C10orf26, GPR26, CCDC34, *ELF5, LRRC4C, ZBTB16, SIAE, SPA17, TMTC1, C12orf44, SKA3, MRP63, DHRS12, OXA1L, PABPN1, SLC8A3, SCG5, TGFB11, CNOT1, SPNS2, ACACA, TADA2A, LSM12, G6PC3, *GPC5C, OSBPL1A, INO80C, ZNF560, ZNF582, DDRGK1, ITPA, PTPRT, *OK/SW-cl.69, MAP7D2, GSPT2, PABPC5, MCTS1, MGC16121</i>
Chatterton et al., 2014 ⁵¹	Children: 69	B	370 genes with alteration in methylation (325 hypermethylated, 45 hypomethylated*) common among all subtypes: <i>ZFP112, ZFP42, ZNF285, ZNF300, ZNF385D, ZNF677, ZFP37, ZNF560, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, ADRA1A, ADRA2C, AGTR1, CASR, FPR2, FZD9, GALR1, GPR126, GPR26, GPR37, GPR6, GPR77, GRM1, GRM7, HTRA4, LHCGR, OPRM1, P2RY2, *PTAFR, PTGFR, QRFPR, SSTR1, GRIA2, GRIA4, GRIK1, GRIK2, GRIK3, KCNB1, KCNB2, KCNG1, KCNH7, KCNK1, KCNK5, KCNN2, *KCNQ4, TRPC1, TRPC4, TRPM3, SLC19A3, SLC1A1, SLC22A3, SLC24A3, SLC34A2, SLC44A4, SLC5A7, SLC6A1, SLC6A15, SLC6A2, PCDHB15, PCDHB2, PCDHB3, PCDH20, CDH6, CDH8, IL1RN, IL7, *LTA, ACADL, BHMT, CASD1, CYP24A1, CYP7B1, DHCR24, DPYS, DPYSL4, ELOVL4, EPHX2, GALNT11, GCNT2, GDA, LPL, LRAT, ME1, NMNAT3, *NOX3, PDE10A, PDE1C, PDE4B, PDE4C, PLOD2, PNPLA3, PRTFDC1, PTGS2, RGS7, SMPD3, ST6GAL2, UGGT2, CHI3L2, EFEMP1, KL, LYZ, PDZRN3, PLA2G7, POGLUT1, SMPDL3A, *DNTT, RFX6, ABO, ADCY2, *ENPP3, ENTPD3, GNA14, SH3GL2, MACROD2, HS6ST3, BMP7, FGF10, FGF12, GRP, KITLG, NELL1, PTN, NRG1, PEX5L, *VDAC3, CACNA1A, CACNA1D, CFTR, GABRA2, GLRB, GPM6A, HCN1, RYR2, NALCN, *BLK, *HSPB8, PRKD1, MYO3A, MAPK15, PAK7, *DDR1, EPHA5, ERBB4, FGFR2, KDR, NR2F2, PGR, THRB, *ARPP21, *EVL, *FGD2, *KISS1, *S100A2, *SORBS3, *SPRR4, *DEFB129, *MBP, *SFTPB, *WISP1, *WNT5B, *INTS1, *TCL1A, *CLDN15, *GP9, *LY9, *RPH3AL, *XIRP1, *ASB10, *FAM49A, *KLHDC7A, *SH2D4B, *SRBD1, ACTA1, DES, HSPA2, MT2A, NEFM, NEFH, SLPI, VSNL1, LIN7A, TOM1L1, CPLX2, RAB32, ERC2, PDLIM3, STXBP6, GULP1, PARVA, PARVG, NOD2, PREX2, CTTNBP2, RHPN2, PRKCDPB, SPATA18, SPTSSB, ADCYAP1, CBLN4, COL14A1, CYR61, FAM19A4, FAM20A, FSTL5, IGFBP3, LAMA1, LAMA2, MAMDC2, MATN2, NPTX2, RLN1, RLN2, SASH1, SCG3, SEMA3C, SERPINA1, SST, TAC1, TGFB1, TMEM45B, VSTM2A, ZPBP2, ACTL6B, CENPH, KIF6, MIPOL1, MLF1, NOL1, NOL2, PRDM5, SNRPN, SYCP1, TDRD5, CADM1, CD8B, CDCP1, CLDN11, CNTNAP2, CTNND2, DSCAML1, EPB41L3, FLRT2, LSAMP, MARVELD3, NTM, PCDH8, PKP2, STEAP4, SYN2, THEM4, TPBG, ALS2CR11, C10orf107, C11orf70, C1orf115, C20orf197, C3orf14, C6orf118, C7orf63, CCDC37, CWH43, EFCAB1, FAM83A, FAM84A, FBXO39, FEZF2, FIBIN, LCA5, LPPR1, LRIG3, PHF21B, RBM47, SLC35F3, TMEM171, TMEM74, TSPYL5, TTC22, UNC80, WDR17, XKR6, CTSG, EPHX1, ADAM12, ADAMTS18, ADAMTS5, CPXM2, HP, PAPP, PCSK1, PCSK2, PRSS12, TLL1, EYA4, PPP2R3A, CDC14B, PTPRO, PTPRZ1, LPPR4, ACTN2, BHLHE22, BNC1, DMRT1, DMRT2, DMRT3, EGR4, FOXA2, FOXG1, GATA4, GCM2, GSC2, HLF, HOXA2, HOXD1, HOXD11, ID4, IRF6, KLF1, *LIMD1, MSX2, MYF5, NACC2, NFE2, NFIB, NKX2-1, NPAS2, ONCUT2, OTX2, OVOL2, PAWR, *POU2AF1, POU4F3, PROX1, PRRX1, SCRT1, SIX1, SNCAIP, SOX1, SOX14, SOX17, SOX9, *TCF3, TLX3, TP73, WWC1, WWTR1, YAP1, ZIC1, EIF5A2, *ANXA9, CXADR, DCC, *ENG, FCGR2A, GPC6, *LRP8, *SCARF1, SFRP1, *HBZ, *SNX8, TF, UPF3A, SORCS3, ATP8A2, *LBP PDPN, SNAP25, SYT9, FAM164A, MOSC2</i>

B, B cells; T, T cells.

Table 3 Methylation profile of the ETV6-RUNX1 subtype in pediatric ALL-B.

Hypermethylated genes	Reference
NRG1, KCNC3, RAB37, COL7A1, VIPR2, NIPAL1, GREM1, TM6SF1, MTX2, DPP4, DOCK5, SYT17, WWTR1, ITGAX, TMEM144, ASNS, MYO3A, GUCY1B2, CHD5, ITGB5, PAX7, CD44, RAB6B, PI4K2A, ADRA1D, FAM123A, STBD1, OVOL2, RNF207, CRABP1, CDC42BPB, L3MBTL4, KIAA0020, MPZL3, PRICKLE1, ADPRH, PDCD1LG2, SLC02A1, FXYD6, VAX2, GSX2, SYT12, TMEM67, SLAMF8, CTTN, LPXN	Chatterton et al., 2014 ⁵¹
MYO1E, STBD1, OPHN1, HOXD1, WWTR1, SOX3, SNAI3, ZNF462, C4orf31, LRRC55, ST6GALNAC4, C21orf15, ALX1, GUCY2D, FOXA2, ZNF462, SIGLEC9, MTMR11, RIN1, PDE3A, UCN2, KCNN2, NKX2-8, PDK4, NHS, HOXD1, TNFRSF9, NEFL, C20orf165, NEURL2, CTSA, BMP7, SLC35B1, ITIH4, MUSTN1, SLC2A5, MEV, PLD4, CXCR3, DARC, C9orf79, STBD1, PDK4, UCN2, SRGN, DBX2, C10orf116, AGAP11, ZNF215, BGLAP, PCDHGB4, PCDHGA8, BMP7, PJA2, GPR50, ESX1, KRT80, ZNF804A, TFCP2L1, GNPAT1, OGG1, ADCY3, CBLN4, CHAT, SLC18A3, PLEKHG4, WNT2, C20orf165, NEURL2, CTSA, GPR123, SYT15, FCN1, BDNF, FBXW5, C8G, C14orf49, EFEMP1, BBC3, LEPREL2, PCDHGB2, PCDHGA5, PCDHGB3, CRYBB3, PTMS, LAG3, FAM190A, EIF2C2, PCDHGA5, PCDHGB3, NEFM, CCBL1, LRRC8A, TUB, TJP1, LIMD1, PPAR, MGC16703, P2RX6, FBXW5, C8G, ZNF296, GEMIN7, GRIA3, NOS3, GABRE, RTDR1, RAB36, ZNF19, MSX2, TSEN2, PRDM11, EPHA5, GPR81, S100A9, EIF6, RPL9, LIAS, SCARF2, CUEDC1, DOK5, HECW1, GPR126, PRKAG3, MARCKSL1, HIST3H2A, HIST3H2BB, SIAE, SPA17, MAGEB6, C14orf49, DAAM2, EIF2C1, TSPAN15, MSRB3, ITGAE, HLF	Figuroa et al., 2013 ⁵²
GRHL3, CTTN	Nordlund et al., 2015 ⁵³
CLIC5, ACVR1C, IGF2BP1, DSC2, POLO	Lee et al., 2015 ⁵⁵
Hypomethylated genes	
SLC35B3, EPOR, BEST3, APOBEC3A, MPP7, TMED6, TRIM69, ALPK1, MPP7, CRYBB3	Chatterton et al., 2014 ⁵¹
MIB1, GFAP, TMED6, TPMT, KDM1B, GFAP, E2F6, DRD5, NCKAP1, CSTF3, HTR3C, HTR3C, FUC1, DNAJC10, B4GALT3, BEST3, CALD1, SIDT1, LRRC4, GNB4, FCHSD2, ABHD3, RAD50, KCNK15, PIK3CG, LRRC4, C22orf24, YWHAH, RRAGA, NACA, VPS13C, SH2D3A, VAV1, C12orf49, RNFT2, ITS2, TREML1, PRSS1, RAB3GAP1, MRPS15, ATF7, TNK1, ETV7, HLA-DQA1, ERLIN2, ST7L, CAPZA1, TUSC3, BAT2D1, LOC100127888, EID3, TSPYL1, DSE, ISG20, UFC1, ZNF143, SPEM1, C17orf74, C9orf40, MOBKL3, CAB39L, SETDB2, CSTF3, SLC35B3, ATP5J, GABPA, KCTD17, KLHDC5, TOR1AIP2, TOR1AIP1, CIITA, C12orf23, USP6NL, DHRS13, APOBEC3A, CCNI, TOPORS, EPM2AIP1, MLH1, FUT11, TIMM17B, PQBP1, SAA1, THOC7, ATXN7, SIRT2, ZCCHC3, PBXIP1, IRAK3, RAD51L3, FNDC8, TAP1, PSMB9, ISG20, ARHGAP24, PNRC1, DNAJC10, YARS, S100BP, BTN3A2, RTP4, ELOVL5, DAXX, GAR1, LIMS2, GPR17, SERPINE1, YARS, S100BP, ZNF644, POMP, RNF113A, NDUFA1, VWA5B2, CTCF, USHBP1, C19orf62, GAB1, C18orf56, TYMS, GABBR1, WDFY3, C4orf12, PRR5L, POLR3B, SPOP, VRK2, HABP4, NUP107, DLGAP2, ZNF566, C1orf59, TMEM127, CIAO1, RECQL4, LRRC14, HORMAD2, PIK3IP1, GLO1, CNR2, FAM71E1, C19orf63, TOR2A, BRWD1, SHE, TDRD10, CDC2L5, C21orf58, PCNT, MRE11A, ANKRD49, ERICH1, HLA-C, CHERP, TRIM9, CMTM2, CCDC62, HSPA8, SMC1B, RIBC2, PDE4DIP, ARHGAP25, USP49, GF11, NOS1AP, UCP2, CLINT1, GGNBP2, RNF141, EXTL3, EXOSC9, SFT2D3, SEP15, HS2ST1, CACNA11, ALG9, IKBIP, APAF1, SH2D4B, RAB33B, CLIP1, LOC344967, N4BP2, LOC100127888, LOC492303, ZNF326, FGFR4, HSPB11, LRRC42, HIST1H1C, ARF1, DHRS13, DSC3, SRGAP3, C6orf170, TAF6, CNPY4, MBLAC1, RAB37, CITED2, COG8, NIP7, NDUFA8, MORN5, SRP9, ZNF616, MTA3, FNBP4, GNGT2, ABI3, PELI3, ZNF423, CHDH, IL17RB, PPAT, PAICS, RASAL1, SRGAP3, CST8, ARF6, DIRAS2, LOC100128164, SEC62, MRPS36, FAIM, RAG2, C11orf74, USP50, GPR146, RAB31L1, ARPP-21, HPS4, SRRD, UBE2J1, KRAS, C14orf142, UBR7, PTPRB, MAN1A2, VPS13B, MLL2, ZFP161, ZC3H7A, CD79B, EBF4, HNRNP, RMI1, STRBP, OSGEP, APEX1, LOC100128164, SEC62, SMCHD1, SYNGR1, FLJ25006, LOC645851, SENP6, MAP1LC3A, C1orf156, C1orf112, CTHRC1, SCAP, C1QL4, ERCC6, ATPAF2, C17orf39, CALD1, PIK3C3, PAX6, WIPF1, COCH, KCNA3, MTMR10, RAB8B, CANT1, MANBA, POU5F1, RHBDL3, TIAL1, PIAS2, KPNA4	Figuroa et al., 2013 ⁵²
SES2, E2F6, RP11-363D14.1, AC131097.3, XIRP1, ZDHHC3, RP11-803B1.2, SIDT1, RP11-71E19.2*, APBB2, KIF2A, DUSP1, RP11-274H24.1, TBC1D7, ZNF90P2, CUX1, ERICH1, ERICH1-AS1, ZNF704, FARP1, TMED6, CBFA2T3, IGF2BP1, AXIN2, MIB1, DSC3, EPOR, TCFL5	Nordlund et al., 2015 ⁵³
SOX11, SPSB1, BEST3, SIDT1, TCFL5, CHL1, FAM19A	Busche et al., 2013 ⁵⁹

Table 5 Methylation profile of other subtypes of pediatric ALL-B.

Subtype	Methylation profile	Reference
Translocated <i>MLL</i> , <i>BCR-ABL</i> and <i>TCF3-PBX1</i>	Hypermethylated genes: <i>WWC1</i> , <i>NELL1</i> , <i>SEMA3C</i> , <i>FGFR2</i> , <i>ARNT2</i> , <i>NRG1</i> , <i>FBN2</i> , <i>KCNC3</i> , <i>SSH3</i> , <i>DSC3</i> , <i>CYB5R2</i> Hypomethylated genes: <i>CHST12</i> , <i>LSP1</i>	Chatterton et al., 2014 ⁵¹
Translocated <i>MLL</i>	Hypermethylated genes: <i>ZAP70</i> , <i>XYLT2</i> , <i>HLA-B</i> , <i>EDEM1</i> , <i>UBXN11</i> , <i>CD52</i> , <i>C14orf43</i> , <i>HLA-C</i> , <i>MICALL1</i> , <i>C14orf43</i> , <i>PRKCH</i> , <i>TP53I11</i> , <i>GHRL</i> , <i>SNORD10</i> , <i>SNORA67</i> , <i>CD68</i> , <i>MPDU1</i> , <i>ITIH3</i> , <i>CMTM2</i> , <i>PTPRE</i> , <i>MOV10</i> , <i>GUK1</i> , <i>LOC100128164</i> , <i>SEC62</i> , <i>IFITM2</i> , <i>SELO</i> , <i>TOR2A</i> , <i>C3orf37</i> , <i>CD79B</i> , <i>VWA5B2</i> , <i>CD74</i> , <i>C22orf26</i> , <i>LOC150381</i> , <i>ARF1</i> , <i>SORBS3</i> , <i>APPL2</i> , <i>AK1</i> , <i>CCDC102A</i> , <i>GPR114</i> , <i>KPTN</i> , <i>PPP1R14B</i> , <i>PLCB3</i> , <i>KCNK3</i> , <i>LRRC15</i> , <i>ITPRIP</i> , <i>GAB1</i> , <i>PPP1R14B</i> , <i>PLCB3</i> , <i>GP9</i> , <i>CACNB3</i> , <i>FOXN3</i> , <i>FDX1L</i> , <i>AFF3</i> , <i>SNORA77</i> , <i>PRX</i> , <i>CLINT1</i> , <i>UCKL1</i> , <i>UCKL1A5</i> , <i>CAMTA2</i> , <i>FTSJ2</i> , <i>NUDT1</i> , <i>TMEM220</i> , <i>DLGAP2</i> , <i>AMIGO3</i> , <i>GMPPB</i> , <i>KPTN</i> , <i>ANKRD13D</i> , <i>NINJ1</i> , <i>SSTR2</i> , <i>PPP1CA</i> , <i>TBC1D10C</i> , <i>SIK1</i> , <i>SBSN</i> , <i>GAPDHS</i> , <i>PRKCB</i> , <i>IL2RA</i> , <i>KLHDC7A</i> , <i>DEGS1</i> , <i>LIMD1</i> , <i>AK1</i> , <i>CTCF</i> , <i>ZNF267</i> , <i>CCR6</i> , <i>ANGPT4</i> , <i>DENND3</i> , <i>LTB</i> , <i>LST1</i> , <i>MDC1</i> , <i>TUBB</i> , <i>FLJ42393</i> , <i>MCF2L</i> , <i>C1R</i> , <i>HPCAL1</i> , <i>C21orf84</i> , <i>SPAG8</i> , <i>HINT2</i> , <i>SLC19A1</i> , <i>PLA2G4D</i> , <i>NLRP12</i> , <i>GUK1</i> , <i>PRSS27</i> , <i>LSM7</i> , <i>SPPL2B</i> , <i>GADD45B</i> , <i>TMEM220</i> , <i>TMEM204</i> , <i>ANKRD13D</i> , <i>CTDSP2</i> , <i>SH2D4B</i> , <i>STK32C</i> , <i>EFNA3</i> , <i>ANGPT4</i> , <i>SPIB</i> , <i>IRAK3</i> , <i>NDUFB11</i> , <i>RBM10</i> , <i>APP</i> , <i>ARHGAP27</i> , <i>TMEM129</i> , <i>TACC3</i> , <i>SMTN</i> , <i>SPAG8</i> , <i>HINT2</i> , <i>DNAJC10</i> , <i>S100A13</i> , <i>S100A1</i> , <i>NUP107</i> , <i>HIRA</i> , <i>MRPL40</i> , <i>TENC1</i> , <i>OAF</i> , <i>C7orf61</i> , <i>DBNDD1</i> , <i>RPS11</i> , <i>SNORD35B</i> , <i>HSPA8</i> , <i>TAP1</i> , <i>PSMB9</i> , <i>RPAP1</i> , <i>REPIN1</i> , <i>NUDT8</i> , <i>DNTT</i> , <i>STRN4</i> , <i>FKRP</i> , <i>LTA</i> , <i>TNF</i> , <i>TMCO4</i> , <i>HABP4</i> , <i>NCK2</i> , <i>SSTR2</i> , <i>USP50</i> , <i>CXCR5</i> , <i>GYPC</i> , <i>XYLT2</i> , <i>B3GAT3</i> , <i>SIRT2</i> , <i>ARHGAP24</i> , <i>S100A13</i> , <i>S100A1</i> , <i>BCL7C</i> , <i>CTF1</i> , <i>COG8</i> , <i>NIP7</i> , <i>PTPN18</i> , <i>ZFP161</i> , <i>SLC27A2</i> , <i>PPP1R3E</i> , <i>BCL2L2</i> , <i>ITIH3</i> , <i>LOC401431</i> , <i>ATP6V0E2</i> , <i>STK32C</i> , <i>RAB37</i> , <i>MYO7A</i> , <i>GUK1</i> , <i>GJC2</i> , <i>PCNA</i> , <i>CDS2</i> , <i>STK38</i> , <i>HSPB11</i> , <i>LRRC42</i> , <i>STAB1</i> , <i>GP9</i> , <i>NCLN</i> , <i>RGS14</i> , <i>C21orf84</i> , <i>SERPINE1</i> , <i>COG3</i> , <i>CPNE7</i> , <i>BTK</i> , <i>RPL36A</i> , <i>SGPL1</i> , <i>MRPS15</i> , <i>PIK3CG</i> , <i>CRAT</i> , <i>PPP2R4</i> , <i>MDM4</i> , <i>IL3</i> , <i>MLL2</i> , <i>C1orf231</i> , <i>MMACHC</i> , <i>LOC401431</i> , <i>ATP6V0E2</i> , <i>CD22</i> , <i>FFAR1</i> , <i>MAP6D1</i> , <i>BCL7C</i> , <i>CTF1</i> , <i>TMEM127</i> , <i>CIAO1</i> , <i>CNR2</i> , <i>PXK</i> , <i>STX17</i> , <i>ADCK4</i> , <i>ITPKC</i> , <i>CPNE7</i> , <i>CD79B</i> , <i>SHARPIN</i> , <i>MAF1</i> , <i>KIAA1875</i> , <i>IL3</i> , <i>PELI3</i> , <i>SIGLEC15</i> , <i>C3orf42</i> , <i>GHROS</i> , <i>NUP205</i> , <i>MAP6D1</i> , <i>PRDM8</i> , <i>DHRS13</i> , <i>FASN</i> , <i>MUPCDH</i> , <i>SCT</i> , <i>LOC100127888</i> , <i>GRINA</i> , <i>RFTN1</i> , <i>IP6K1</i> , <i>AKAP8L</i> , <i>NCRNA00095</i> , <i>FBXL19</i> , <i>MTHFR</i> , <i>CLCN6</i> , <i>C22orf26</i> , <i>LOC150381</i> , <i>PIP4K2A</i> , <i>LOC100128164</i> , <i>SEC62</i> , <i>DAXX</i> , <i>CYFIP2</i> , <i>TNF</i> , <i>LTB</i> , <i>GANAB</i> , <i>INTS5</i> , <i>CLDND2</i> , <i>NKG7</i> , <i>CD37</i> , <i>C12orf49</i> , <i>RNFT2</i> , <i>POU2AF1</i> , <i>SOX15</i> , <i>ZNF366</i> , <i>TMEM127</i> , <i>CIAO1</i> , <i>SFN</i> , <i>LOC100127888</i> , <i>KRTAP5-8</i> , <i>SUV39H2</i> , <i>FAM189B</i> , <i>TIMM17B</i> , <i>PQBP1</i> , <i>ANKS6</i> , <i>TERT</i> , <i>KDM4B</i> , <i>C9orf116</i> , <i>MRPS2</i> , <i>GRINA</i> , <i>ZNRF3</i> , <i>POMP</i> , <i>MAG</i> , <i>MYL4</i> , <i>RHOH</i> , <i>DNAJC10</i> , <i>UGT3A2</i> , <i>BTN3A2</i> , <i>C22orf24</i> , <i>YWHAH</i> , <i>ZNF566</i> , <i>TINAG</i> , <i>ZFH3</i> , <i>PBXIP1</i> , <i>TGM6</i> , <i>S100A13</i> , <i>S100A1</i> , <i>ACTRT2</i> , <i>ALPLP2</i> , <i>WIPF1</i> , <i>RECQL4</i> , <i>LRRC14</i> , <i>NCKIPSD</i> , <i>R3HCC1</i> , <i>RAB24</i> , <i>PRELID1</i> , <i>SOX15</i> , <i>LY6G6E</i> , <i>LY6G6D</i> , <i>HPS4</i> , <i>SRRD</i> , <i>CANT1</i> , <i>ADM2</i> , <i>MIOX</i> , <i>ATP2B3</i> , <i>SNORA67</i> , <i>CD68</i> , <i>MPDU1</i> , <i>FLJ25006</i> , <i>LOC645851</i> , <i>C21orf129</i> , <i>NCRNA00112</i> , <i>LEPREL2</i> , <i>LTB</i> , <i>LST1</i> , <i>GPER</i> , <i>DHRS13</i> , <i>MUC4</i> , <i>COG3</i> , <i>GNB4</i> , <i>RANBP9</i> , <i>DCUN1D2</i> , <i>TMCO3</i> , <i>RAB33B</i> , <i>ST6GALNAC3</i> , <i>C1QTNF4</i> , <i>STBD1</i> , <i>POLD1</i> , <i>LRRC6</i> , <i>GFAP</i> , <i>LRNF2</i> , <i>MTMR10</i> , <i>FITM1</i> , <i>PSME1</i> , <i>SFT2D1</i> , <i>CBLN3</i> , <i>KHNYN</i> , <i>DAPK3</i> , <i>HBEGF</i> , <i>SIDT1</i> , <i>FUCA1</i> , <i>CSDA</i> , <i>C14orf49</i> , <i>VKORC1</i> , <i>CISH</i> , <i>MAPKAPK3</i> , <i>RAB11FIP1</i> , <i>GFAP</i> , <i>KRTAP12-1</i> , <i>ITSN2</i> , <i>CIZ1</i> , <i>DNM1</i> , <i>TMED6</i> , <i>MAN2A2</i> , <i>MAP1LC3A</i> , <i>SORL1</i> , <i>RAG2</i> , <i>C11orf74</i> , <i>TIMM13</i> , <i>KLHDC5</i> , <i>CDH3</i> , <i>TBX2</i> , <i>ERCC1</i> , <i>NPR2</i> , <i>DAPK1</i> , <i>CCR6</i> , <i>HRK</i> , <i>LIFR1</i> , <i>DLX3</i> , <i>FHIT</i>	Figueroa et al., 2013 ⁵²
	Hypomethylated genes: <i>GUCY1A3</i> , <i>JMJD1C</i> , <i>LOC84989</i> , <i>BAZ2B</i> , <i>PRF1</i> , <i>RUNX3</i> , <i>PRF1</i> , <i>MAP7</i> , <i>RHOBTB3</i> , <i>RUNX3</i> , <i>LARGE</i> , <i>SLC25A18</i> , <i>ITGAE</i> , <i>FLT3</i> , <i>NPR1</i> , <i>FAM65B</i> , <i>PTGR1</i> , <i>ACSL1</i> , <i>MEF2C</i> , <i>TRPV3</i> , <i>SKA1</i> , <i>CNKSR2</i> , <i>H1FO</i> , <i>GCAT</i> , <i>F3</i> , <i>MTHFD2L</i> , <i>TLR7</i> , <i>ARRDC4</i> , <i>DAPK1</i> , <i>PSMB5</i> , <i>TMEM41B</i> , <i>LOC100303728</i> , <i>SLC25A5</i> , <i>ZNF367</i> , <i>FLT3</i> , <i>LOH12CR2</i> , <i>LOH12CR1</i> , <i>PHLPP1</i> , <i>SERPINB13</i> , <i>OR6V1</i> , <i>PRDM11</i> , <i>CD3D</i> , <i>CD3G</i> , <i>SEN6</i> , <i>TRAK2</i> , <i>STRADB</i> , <i>ASTN2</i> , <i>TRIM32</i> , <i>SETBP1</i> , <i>IGF2BP2</i> , <i>TFCP2L1</i> , <i>CENPF</i> , <i>MPP5</i> , <i>C7orf13</i> , <i>RNF32</i> , <i>PSMB5</i> , <i>C7orf13</i> , <i>RNF32</i> , <i>CD180</i> , <i>PARP8</i> , <i>RBKS</i> , <i>LOC100302650</i> , <i>BRE</i> , <i>ARID1B</i> , <i>C6orf122</i> , <i>C4orf19</i> , <i>MGC16703</i> , <i>P2RX6</i> , <i>OLFML3</i> , <i>IQSEC1</i> , <i>MYST2</i> , <i>KRTAP10-6</i> , <i>PDPN</i> , <i>NID1</i> , <i>CPD</i> , <i>LCE3A</i> , <i>SSR1</i> , <i>CDKL3</i> , <i>UBE2B</i> , <i>PAPOLA</i> , <i>ANKRD27</i> , <i>RG59BP</i> , <i>HTR7</i> , <i>DES</i> , <i>FAM5B</i> , <i>CDC14B</i> , <i>GPR153</i> , <i>SPOCK2</i> , <i>ITGAE</i> , <i>LECT2</i> , <i>SERPINB8</i> , <i>ZAR1L</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CAMTA1</i> , <i>C9orf100</i> , <i>ALDH4A1</i> , <i>C17orf64</i> , <i>KRT81</i> , <i>LILRB4</i> , <i>MRPS25</i> , <i>ASB8</i> , <i>SLC25A38</i> , <i>TRAS</i> , <i>MYOD1</i> , <i>DKK3</i> , <i>PPP1R3B</i> , <i>BDNF</i> , <i>CCBL1</i> , <i>LRRC8A</i> , <i>RASGRF2</i> , <i>GRIK5</i> , <i>KCNJ10</i> , <i>FAIM</i> , <i>MTMR11</i> , <i>PEA15</i> , <i>SBF2</i> , <i>HECW1</i> , <i>WDYHV1</i> , <i>PHLDB2</i> , <i>GINS3</i> , <i>PDE4DIP</i> , <i>KDM5B</i> , <i>ZNF256</i> , <i>PHLDB1</i> , <i>ZSCAN18</i> , <i>ZNF256</i> , <i>ZNF329</i> , <i>ZNF544</i> , <i>ZNF681</i>	Stumpel et al., 2009 ⁶⁰ ; Schafer et al., 2010 ⁶¹
		Figueroa et al., 2013 ⁵²
		Nordlund et al., 2013 ⁵³

Table 5 (Continued)

Subtype	Methylation profile	Reference
BCR-ABL	<p>Hypermethylated genes: KIAA1949, NRM, MUPCDH, SCT, ATP2A1, FASN, DPM2, PGLS, MYEOV, DUSP5, MARCKSL1, ANKRD27, RGS9BP, ADCK5, FOXH1, C11orf16, DIRAS1, MRPL24, DCST2, DCST1, CCDC71, INPP5E, SLC22A20, GPR146, PLEKHM2, PROC, DIRAS1, ALDH4A1, WFIKKN2, IL11, LIMS2, GPR17, GRINA, LILRB4, C19orf59, TRAPPC5, CD38, LOC100129637, PRPH, LOXL4, KLHL24, ARHGAP27, GPR146, SSR1, C19orf59, TRAPPC5, C17orf61, NLGN2, C9orf116, MRPS2, DLG4, ACADVL, TLR9, STOML1, PML, KLF13, KCNK17, KLC1, ARHGAP30, C8ORFK29, FBXL6, GPR172A, DLG4, ACADVL, TAF6, CNPY4, MBLAC1, C9orf69, AURKC, PCOLCE, PTMS, LAG3, DNM1P35, GRINA, BSCL2, GNG3, CCL25, TEX19, CDH5, TLR9, CDK5, SLC4A2, GUK1, C9orf116, MRPS2, S100A13, S100A1, FXYD2, GPR153, LOC100129637, FLJ90757, BAIAP2, IP6K3, KLF6, LPAR2, UCN2, KCTD11, TMEM95, TFR2, C14orf70, CARHSP1, KLF13, CCDC96, TADA2B, LIMS2, GPR17, COL1A1, ARID3A, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, SIRT2, WFIKKN2, ZNF296, GEMIN7, RFNG, GPS1, SLC26A8, MAPK14, FAM176B, CCBL1, LRRC8A, KCNK17, KCNAB3, TRAPPC1, CNTROB, MAGIX, PCDH12, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, C16orf59, C9orf69, SP100, LACE1, C17orf64, CSF1R, MUC4, C1QL4, KCNAB3, TRAPPC1, CNTROB, GRB7, CLDN4, CARD9, ATP1A3, C1orf220, GUK1, FAM109B, C22orf32, CLTB, HSF2BP, RRP1B, GABBR1, B3GNT5, ITIH3, LOC26102, GPSM1, UBXN6, SH3D20, SIGLEC7, EDC4, CCR7, ACTRT2, CTXN1, RAB3IL1, DNAJC4, VEGFB, ADM2, MIOX, TUBB2A, SSX2IP, C16orf81, LIMS2, GPR17, ZNF48, PKNOX2, GRASP, PECR, TMEM169, NTN5, C9orf103, CACNA11, BTG2, ADRA1D, DHRS13, THEM4, MT1L, PHLDB2, PDE4DIP, IL25, CMTM5, LIF, KLHDC5, PITPNM3, GALP, FAM109B, C22orf32, PIGZ, PRDM11, CNTN2, MIB1, BSN, MOCOS, DRD5, COL1A2, KIAA1257, LYPD4, DMRTC2, POU5F1, RASL11B, GFAP</p> <p>Hypomethylated genes: GBA2, RGP1, DPP3, C11orf30, ECHDC1, ZEB2, INHBE, GLI1, INTU, WBP11, C12orf60, STARD3NL, C21orf59, FGF6, ITGA2, FBXW7, OIP5, NUSAP1, C6orf47, BAT4, CSNK2B, RPS13, RPL4, SNORD18C, SNORD18B, SNORD16, SNORD18A, ZWILCH, CCDC115, IMP4, POLR1E, C22orf26, LOC150381, ANG, RNASE4, SRBD1, GIMAP5, C1orf183, SLC25A28, TRIB3, CTNNA2, STBD1, C22orf26, LOC150381, IQGAP2, RHBDD3, EWSR1, CSDA, C3orf42, GHRL0S, CYP1B1, GPR6, MFI2, TTC23L, OGFRL1, LRRTM1, CCDC70, C5orf43, NKX2-1, ADAMTS12, NDUFC1, NARG1, TUBA4A, TUBA4B, CLIC2, TMEFF2, KIAA0087, UGGT2, CACNA1B, PRPF8, PJA2, CXCL12, SLC20A1, ACSBG1, CA6, PDZRN3, RTDR1, RAB36, ROBO4, BRDT, PROX1, COL14A1, FLJ14107, ATOH1, NLGN4X, SLC35A1, LRIG3, LANCL1, CPS1, HOXD1, KCNN2, PCNA, CDS2, IL2RA, ZNF264, PCDHGB7, PCDHGA11, GAB1, FGF5, SALL3, CISH, MAPKAPK3, C15orf24, PGBD4, SFN, RIC3, FAM190A, LIMD1, MTMR11, EPHA5, IRX2, C5orf38, ZNF804A, HIPK2, TBXAS1, TINAG, BPNT1, IARS2, MSX2, GLIPR1L2, PRDM8, BDNF, MTERFD2, HOXD1, LRFN5, CDCA5, ZFPL1, MAL2, CDH8, CD22, PCDHB18, PCDHB19P, KCNK13, PKD2L2, GZF1, PDPN, VKORC1, DAXX, FOXQ1, TNFRSF9, MRPL1, TRIM13, UCHL5, TROVE2, EFR3A, SLC39A1, CREB3L4, WIPF1, XYLT2, CPVL, RAG2, C11orf74, PCDHB7, PCDHB8, BCL2L13, METTL8, DCAF17, LRP11, CHMP4C</p>	<p>Figueroa et al., 2013⁵²</p> <p>Figueroa et al., 2013⁵²</p>
TCF3-PBX1	<p>Hypermethylated genes: FNBPA, CLDND2, NKG7, ARPP-21, SOCS2, NCK2, ARHGEF6, GNA13, TLR1, TMEM156, CD79B, HABP4, ISG20, FOXM1, C12orf32, LAIR1, HECA, CST4, STX17, NFKBIE, TMEM151B, PIGV, MLKL, FDXACB1, C11orf1, ASGR2, EFHC2, GNGT2, ABI3, USHBP1, C19orf62, ZNF25, OAS3, CYSLTR1, GAB1, GNGT2, ABI3, SORBS3, KRAS, BEST1, ARAP3, POLD1, HSPB11, LRRC42, RAB37, ITPRIP, MTA3, KIAA2013, SERINC5, ARHGAP24, KLHL5, CCL25, IL2RA, B3GNT9, TRADD, FBXL8, UBE2L6, KLHL21, GABBR1, OLFML3, NGF, C5orf56, PCNA, CDS2, SSRP1, P2RX3, TMEM127, CIAO1, STAB1, ETFA, TSFM, LOC100129066, ZNF683, ARHGAP24, HSD17B4, CPNE8, NUP107, UGT3A2, FBXO6, CLEC4D, VRK2, C11orf75, PDK1, CCL17, PSTPIP1, CEP350, IKBIP, APAF1, VWA3B, HGF, TMEM217, TBC1D22B, C17orf64, RNF113A, NDUFA1, HELZ, BTG2, SMARCB1, EIF4E3, GPR27, MEF2C, DUSP4, CTDSP2, NUDT5, CDC123, ATP5G2, ST8SIA1, PRDM8, CTCF, SMTN, CMTM2, DAXX, KLHL24, CACNA11, NCLN, PTPLAD2, ERCC6, HBEGF, PRDX1, FCGR2A, CLU, TNFAIP8, LTB, LST1, FOXN3, MCM3AP, C21orf57, SMC1B, RIBC2, BTG2, SMC6, GEN1, DAZAP2, SYNGR1, CDC2L5, LMAN2, UTP6, C22orf24, YWHAH, SIGLEC15, LOC646999, STRA6, NOLC1, NCAPH, SENP6, ZNF423, NCKIPSD, PPP1R15B, SERPINE1, KPTN, FAM60A, FLJ13224, LDLRAD3, LCN10, LCN6, SLC38A5, FTSJ1, SPOCD1, FPGS, ANKS6, WIPF1, MTMR11, MRPS15, NOLC1, C20orf197, ZNF652, DPY19L3, ATP2B4, SRGAP3, EN1, ZNF41, CYBRD1, RANBP9, LRP11, LTB, LST1</p>	<p>Figueroa et al., 2013⁵²</p>

Table 5 (Continued)

Subtype	Methylation profile	Reference
	<p>Hypomethylated genes: ZNF512, CRYM, WAPAL, SLAMF1, MYBPH, EXTL3, FAM109B, C22orf32, LHCGR, AKR1B1, SURF1, SURF2, PLXNC1, WDR87, SIPA1L3, NOL11, EXTL3, SDF4, B3GALT6, DEF6, NCRNA00176, LIPC, NFKB1, ASB8, TERT, NSUN4, LOC100129534, ADIPOQ, PHYHD1, BLK, LPAR2, FAM109B, C22orf32, GJA4, ADIPOQ, PDCD1, MND1, RASL11B, RNF186, PSMC3IP, MRPL28, ACTL9, TNS4, LAT, FAM109B, C22orf32, TEKT2, ADPRHL2, NAGA, FAM109B, C22orf32, PLD4, TEKT2, ADPRHL2, C16orf11, GLYCTK, NGF, PIP4K2B, ACOXL, MAST4, AURKC, SOST, MAP6D1, POLM, MSRB3, VAMP2, SLC39A1, CREB3L4, IDH2, NAT1, SSR1, ST6GAL2, FXYD2, ST6GALNAC3, CDCA3, USP5, PHACTR3, FFAR1, SDF4, B3GALT6, GDPD5, ARL4C, ATXN7L2, FAT1, GLYCTK, TRIM67, CTBP1, C4orf42, ARL4C, HOXD1, TSPAN3, TBX6, YPEL3, B3GNT7, MUPCDH, SCT, HIST1H1C, ITIH3, C12orf53, SOX21, SALL3, HECW1, PEA15, MNAT1, WNT2, PPAR, C16orf81, LILRB4, WNT2, C9orf100, SOX9, NCRNA00176, TFAP2C, C16orf81, GPR123, HOXD1, NXPH2, USP11, LTA, TNF, SCAP</p>	Figueroa et al., 2013 ⁵²
Rearranged CRLF2	<p>Hypermethylated genes: STXBP5, SLC2A8, GFRA1, DSC3, C9orf150, LCE3A, CHRDL1, C15orf24, PGBD4, HOXB2, ST6GAL2, NOVA1, NOLA, SLITRK1, TMSB15A, PRPF19, LRRC57, HAUS2, C18orf34, EPHA5, DSC2, RBPMS, TUBGCP3, AQP4, C18orf16, GABRQ, TMTC1, AADAT, ZIC5, MYEOV, ASXL1, NEUROG1, EPHA5, SIX6, TMED3</p> <p>Hypomethylated genes: HIPO, LYSMD4, SRBD1, PYGM, CASQ1, KCTD3, ANO7, WIPF1, CA6, GP1BB, NLRX1, LCN10, LCN6, SLC2A5, S100A13, S100A1</p>	Figueroa et al., 2013 ⁵²
Altered ERG	<p>Hypermethylated genes: CDKN2C, CYSLTR1, TMEM156, PIGV, RFTN1, SOCS2, MTHFS, MLKL, SERINC5, CD48, FLJ14107, ENAH, TNF, LTB, DAXX, RFTN1, TNFAIP8, TUBA4A, TUBA4B, HIBCH, NUBPL, C9orf25, DNAI1, STIM2, CHMP1B, PEX16, GYLTL1B, TLR1, CH25H, DEGS1, C8orf56, BAALC, XPO5, POLH, CXCR3, MED14, DDX3X, DENND3, ZNRF3, PELI3, PIK3IP1, HELZ, TGM6, GAB1, RBP1, C1QL4, ATP2B4, PRR5L, SLC27A2, ATP10A, LTB, LST1, STIM2, TMEM178, BNIP3L, TNFAIP8, CEP350, ZMYND8, UBE2J1, CLINT1, EXOSC9, MTMR10, FPGS, CCNI, CDKN1A, UBXN11, FAM120AOS, FAM120A, SYNGR1, ITGB2, RNF141, CD3D, CD3G, SRGAP3, CHRNA2, ZNF490, ZNF791, TP53BP1, WBP11, C12orf60, WDFY3, C4orf12, CARD8, GGNBP2, IKBKE, UTP20, RAPGEF1, HSPA8, PPP1R15B, SENP6, ST6GALNAC3, CD48, KDM4B, PPID, ERO1LB, SH2D3A, VAV1, KCTD17, ZNF212, ARHGAP24, RANBP10, TSNAXIP1, CYTIP, LTB, LST1, LOC729234, PKNOX2, C8orf56, BAALC, SYNE1, DYNLT1, SYTL3, TRIM13, UBR5, IGFBP7, ERAP2, CDCA5, ZFPL1, PARS2, MEF2C, PIP4K2A, NLRP12, ANKFY1, ST3GAL6, PJA2, UGT3A2, DHRS13, FUCA1, CENPJ, RGMA, RAB39, LRRC8D, RANBP9, AIF1, ITPRIP, TAF3, ERCC6, MRPS15, SRGAP3, CDCA3, USP5, NGRN, PIP4K2A, L1CAM, SERPINE1, EFHD2, FXYD5, NUP107, NARG1L, MAP3K8, C14orf33, KTN1, RPRML, RNF113A, NDUFA1, ADAMTS5, MDM4, TLR7, EGLN3, HYAL3, NAT6, HYAL1, NOVA1, DCTN2, KIF5A, TRIM9, ST6GALNAC1, C1orf127, WIPF1, LRRC57, HAUS2, CYBRD1, SLAMF1, ACOXL, PBK, ECM1, RASL11B, TMEM37, GRPEL2, ACSL3, ICAM3, C1orf156, C1orf112, PXT1, KCTD20, STXBP6, TBCCD1, DNAJB11, SIDT1, FGFR4, SLC16A9, CAB39L, SETDB2, ERICH1, DTX3, SSTR2, CBX6, VRK2, C14orf48, EIF4E3, GPR27, SMCHD1, XYLT2, TSEN2, CEP70, STXBP6, USHBP1, C19orf62, ST6GALNAC2, ADAP2, GLRA2, WFDC2, NOLC1, GFI1, CD180, NP, SLC39A13, IRAK3, SPRYD5, C9orf79, DNAJC9, MRPS16, LYPD5, ZNF283, TMEM217, TBC1D22B, ENTPD3, HSPG2, CCDC85A, STK38, CNR2, KIR3DX1, IL8RA, CECR2, MYL12A, MYST2, KCNAB1, WDR47, PYY, NAGS, GNAZ, DEFA1, DEFA1B, DEFA3, C17orf64, RPL17, SNORD58C, U58, SNORD58A, SNORD58B, ESPL1, PXX, CARD14, HNF4A, C9orf79, PCDHB2, CD33, DGKG, S100A13, S100A1, FIBIN, ATP5G2, RAB11FIP1, GREB1L, GJA4, PRICKLE2, RAG2, C11orf74, ZCCHC9, ZNF683, CXXC5, HNMT, C12orf23, ACSBG1, CLU, BPNT1, IARS2, CCR7, ALX3, GABRR1, TFB2M, C1orf71, DDX19A, CACNA1S, THYN1, ACAD8, PTH2, KIF12, GNGT2, ABI3, CAMK2B, SEMA4A, ADARB2, MC4R, DNAJC10, TMPRSS13, C7orf43, DOCK3, DCK, NBLA00301, STBD1, USP2, CDR2, SSRP1, P2RX3, IKBIP, APAF1, PNPT1, DCAF5, ZNF423, PLEKHH3, CCR10, CNTNAP1, LEMD1, PCDHB7, PCDHB8, MLL2, XPNEP2, DYNC2H1, CPOX, PIAS2, GMNN, HMP19, SEL1L3, PTPRB, CRYBB3, C14orf115, NELL1, ITIH5, RRAGA, LRAT, DEFB124, REM1, C15orf24, PGBD4, B4GALT3, RHBDL3, SRBD1, HTR7, FAM193B, GNB1L, C22orf29, AFAP1, BRDT, MRPL1, DIAPH2, PRICKLE3, ACTRT1, TNFRSF9, SSTR2, HNF4A, SOCS3, SLC39A1, CREB3L4, KCNAB3, TRAPPC1, CNTROB, FOXO4, NOV, NOLC1, DNAJB1, C9orf79, LOC400940, TMPRSS2, GPR84, ZNF366, SFT2D3, TUSC3, VPS72, DCBLD1, AMMECR1L, SLC2A14, PRR18, VPS24, DNAJC10, EXOC8, C1orf124, MAL2, TPRXL, YARS, S100BP, PO</p>	

Table 5 (Continued)

Subtype	Methylation profile	Reference
	<p>Hypomethylated genes: A2LD1, SAP18, BTN2A1, OSBPL11, HN1, AARS2, ADI1, OBFC2B, SLC39A5, ZNF295, PARVB, MIA, RAB4B, ZNHIT2, FAU, MRPL49, TULP4, C7orf65, TMIE, PSMA2, MRPL32, SPINK4, ZNF296, GEMIN7, PEX11A, WDR93, RASSF2, PNRC1, SLC39A11, GIT2, ANKRD13A, DIXDC1, VPS4B, PARVB, CHRNA1, KRTAP5-8, ADAMTS9, CNTN2, C14orf139, EPS8, PCNX, LDOC1L, CCDC109A, PRMT10, CCNT1, NSD1, WDFY4, DCP1B, GCHFR, C12orf36, RFC4, TFF3, GPR81, ZNHIT6, C19orf23, C19orf24, PIK3R1, C16orf11, NHLRC4, PIGQ, C10orf118, TDRD1, XPNPEP2, SECISBP2, GLYCTK, CUL7, MRPL2, KLC4, GLG1, C7orf25, GPR153, EIF1AD, BANF1, PPL, TMEM127, CIAO1, GPR146, CAND2, DIXDC1, UCKL1, UCKL1A5, SNHG7, SNORA43, SNORA17, RFC4, NME3, MRPS34, EME2, ING1, USP12, HNRNPR, RGN, NHLRC4, PIGQ, TSKU, GRB2, CST8, SCGB3A1, ZNF513, ADCY1, LRRN1, C3orf27, EXOSC10, LFNG, XYLT1, C14orf126, GPR44, CRBN, C16orf81, GLIPR1L2, LTA4H, SPIB, CCNJ, GPR146, LOC643008, GLIPR1L2, BACH2, CCDC109A, GPR155, ZC3H18, ELP3, ALPPL2, CRBN, ADAMTS3, POLM, MRPL28, HEATR5B, CCDC75, GPER, CUL7, MRPL2, KLC4, CHRNA1, C14orf139, SREBF1, MRPL55, KCNC3, BTG2, MTSS1L, OR2Z1, LOC100303728, SLC25A5, CACNA1I, IFI30, GRINA, CRHBP, RNASE7, CD81, SURF1, SURF2, PTOV1, TGFB2, TEKT2, ADPRHL2, ADAMTS3, IGSF21, SOHLH1, KCNT1, RPL9, LIAS, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, GRINA, C20orf165, NEURL2, CTSA, SLC20A2, C8orf40, SNW1, C14orf178, RHBDF1, MPG, LOC26102, GPSM1, EIF4G2, RHBDF1, MPG, TPI1, GLYCTK, ATP2A3, ARHGEF4, TBC1D13, CD38, MS4A10, LOC100129637, SOX15, LIF, C19orf23, CIRBP, C19orf24, ABCA2, C9orf139, CCDC96, TADA2B, BSCL2, GNG3, NELL1, RGS9, GPR148, GANAB, INTS5, HIST1H1C, BMP7, LOC100129637, CGREF1, ABHD1, PCP2, STXB2, LOC643008, CIZ1, DNMT1, GPER, TSKU, TRIM67, GFRA1, FLJ90757, BAIAP2, FTSJ2, NUDT1, DDX50, FOXJ2, SLC03A1, LIN7A, GATM, RAMP1, COG8, NIP7, NFS1, ROMO1, VPS37C, FAM53B, GOS2, SHANK1, SPATA24, C19orf23, CIRBP, ZNF566, FAM83H, IMMP2L, LRRC3, TSTA3, HLF, SDF4, B3GALT6, LHCGR, C16orf42, GNPTG, SLC2A8, HS6ST1, C20orf165, NEURL2, CTSA, SFT2D1, CSMD1, RAD54L, PITRM1, MUPCDH, SCT, TIGD3, VAT1L, TOMM40, CCDC42, WARS, WDR25, GRIK5, CYP2U1, ODF3L2, HMP19, KLHL22, ARID3B, MT3, SOX15, DMRT3, REPIN1, MTA2, ATPAF2, C17orf39, SHARPIN, MAF1, KIAA1875, SQLE, CHMP4C, SYT15, MYH6, SNTB1, MRPL24, GPR123, GATA6, FBXW5, C8G, EPHA5, PRELID2, IVNS1ABP, KRT80, SNAI2, RBM3, VWDE, NUDT10, ZMYM6, MRPS30, TIMM13, ZNF532, SYVN1, NKX2-8, KIAA1024, FAM81A, KCNN2, MUC1, THYN1, ACAD8, LOC100130557, NFYC, ALOX5, CCDC58, FAM162A</p>	

of pediatric ALL. This proposal would be applicable to cases in which difficulties arise with the identification of a chromosomal or molecular alteration that contributes to leukemia classification.⁵³ Despite methylation signatures to determine ALL subtype have been found and epigenetic profiles to allow the prediction of the risk of relapse have been proposed,^{47,54} an epigenetic profile capable of accurately classifying and stratifying patients with ALL does not exist.⁴⁸

3.2. Alteration in gene methylation in ALL according to the specific subtype of genetic rearrangement

Besides alterations in DNA methylation, which are common to all subtypes of ALL-B, exclusive modifications to each genetic subtype exist.^{48,51,55} Recently, methylation profiles together with gene expression profiles in patients with the *ETV6-RUNX1* fusion were analyzed; 55 genes with alterations in methylation were identified

(Table 3).⁵¹ Among these alterations, *EPOR* gene was identified, which was found to be overexpressed, and its promoter, hypomethylated. The *ETV6-RUNX1* fusion binds and activates the transcription of *EPOR* (erythropoietin receptor), which contributes to leukemia development, activating cellular proliferation and survival through the JAK2-STAT5 pathway.⁵⁶ Hypomethylation in *EPOR* favors its promoter to be more permissive to binding and activation by *ETV6-RUNX1*.

In the *ETV6-RUNX1* subtype, hypermethylation and low expression in the asparaginase synthetase (*ASNS*), which sensitizes cells to treatment with L-asparaginase was also found. This explains, in part, the fact that patients with *ETV6-RUNX1* present such a good treatment response.^{57,58} Other genes with alteration in methylation and expression observed in *ETV6-RUNX1*-positive patients include *CLIC5*, *ACVR1C*, *IGF2BP1*, *DSC2*, *PCLO*, *SOX11*, *SPSB1*, *BEST3*, *SIDT1*, *TCFL5*, *CHL1* and *FAM19A* (Table 3).^{55,59} Additionally, it has been reported that alterations in the methylation of *ERHV-3*, *DMNBP*, *KCNA3*, *PAG1* and *C11orf52* are associated with risk of relapse in patients with *ETV6-RUNX1*,

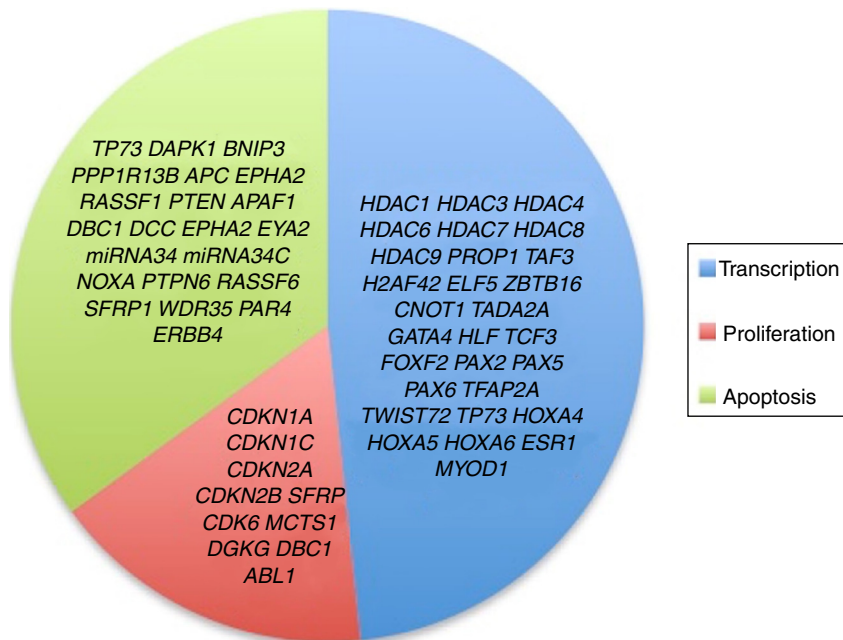


Figure 3 Classification of the most affected genes by epigenetic modifications in ALL, according to their biological function.

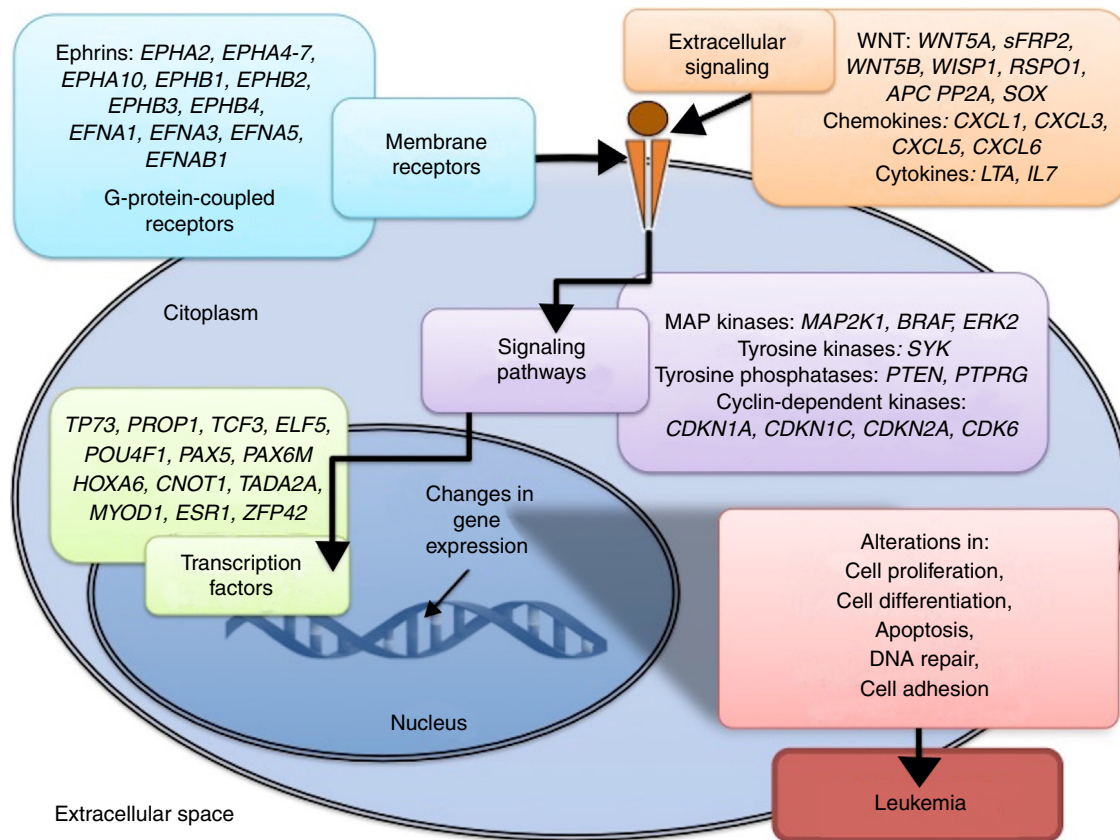


Figure 4 Signaling pathways and cell processes that are modified by epigenetic alterations, which promote leukemogenesis.

for which they have been proposed as markers of poor prognosis.⁴⁷

In patients with hyperdiploidy, alterations in methylation and gene expression that are exclusive to this subtype have been found. More recent studies highlight the hypermethylation and low expression in tumor suppressor genes *FHIT*, *PTPRG* and *DDIT4L*.^{47,51} Additionally, hypomethylation of proapoptotic genes *BCL2* and *BCL9L* has been observed, which have been reported to be altered in diverse B cell tumors (Table 4).⁵¹ On the other hand, the ALL subtype positive to rearrangements in the *MLL* gene also presents a characteristic profile of alteration in methylation (Table 5). It has been reported that in ALL that with rearrangement in *MLL*, hypermethylation of *CDH3*, *TBX2*, *ERCC1*, *NPR2*, *DAPK1*, *CCR6*, *HRK*, *LIFR1*, *DLX3* and *FHIT* genes occurs.^{60,61} Hypermethylation of genes *ZSCAN18*, *ZNF256*, *ZNF329*, *ZNF544* and *ZNF681* has been associated with an increase in the risk of relapse in patients with alterations in the *MLL* gene.⁴⁷ In particular, it has been observed that a different methylation profile is present in ALL with different translocations in *MLL*.⁶⁰

3.3. Main cellular processes and signaling pathways affected by alterations in gene methylation in ALL

Cell processes with a greater representation of genes with aberrant methylation in ALL include the regulation of the cell cycle, apoptosis, transcriptional regulation and cellular adhesion (Figure 3). Some examples of genes with alterations in methylation in ALL that participate in these cellular functions are *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *SFRP*, *CDK6*, which regulate cell proliferation and cell cycle^{62–66}; *GATA4*, *HLF*, *TCF3*, *FOXF2*, *PAX2*, *PAX5*, *PAX6*, *TFAP2A*, *TWIST72*, *TP73*, *HOXA4*, *HOXA5* and *HOXA6*, which participate in gene transcription^{51,62,67–70}; *DAPK1*, *APC*, *EPHA2*, *RASSF1*, *PTEN*, *APAF1*, *DBC1*, *DCC*, *EPHA2*, *EYA2*, *miRNA34*, *miRNA34C*, *NOXA*, *ASPP1*, *PTPN6*, *RASSF6*, *SFRP1*, *WDR35*, *PAR4*, *ERBB4*, involved in apoptosis^{4,20,36,51,71–73}. Alterations in the methylation of these genes confer leukemic cells with survival advantages, preventing apoptosis and promoting proliferation (Figure 4).

Some signaling pathways mostly represented by genes with alterations in methylation in ALL are p53, WNT, EPHR, MAPK, and PI3K-AKT^{4,20,59}, which are tightly related to cell processes as the aforementioned (Figure 4). One of the most profoundly studied pathway is the TP53, which is a tumor suppressor gene involved in the activation of damaged DNA repair, induction in the G1/S checkpoint and promotion of apoptosis.⁷⁴ Despite mutations in this gene are present in 50% of tumors, less than 3% is found in ALL. However, an alteration of the p53 pathway at the epigenetic level exists in ALL.⁵⁹ Hypermethylation of at least one gene involved in the p53 pathway has been observed in 78% of patients with ALL. Hypermethylation in genes involved in apoptosis dependent on p53, such as *AIFM2*, *APAF1*, *DBC1*, *miRNA34B*, *miRNA34C*, *PMAIP1*, *POU4F2*, *PPP1R13B*, *TP73*, *NOXA*, *AMID* and *ASPP1* has also been detected. In the same way, hyper-

methylation of genes such as *CDKN1A*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *POU4F1*, which participate in cell cycle control dependent on p53, and hypermethylation of *LATS2* and *DAPK1*, which participate in the regulation of this same pathway.^{4,20,59,71,75}

The WNT/ β -catenin pathway has been involved amply in diverse types of cancer.⁷⁶ Activation of this pathway regulates proliferation and cell differentiation, among other processes.⁴ In ALL, an alteration regarding methylation of genes associated with the WNT, such as *WNT5A*, *RSPO1* and *APC* has been reported.^{36,72,77} Additionally, aberrant methylation of *sFRP2*, *sFRP4*, *sFRP5*, *WIF1*, *DKK3*, *sFRP1*, *PTPRO*, *FZ10* and *DKK2* genes, as well as in β -catenin inhibitor, cadherins (*CDH1*, *CDH11*, *CD13*), and genes of the SOX family (*SOX2*, 3, 8, 9, 11, 14, 21) has been reported in patients with ALL-B with relapse.⁵⁴

Other signaling pathways affected in ALL by alterations in DNA methylation include the ephrin receptors (EPH), which are tyrosine-kinase receptors that activate and regulate diverse biological processes. In ALL, it has been suggested that EPH genes can act as tumor suppressors. Hypermethylation in receptors and ligands, including *EPHA2*, *EPHA4*, *EPHA5*, *EPHA6*, *EPHA7*, *EPHA10*, *EPHB1*, *EPHB2*, *EPHB3*, *EPHB4*, *EFNA1*, *EFNA3*, *EFNA5*, and *EFNAB1* has been reported.³⁶ Additionally, alterations in methylation of the MAP kinase pathway genes (*MAP2K1*, *BRAF*, *ERK2*) have been reported in ALL, as well as in the PI3K-AKT pathway.⁵⁴

4. Histones modification in ALL

Histones are proteins involved in DNA organization inside the nucleus. There are five types of histones: H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4. Histones H2A, H2B, H3 and H4 form the nucleosomes which pack the DNA, whereas histone H1 is found in the spaces between the nucleosomes; histone H5 is present in specific regions of the DNA. The state of the chromatin depends on post-translational modifications in histones and influences gene transcriptional states. Numerous covalent histone modifications are known, such as acetylation, methylation and phosphorylation, which lead to gene repression or activation (Figure 1).^{4,9} The predominant and most studied modifications are lysine and lysine/arginine methylation.⁹

The main enzymes in charge of regulating histone modification are the methyltransferases (HMTs), demethylases (HDMs), acetyltransferase (HATs) and deacetylases (HDACs).⁷⁸ The combination of the activity of these enzymes confers a "histone code", which regulates the topology of the chromatin, the accessibility of promoters and, therefore, regulates the transcriptional activity and other processes such as replication and DNA repair.^{4,79} Some histone modifications associated to open chromatin and, therefore, to transcriptional activation, are lysine (K) acetylation in histone H3 (H3K4, H3K14, H3K9, H3K27) and histone H4 (H4K5, H4K20) (Figure 1).

The enzymes in charge of histone acetylation are the HATs. Methylation of lysine catalyzed by HMTs can activate or repress transcription; for example, monomethylation of H3K4, H3K79, H3K35 activates transcription. Some marks

of closed chromatin and transcriptional repression include the trimethylation of lysine in H3K9 and H3K27 (Figure 1).⁹ Together with DNA methylation, histone modifications have been implicated in the etiology and progression of diverse types of cancer.⁸⁰ Mutations in different histone modifying enzymes that lead to the loss or gain of its function have been found. In particular, acetylation removes positive charges in histones, which decreases the interaction of phosphate groups of the DNA (negative charge) with the N-terminal portion of histones (positive charges). The latter leads to relaxation of the chromatin, which is associated with greater DNA accessibility and, therefore, increased transcriptional activity.⁸¹ HDACs enzymes include the HDAC1, HDAC11 and sirtuins.⁸² Reduction in histone acetylation derived from the overexpression of HDACs enzymes is a common event in diverse tumors, including leukemia.⁸¹⁻⁸⁴

In pediatric ALL, overexpression of histone deacetylases, such as HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC7 y HDAC8, has been identified in comparison to non-leukemic cells (Figure 2).^{84,85} Particularly, overexpression of HDAC2 and HDAC5 in ALL-B has been reported,^{84,86} whereas in ALL-T a greater expression of HDAC1, HDAC4 and HDAC5 has been observed.⁸⁴ As for prognosis, overexpression of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC7, HDAC9 y HDAC11 genes has been associated with an unfavorable prognosis in pediatric ALL.^{84,85,87} Furthermore, acetylation of the H4 histone has been proposed as a marker of prognosis at diagnosis

and in relapses. In adults with ALL, increased levels of H4 acetylation correlated with an increase in survival.⁸⁸ Additionally, *ETV6-RUNX1* has been reported to recruit HDACs in ALL-B, which induces remodeling of the chromatin and, consequently, blocks the transcription of certain genes normally activated by *RUNX1*.⁸⁹

Although not all the signaling pathways and cell processes in which the alteration of HDACs have been identified in pediatric ALL, they are known to be involved in processes such as transcription (*HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9*), cell cycle regulation (*HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC6, HDAC7*), apoptosis (*HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC7*), and p53 (*HDAC2*) and Notch (*HDAC1, HDAC3, HDAC7*) signaling pathways (Figure 3).⁴

In ALL, altered HATs also have been identified. The main HATs include the GNAT MYST, and CBP/p300 families.⁸² Some of these proteins have been involved in chromosomal rearrangements capable of leading to leukemic transformation through alteration of histone acetylation and, consequently, in gene expression.⁹⁰ Some HATs that have been identified to be overexpressed in ALL-B include *KAT7, KAT2A, CREBBP* (*CPB* or *KAT3A*) and *KAT6B*.⁸⁶ This modification has been associated with cell processes such as transcription regulation, proliferation and apoptosis.⁸⁶ Additionally, it has been observed that *KAT2A* acetylates and stabilizes the oncoprotein TCF3-PBX1 in ALL cells.⁹¹ It has also been found that mutations in the *CREBBP* gene, which lead to a transcriptional deregulation of its target genes, are associated to

Table 6 Target genes of frequently altered miRNAs in ALL.

miRNA	Target genes	Reference
<i>Overexpression</i>		
miR128a	<i>BMI</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³
miR708	<i>CNTFR, NNAT, GNG12</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³
miR99a	<i>FKBP5, IGF1R/mTOR</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³
miR125b	<i>Trp53inpl</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³
miR223	<i>FOXO</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³
miR222	<i>BBC3, BCL2L11, BMF, BNIP3, CDKN1B, CDKN1C, CREBZF, DDIT4, DKK2, ESR1, FOS, FOXO3, ICAM1, KIT, MMP1, MYBL1, PPP2R2A, PTEN, SOD2, TBK1</i>	108
miR142-3p	<i>GRα, PKA</i>	Lv et al., 2012 ¹⁰⁹
miR128b	<i>BMI-1, PTEN, E2F5, TGFβR1</i>	Li et al., 2013 ¹¹⁰
miR34a	<i>SMAD4, CCND1, MAP2K1, BCL2, NOTCH2</i>	Tang et al., 2015 ¹¹¹
miR146	<i>TRAF6, IRAK1</i>	Taganov et al., 2006 ¹¹²
miR142	<i>APC</i>	Isobe et al., 2014 ¹¹³
miR181	<i>PRCKD, CTDSPL, CAMKK1</i>	Su et al., 2015 ¹¹⁴
miR198	<i>BIRC5, FANCD2, EGF, HMGA1, GPSM2, H2AFX, POLD1, HOXB13, HDAC4, SPDYA</i>	Huang et al., 2016 ¹¹⁵
miR511	<i>TLR4</i>	Tserel et al., 2011 ¹¹⁶
miR383	<i>EDN1 & TYRP1</i>	Mansuri et al., 2016 ¹¹⁷
<i>Underexpression</i>		
miR140	<i>DNMT1</i>	Takata et al., 2013 ¹¹⁸
miR143	<i>DNMT3A</i>	Ng et al., 2009 ¹¹⁹
miR451	<i>MIF</i>	Tang et al., 2015 ¹²⁰
miR373	<i>TXNIP, RABEP1, TNFAIP1</i>	Yang et al., 2011 ¹²¹ , Wang et al., 2015 ¹²²
miR100	<i>SMARCA5, HOXA1</i>	Luan et al., 2015 ¹⁰³ , Chen et al., 2014 ¹²³
miR196	<i>HOXB8, HOXC8, HOXD8, HOXA7, HOXB7, ERG, HMGA2, ANXA1, S100A9, SPRR2C, KRTS</i>	Chen et al., 2011 ¹²⁴

pediatric ALL-B relapse.^{92,93} It has been determined that the overexpression of *CREBBP* can confer a bad prognosis, including those ALL-B subtypes with standard risk, such as hyperdiploidy.⁹³

The most studied HMT in ALL is MLL, which methylates lysine 4 of the H3 histone (H3K4), which is a mark of open chromatin and, therefore, favors transcription.⁴ Additionally, MLL regulates transcription through recruitment of HAT protein such as CBP and MOF. *HOXA* genes are mainly part of MLL multiple targets. The *MLL* forms rearrangements with over 85 different genes, which lead to the formation of chimeric proteins. Although they lose the active methyltransferase H3K4 domain, they retain the capacity of binding to chromatin.^{94,95} MLL oncoproteins lead to the aberrant activation of their target genes through diverse mechanisms. For example, the chimeric protein MLL-AF4 alters the regulation of its target genes by recruiting epigenetic regulation complexes such as SEC and DOT1 (H3K79 methyltransferase). This dysregulation leads to leukemic transformation since *MEIS1*, *RUNX1*, *FLT3*, *MYC*, *BCL2*, and *PROM1* genes are among the targets of MLL-AF4.⁹⁶ Moreover, *MLL* has been found fused to HAT proteins, such as *CREBBP* and *EP300*, leading to the overexpression of their target genes.^{96,97}

5. Alteration in miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) constitute another type of epigenetic regulation. They are small RNAs of 18-25 nucleotides which mainly inhibit the translation of their target mRNAs through interaction with the 3'UTR in mammals. miRNAs derive from the processing of precursors by the RNase III-Drosha-Dicer protein complex.⁹⁸ Gene expression regulation by miRNAs is a common biological process; more than 60% of mRNAs can be regulated by miRNAs.⁹⁹ miRNAs are implicated in critical biological processes, including growth and cell development, metabolism, proliferation, differentiation, and apoptosis.¹⁷ In cancer, it has been observed that miRNAs participate acting as oncogenes (oncomiRNAs), tumor suppressors, and metastasis suppressors or activators.¹⁷ Additionally, miRNAs can be regulated by methylation of the DNA and histone modification (Figure 2).¹⁰⁰

Multiple biological processes are regulated by miRNAs, including normal and malignant hematopoiesis.^{101,102} Alterations in miRNA expression have been identified in ALL-B and T in both children and adults.¹⁷ miRNA expression profiles have been used in the diagnosis, classification, and prognosis of ALL.¹⁰³ In pediatric ALL, overexpression of *miR222*, *miR339*, *miR142-3p*, *miR128a*, *miR128b*, *miR34a*, *miR146*, *miR142*, *miR181*, as well as decreased expression of *miR140*, *miR143*, *miR451*, *miR373*, *miR100*, *miR196b* has been reported in comparison to their normal cell counterparts (Table 6). Distinctive miRNA signatures between ALL genetic subtypes have also been reported. In the hyperdiploid subtype, overexpression of *miR198*, *miR222*, *miR223*, *miRNA511* and *miRNA708* has been detected, whereas the *ETV6-RUNX1* subtype presents *miR99a*, *miR100*, *miR125b*, *miR383* and *miR708* overexpression (Table 6).¹⁰³⁻¹²⁴ ALL subtype with *MLL* rearrangements is characterized by the

overexpression of *miR196b* and low expression of *miR128b* and *miR221*.^{103,104}

Diverse miRNAs implicated in cell proliferation and apoptosis have been associated with prognosis in patients with ALL. Low expression of *miR456*, *miR708*, *miR210*, as well as overexpression of *miR100/99* have been associated with chemotherapy resistance and, therefore, with an unfavorable prognosis. Other miRNAs which low expression is associated with a bad prognosis include *miR124a* and *miR152*. Additionally, overexpression of *miR92a* is associated with an unfavorable prognosis.^{60,65,125-127}

6. Epigenetic therapy in ALL

The identification of epigenetic alterations in ALL has motivated the search of molecules capable of reverting these alterations. In patients with ALL, two hypomethylating agents with previous approval in the United States for their use in other types of cancer have been tested. In patients with refractory ALL or in relapses, inhibitors of the DNA-methyltransferase, such as 5-azacitidine and decitabine, in combination with other conventional chemotherapeutic drugs have been used. In these studies, evidence of clinical activity without excessive toxicity was observed.^{128,129} In addition to demethylating agents, histone inhibitory agents, such as vorinostat and panobinostat, have been tested in patients with ALL. In a phase II study, the administration of decitabine in combination with vorinostat was tested before reinduction chemotherapy in children and adults with refractory ALL. In one out of 13 patients, death by toxicity was registered. In 5/8 patients who completed the treatment, an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation was performed, of whom three died of transplant related causes and two survived without evidence of the disease.¹³⁰

Additionally, it has been proposed that through the regulation of certain miRNAs, an improvement of the therapeutic effect of glucocorticoids could be achieved, particularly for those patients that show resistance to agents such as prednisone. It has been demonstrated that *miRNA-17* inhibition leads to an increase in the sensitivity of leukemic cells to dexamethasone.¹³¹ In those patients with *MLL* rearrangements insensitive to glucocorticoids treatment, restitution of the expression of *miR128b* and *miR221* has been suggested as therapy. Both miRNAs show low expression in ALL patients with *MLL* rearrangements. It has been observed that *miR128b* has *MLL*, *AF4* genes as targets, and even the oncogenic fusions *MLL-AF4* and *AF4-MLL*. Moreover, *miR222* is capable of negatively regulating *CDKN1B*. In a cooperative manner, both miRNAs are capable of potentiating the sensitivity of leukemic cells to glucocorticoids.¹³² The restoration of the expression of *miR143* has also been proposed as therapy for patients with ALL with the *MLL* rearrangement; in these patients, *miR143* is hypermethylated and silenced. This miRNA has been identified as a regulator of the expression of *MLL-AF4*. *miRNA143* restitution induces apoptosis of leukemic cells.¹³³

In patients with *BCR-ABL1*-positive ALL, restitution of *miR203* has been proposed as therapy. This miRNA has *ABL1* and *BCR-ABL1* as targets. In *BCR-ABL1*-positive leukemia,

miR203 has been found to be silenced by genetic and epigenetic mechanisms. In patients with *BCR-ABL1*-positive ALL, who show resistance to tyrosine-kinase inhibitor, it has also been suggested that restitution of *miR217* could be used as therapy to inhibit DNMT3A.^{134,135} It has been reported that patients with *BCR-ABL1*-positive ALL acquire resistance to tyrosine-kinase inhibitor through the downregulation of *miR217*, which in turn up-regulates DNMT3A.

7. Conclusions

Epigenetic regulation through DNA methylation, histone modification, and by miRNAs plays a fundamental role in the development and evolution of ALL and other types of cancer. In ALL, these levels of regulation have been involved in the etiology of the disease, as well as in the diagnosis, classification, and prognosis of patients. The advent of genome wide association studies allows the detection of an ample number of epigenetic modifications characteristic of ALL, which reflect the complexity and heterogeneity of epigenetic regulation in this disease. Research in this field will keep offering information to allow a better understanding of the complex etiology of ALL. Moreover, knowledge of the epigenetics of ALL will contribute to identify therapeutic targets that could be modified with specific treatments, with the advantage that, unlike genetic modifications, epigenetic alterations are reversible.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests of any nature.

Acknowledgements

Miguel Alemán 2012 Foundation, Federal Funds 2013 Instituto Nacional de Pediatría, Sectorial Fund of Research for Education SEP-CONACyT CB-2012-01/183467. Navarrete-Meneses thanks to the Biological Sciences Postgraduate Program, CONACyT 385279.

References

- Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122:3407–15.
- Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030–43.
- Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:8443–8.
- San Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodríguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2013;5:525–38.
- Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. *Semin Hematol*. 2009;46:1–2.
- Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady H, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood*. 2004;103:3890–6.
- Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep*. 2014;31:523–32.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:726–34.
- Burke MJ, Bhatla T. Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr*. 2014;2:42.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150:12–27.
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354:166–78.
- Hernández AF, Menéndez P. Linking pesticide exposure with pediatric leukemia: potential underlying mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2016;17:461.
- Carroll WL, Bhojwani D, Min D-J, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;2003:102–31.
- Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389–96.
- Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62:47–60.
- Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:639–49.
- Chatterton Z, Morenos L, Saffery R, Craig JM, Ashley D, Wong NC. DNA methylation and miRNA expression profiling in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2010;2:697–708.
- Timms JA, Relton CL, Rankin J, Strathdee G, McKay JA. DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2016;8:519–36.
- Scourciz L, Couronné L, Pedersen MT, Della Valle V, Diop M, Mylonas E, et al. DNMT3A(R882H) mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice. *Leukemia*. 2016;30:1388–98.
- Garcia-Manero G, Yang H, Kuang S-Q, O'Brien S, Thomas D, Kantarjian H. Epigenetics of acute lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46:24–32.
- Fu HY, Wu DS, Zhou HR, Shen JZ. CpG island methylator phenotype and its relationship with prognosis in adult acute leukemia patients. *Hematology*. 2014;19:329–37.
- Batova A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, et al. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1997;57:832–6.
- Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*. 2000;95:1942–9.
- Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, Kornblau SM, Lee M-S, Kantarjian HM, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2217–24.
- Mai H, Liu X, Chen Y, Li C, Cao L, Chen X, et al. Hypermethylation of p15 gene associated with an inferior poor long-term outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142:497–504.
- Mirebeau D, Acquaviva C, Suciú S, Bertin R, Dastugue N, Robert A, et al. The prognostic significance of CDKN2A. CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica*. 2006;91:881–5.
- Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ, García-Delgado M, Laráyoz MJ, Novo FJ. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with

- decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*. 2003;22:1070–2.
28. Roman J, Castillejo JA, Jimenez A, Bornstein R, Gonzalez MG, del Carmen Rodriguez M, et al. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br J Haematol*. 2001;113:329–38.
 29. Garcia-Manero G, Jeha S, Daniel J, Williamson J, Albitar M, Kantarjian HM, et al. Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003;97:695–702.
 30. Zheng S, Ma X, Zhang L, Gunn L, Smith MT, Wiemels JL, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is associated with hyperdiploid and translocation-negative subtypes of pediatric leukemia. *Cancer Res*. 2004;64:2000–6.
 31. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood*. 1999;94:1113–20.
 32. Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res*. 1999;59:3352–6.
 33. Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, Douglas D, Baylin SB, Herman JG. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4243–8.
 34. Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, et al. p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia*. 1999;13:884–90.
 35. Issa JP, Zehnbauser BA, Civin CI, Collector MI, Sharkis SJ, Davidson NE, et al. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*. 1996;56:973–7.
 36. Kuang SQ, Bai H, Fang ZH, Lopez G, Yang H, Tong W, et al. Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115:2412–9.
 37. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Gonzalez MG, Moreno F, Rodriguez M, del C, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:2291–6.
 38. Shen L, Kondo Y, Issa J-P, Garcia-Manero G. Lack of p21(CIP1) DNA methylation in acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:3432–3.
 39. Bahari G, Hashemi M, Naderi M, Taheri M. TET2 promoter DNA methylation and expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17:3959–62.
 40. Gutiérrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*. 2003;17:1845–50.
 41. Canalli AA, Yang H, Jeha S, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Brandt M, et al. Aberrant DNA methylation of a cell cycle regulatory pathway composed of P73, P15 and P57KIP2 is a rare event in children with acute lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2005;29:881–5.
 42. Gutiérrez MI, Siraj AK, Ibrahim MM, Hussain A, Bhatia K. Childhood and adult ALL: differences in epigenetic lesions associated with cell cycle genes. *Am J Hematol*. 2005;80:158–60.
 43. Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Vázquez I, et al. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:2347–50.
 44. Hoshino K, Quintás-Cardama A, Yang H, Sanchez-Gonzalez B, Garcia-Manero G. Aberrant DNA methylation of the Src kinase Hck, but not of Lyn, in Philadelphia chromosome negative acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21:906–11.
 45. San José-Enériz E, Agirre X, Román-Gómez J, Cordeu L, Garate L, Jiménez-Velasco A, et al. Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter. *Br J Haematol*. 2006;134:137–44.
 46. Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, et al. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours. *Br J Cancer*. 2005;92:1165–72.
 47. Nordlund J, Bäcklin CL, Wahlberg P, Busche S, Berglund EC, Eloranta M-L, et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol*. 2013;14:r105.
 48. Gabriel AS, Lafta FM, Schwalbe EC, Nakjang S, Cockell SJ, Iliasova A, et al. Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2015;10:717–26.
 49. Taylor KH, Pena-Hernandez KE, Davis JW, Arthur GL, Duff DJ, Shi H, et al. Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2007;67:2617–25.
 50. Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2008;22:1529–38.
 51. Chatterton Z, Morenos L, Mechinaud F, Ashley DM, Craig JM, Sexton-Oates A, et al. Epigenetic deregulation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2014;9:459–67.
 52. Figueroa ME, Chen S-C, Andersson AK, Phillips LA, Li Y, Sotzen J, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2013;123:3099–111.
 53. Nordlund J, Bäcklin CL, Zachariadis V, Cavelier L, Dahlberg J, Öfverholm I, et al. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics*. 2015;7:11.
 54. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, Wang J, Wong N, Yang W, et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood*. 2011;118:5218–26.
 55. Lee ST, Muench MO, Fomin ME, Xiao J, Zhou M, de Smith A, et al. Epigenetic remodeling in B-cell acute lymphoblastic leukemia occurs in two tracks and employs embryonic stem cell-like signatures. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:2590–602.
 56. Torrano V, Procter J, Cardus P, Greaves M, Ford AM. ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. *Blood*. 2011;118:4910–8.
 57. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, Rubnitz JE, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*. 2012;26:265–70.
 58. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:1094–9.
 59. Busche S, Ge B, Vidal R, Spinella J-F, Saillour V, Richer C, et al. Integration of high-resolution methylome and transcriptome analyses to dissect epigenomic changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2013;73:4323–36.
 60. Stumpel DJPM, Schneider P, van Roon EHV, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, et al. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute





- lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood*. 2009;114:5490–8.
61. Schafer E, Irizarry R, Negi S, McIntyre E, Small D, Figueroa ME, et al. Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting. *Blood*. 2010;115:4798–809.
 62. Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Mol Cancer*. 2010;9:44.
 63. Irvani M, Dhat R, Price CM. Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2 CDKN1, p15INK4B) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 1997;15:2609–14.
 64. Kim M, Yim S-H, Cho N-S, Kang S-H, Ko D-H, Oh B, et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;195:59–65.
 65. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69:4443–53.
 66. Rodríguez-Otero P, Román-Gómez J, Vilas-Zornoza A, José-Eneriz ES, Martín-Palanco V, Rifón J, et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. *Br J Haematol*. 2011;155:73–83.
 67. Hütter G, Kaiser M, Neumann M, Mossner M, Nowak D, Baldus CD, et al. Epigenetic regulation of PAX5 expression in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35:614–9.
 68. Thathia SH, Ferguson S, Gautrey HE, van Otterdijk SD, Hili M, Rand V, et al. Epigenetic inactivation of TWIST2 in acute lymphoblastic leukemia modulates proliferation, cell survival and chemosensitivity. *Haematologica*. 2012;97:371–8.
 69. Abd El-Hamid TM, Mossallam GI, Sherisher MA. The clinical implications of methylated p15 and p73 genes in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Natl Cancer Inst*. 2010;22:175–84.
 70. Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, et al. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2007;13:5048–55.
 71. Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martín-Palanco V, Martín-Subero JI, San José-Eneriz E, Gárate L, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2011;6:e17012.
 72. Takeuchi S, Matsushita M, Zimmermann M, Ikezoe T, Komatsu N, Seriu T, et al. Clinical significance of aberrant DNA methylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35:1345–9.
 73. Nordlund J, Milani L, Lundmark A, Lönnnerholm G, Syvänen A-C. DNA methylation analysis of bone marrow cells at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia and at remission. *PLoS One*. 2012;7:e34513.
 74. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:a026062.
 75. Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, et al. DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:75–84.
 76. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149:1192–205.
 77. Hatırnaz Ng Ö, Fırtına S, Can İ, Karakaş Z, Ağaoglu L, Doğru Ö, et al. A possible role for WNT5A hypermethylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Hematol*. 2015;32:127–35.
 78. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000;406:593–9.
 79. Patani N, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2011;31:4115–25.
 80. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41:2381–402.
 81. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 1998;12:599–606.
 82. Zhang C, Zhong JF, Stucky A, Chen X-L, Press MF, Zhang X. Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics*. 2015;7:117.
 83. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:5459–68.
 84. Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MAA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V, et al. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;150:665–73.
 85. Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, et al. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2013;37:1200–7.
 86. Tao Y-F, Pang L, Du X-J, Sun L-C, Hu S-Y, Lu J, et al. Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci*. 2013;14:3376–94.
 87. Sonnemann J, Gruhn B, Wittig S, Becker S, Beck JF. Increased activity of histone deacetylases in childhood acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia: support for histone deacetylase inhibitors as antileukaemic agents. *Br J Haematol*. 2012;158:664–6.
 88. Advani AS, Gibson S, Douglas E, Diacovo J, Elson P, Kalaycio M, et al. Histone H4 acetylation by immunohistochemistry and prognosis in relapsed acute lymphocytic leukaemia (ALL). *Br J Haematol*. 2011;153:504–7.
 89. Starkova J, Madzo J, Cario G, Kalina T, Ford A, Zaliava M, et al. The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1726–35.
 90. Di Croce L. Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet*. 2005;14:R77–84.
 91. Holmlund T, Lindberg MJ, Grandér D, Wallberg AE. GCN5 acetylates and regulates the stability of the oncoprotein E2A-PBX1 in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013;27:578–85.
 92. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011;471:235–9.
 93. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26:1797–803.
 94. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27:2165–76.
 95. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:823–33.

96. Lin S, Luo RT, Ptasinska A, Kerry J, Assi SA, Wunderlich M, et al. Instructive role of MLL-fusion proteins revealed by a model of t(4;11) pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30:737–49.
97. Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*. 2009;94:984–93.
98. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350–5.
99. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–105.
100. Weber B, Stresmann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 2007;6:1001–5.
101. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303:83–6.
102. Cheng J, Guo S, Chen S, Mastriano SJ, Liu C, D'Alessio AC, et al. An extensive network of TET2-targeting microRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell Rep*. 2013;5:471–81.
103. Luan C, Yang Z, Chen B. The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *OncoTargets Ther*. 2015;8:2903–14.
104. Schotte D, Chau JCK, Sylvester G, Liu G, Chen C, van der Velden VHJ, et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009;23:313–22.
105. Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26:1–10.
106. de Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, Morales AG, Pezuk JA, Queiroz R, de P, et al. Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res*. 2012;36:293–8.
107. Zhang H, Luo X-Q, Zhang P, Huang L-B, Zheng Y-S, Wu J, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS One*. 2009;4:e7826.
108. Human miR-221 & miR-222 Targets. Available at: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-6007Z.html.
109. Lv M, Zhang X, Jia H, Li D, Zhang B, Zhang H, et al. An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- α and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*. 2012;26:769–77.
110. Li M, Fu W, Wo L, Shu X, Liu F, Li C. miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res*. 2013;319:3059–64.
111. Tang T, Su R, Wang B, Zhang Y. An integrated approach of predicted miR-34a targets identifies a signature for gastric cancer. *Oncol Lett*. 2015;10:653–60.
112. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:12481–6.
113. Isobe T, Hisamori S, Hogan DJ, Zabala M, Hendrickson DG, Dalerba P, et al. miR-142 regulates the tumorigenicity of human breast cancer stem cells through the canonical WNT signaling pathway. *Elife*. 2014;3. Available at: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.01977>
114. Su R, Lin H-S, Zhang X-H, Yin X-L, Ning H-M, Liu B, et al. MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. *Oncogene*. 2015;34:3226–39.
115. Huang WT, Wang HL, Yang H, Ren F-H, Luo Y-H, Huang C-Q, et al. Lower expressed miR-198 and its potential targets in hepatocellular carcinoma: a clinicopathological and in silico study. *OncoTargets Ther*. 2016;9:5163–80.
116. Tserel L, Runnel T, Kisand K, Pihlap M, Bakhoff L, Kolde R, et al. MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2011;286:26487–95.
117. Mansuri MS, Singh M, Begum R. miRNA signatures and transcriptional regulation of their target genes in vitiligo. *J Dermatol Sci*. 2016;84:50–8.
118. Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, et al. MicroRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity by directly targeting DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) expression. *Hepatology*. 2013;57:162–70.
119. Ng EKO, Tsang WP, Ng SSM, Jin HC, Yu J, Li JJ, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101:699–706.
120. Tang Y, Wan W, Wang L, Ji S, Zhang J. microRNA-451 inhibited cell proliferation, migration and invasion through regulation of MIF in renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:15611–21.
121. Yan GR, Xu SH, Tan ZL, Liu L, He QY. Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics*. 2011;11:912–20.
122. Wang L-Q, Zhang Y, Yan H, Liu K-J, Zhang S. MicroRNA-373 functions as an oncogene and targets YOD1 gene in cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;459:515–20.
123. Chen D, Sun Y, Yuan Y, Han Z, Zhang P, Zhang J, et al. miR-100 Induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004177.
124. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med*. 2011;15:14–23.
125. Ohyashiki JH, Umezu T, Kobayashi C, Hamamura RS, Tanaka M, Kuroda M, et al. Impact on cell to plasma ratio of miR-92a in patients with acute leukemia: in vivo assessment of cell to plasma ratio of miR-92a. *BMC Res Notes*. 2010;3:347.
126. Mei Y, Gao C, Wang K, Cui L, Li W, Zhao X, et al. Effect of microRNA-210 on prognosis and response to chemotherapeutic drugs in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 2014;105:463–72.
127. Han BW, Feng DD, Li ZG, Luo XQ, Zhang H, Li XJ, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4903–15.
128. Avramis VI, Mecum RA, Nyce J, Steele DA, Holcenberg JS. Pharmacodynamics and DNA methylation studies of high-dose 1-b-D-arabinofuranosyl cytosine before and after in vivo 5-azacytidine treatment in pediatric patients with refractory acute lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24:203–10.
129. Benton CB, Thomas DA, Yang H, Ravandi F, Rytting M, O'Brien S, et al. Safety and clinical activity of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) with or without Hyper-CVAD in relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;167:356–65.
130. Burke MJ, Lamba JK, Pounds S, Cao X, Ghodke-Puranik Y, Lindgren BR, et al. A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Am J Hematol*. 2014;89:889–95.
131. Harada M, Pokrovskaja-Tamm K, Söderhäll S, Heyman M, Grandér D, Corcoran M. Involvement of miR17 pathway in

- glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:2041–50.
132. Kotani A, Ha D, Hsieh J, Rao PK, Schotte D, den Boer ML, et al. miR-128b is a potent glucocorticoid sensitizer in MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells and exerts cooperative effects with miR-221. *Blood*. 2009;114:4169–78.
 133. Dou L, Zheng D, Li J, Li Y, Gao L, Wang L, et al. Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression. *Oncogene*. 2012;31:507–17.
 134. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell*. 2008;13:496–506.
 135. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Nobumoto A, Tsuda M, Yokoyama A. Downregulation of miR-217 correlates with resistance of Ph(+) leukemia cells to ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci*. 2014;105:297–307.

RESEARCH ARTICLE

Low concentrations of permethrin and malathion induce numerical and structural abnormalities in *KMT2A* and *IGH* genes in vitro

M. P. Navarrete-Meneses^{1,2}  | A. I. Pedraza-Meléndez¹ | C. Salas-Labadía¹  |
D. Moreno-Lorenzana³  | P. Pérez-Vera¹ 

¹Laboratorio de Genética y Cáncer, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

³Cátedra CONACYT-Instituto Nacional de Pediatría, Mexico

Correspondence

P. Pérez-Vera, Laboratorio de Genética y Cáncer, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico.

Email: pperezvera@yahoo.com

Funding information

MPN-M PhD scholarship CONACYT; Fundación Miguel Alemán; Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría; Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, Grant/Award Number: CB-2012-01/183467

Abstract

Pesticides are commonly used worldwide and almost every human is potentially exposed to these chemicals. Exposure to pesticides such as permethrin and malathion has been associated with hematological malignancies in epidemiological studies. However, biological evidence showing if these chemicals induce genetic aberrations involved in the etiology of leukemia and lymphoma is missing. In our previous work, we have shown that a single high exposure (200 μM , 24 hours) of permethrin and malathion induce damage in genes associated with hematological malignancies in peripheral blood mononuclear cells analyzed by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH). In the present study, we assessed by FISH whether exposure to low concentrations (0.1 μM , 72 hours) of permethrin and malathion induce aberrations in *KMT2A* and *IGH* genes, which are involved in the etiology of leukemia and lymphoma. Peripheral blood mononuclear cells were exposed to the chemicals, and damage in these genes was assessed on interphases and metaphases. We observed that both chemicals at low concentration induced structural aberrations in *KMT2A* and *IGH* genes. A higher level of damage was observed in *KMT2A* gene with malathion treatment and in *IGH* gene with permethrin exposure. We also observed numerical aberrations induced by these chemicals. The most frequent aberrations detected on interphase FISH were also observed on metaphases. Our results show that permethrin and malathion induce genetic damage in genes associated with hematological cancer, at concentrations biologically relevant. In addition, damage was observed on dividing cells, which suggests that these cells maintain their proliferation capacity in spite of the genetic damage they possess.

KEYWORDS

IGH, insecticides, *KMT2A*, leukemia, lymphoma, malathion, *MLL*, permethrin

1 | INTRODUCTION

The exposure of children and adults to pesticides causes concern as it has been associated with the development of leukemia and lymphoma (Alavanja & Bonner, 2012; Ding et al., 2012; Menegaux et al., 2006; Schinasi & Leon, 2014; Turner, Wigle, & Krewski, 2010). Although

several pesticides are not persistent, they are widely used in multiple human activities, and there is limited information about the long-term adverse effects in humans (Matthews, 2008). The epidemiological studies that associate pesticide exposure with leukemia and lymphoma risk are numerous (Alavanja & Bonner, 2012; Ding et al., 2012; Hernández & Menéndez, 2016; Menegaux et al., 2006; Schinasi

& Leon, 2014; Turner et al., 2010). However, the lack of exposure measurement is a weakness in most of the epidemiological analysis (Deziel et al., 2015; Ding et al., 2012; Hernández & Menéndez, 2016; Turner et al., 2010). In addition, the biological evidence that supports these associations is limited, and some results have been inconsistent (Fuscoe, Setzer, Collard, & Moore, 1996; Lafiura et al., 2007; Lu et al., 2015; Zeljezic et al., 2017).

To the best of our knowledge, the evidence demonstrating that pesticides are capable of inducing specific damage in the genes frequently altered in leukemia and lymphoma are reported in very few studies, and more research is required (Borkhardt, Wilda, Fuchs, Gortner, & Reiss, 2003; Lafiura et al., 2007; Lu et al., 2015; Navarrete-Meneses et al., 2017; Zeljezic et al., 2017). In utero pesticide exposure has been associated with the prenatal induction of *RUNX1-ETO* fusion, which is the most common gene fusion in childhood acute myeloid leukemia (Lafiura et al., 2007). In addition, a unique case of a newborn exposed in utero to permethrin, who developed congenital acute myeloid leukemia with a *KMT2A* gene rearrangement, was described (Borkhardt et al., 2003). It has also been demonstrated that the in vitro exposure to chlorpyrifos induces DNA double-strand breaks and breakage of the *KMT2A* gene in human hematopoietic stem cells (CD34+) (Lu et al., 2015). In contrast, an in vitro study showed that subacute treatments with three different pesticides α -cypermethrin, chlorpyrifos and imidacloprid did not affect the integrity of the *TP53* gene determined by COMET/fluorescence in situ hybridization (FISH) assay (Zeljezic et al., 2017). In the same way as those reports that found abnormalities in leukemia genes induced by pesticides, we recently reported that high acute exposures of permethrin and malathion induce in vitro alterations in *IGH* and *KMT2A*, which are genes involved in leukemia and lymphoma etiology (Navarrete-Meneses et al., 2017). These genes are involved in the etiology of lymphoid malignancies forming translocations as *IGH-EPOR*, *IGH-CRLF2*, *IGH-MYC* and *IGH-BCL2*, among other rearrangements, and *KMT2A* is the translocation partner of more than 70 different leukemic gene fusions (Andersson et al., 2015; Chapiro et al., 2013; Moorman et al., 2012).

Permethrin and malathion are insecticides widely used in multiple human activities (Ferland, Côté, Ratelle, Thuot, & Bouchard, 2015; Morgan, 2012; Quirós-Alcalá et al., 2011). Permethrin belongs to the group of pyrethroid pesticides and it is commonly used in agriculture in several countries (Krieger, 2010; Matthews, 2008; Rusiecki et al., 2009). Permethrin is frequently used as an insect repellent, and it is recommended for the eradication of lice and scabies and for the control of vector-borne diseases such as dengue (Menegaux et al., 2006; Morgan, 2012). The International Agency for Research on Cancer (IARC) considers permethrin as non-classifiable as a carcinogen (IARC, 1990). However, the Environmental Protection Agency (EPA) classifies it as “a possibly carcinogenic to humans” (US EPA, 2015). Malathion is an organophosphate used in agricultural crops, domestic gardens, household products, as well as to kill fleas in domestic animals and to treat pediculosis in humans (IARC, 2016; Krieger, 2010). The IARC has classified malathion as “probably carcinogenic to humans” (IARC, 2016). The exposure to both pesticides has been associated with the risk of hematopoietic cancer (Alavanja et al., 2014; Ding et al., 2012; Hernández & Menéndez, 2016; McDuffie et al., 2001; Menegaux et al., 2006; Rusiecki et al., 2009).

We have previously reported that both insecticides at a high concentration (200 μM , 24 hours) induce damage in *KMT2A* and *IGH* genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) exposed in vitro. In addition, we found that low concentrations of these chemicals (0.1 μM) induced gene fusions in K562 lymphoblastoid cells (Navarrete-Meneses et al., 2017). In the present study, we evaluated if permethrin and malathion induce damage in *KMT2A* and *IGH* genes at low concentration (0.1 μM) on PBMCs exposed in vitro. The damage to these genes was determined using break-apart gene probes by the FISH method. Our results show that low concentrations of permethrin and malathion induce aberrations in *KMT2A* and *IGH* genes, which are associated with leukemia and lymphoma etiology.

2 | MATERIALS AND METHODS

To compare the results of the present study with our previous report, and with others referred in the literature, we used adult human PBMCs stimulated with phytohemagglutinin (Barrueco, Herrera, Caballo, & de la Pe a, 1994; Błasiak, Jatoszynski, Trzeciak, & Szyfter, 1999; Garry, Nelson, Griffith, & Harkins, 1990; Pluth, Nicklas, O'Neill, & Albertini, 1996; Surrallés et al., 1995; Titenko-Holland et al., 1997; Turkez & Aydin, 2012; Undeđer & Başaran, 2005). The exposure conditions were based on reported data, selecting a concentration of pesticides regarded as biologically relevant (Błasiak et al., 1999; Ramos-Chavez et al., 2015). In addition, considering the calculations suggested by Guyton and Hall (1996), both concentrations used (permethrin 0.039 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and malathion 0.033 $\mu\text{g ml}^{-1}$) are similar or lower than the equivalent to the acceptable daily intakes (ADI) (Guyton & Hall, 1996). The ADI of permethrin is 0.05 $\text{mg kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, which is equivalent to 0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and the ADI of malathion is 0.02 $\text{mg kg}^{-1} \text{day}^{-1}$, which corresponds to 0.033 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (US EPA, n.d.; Permethrin, 2009).

2.1 | Cell cultures and exposure to insecticides

Peripheral blood samples from two young healthy male non-smoker volunteers were obtained. Informed consent was obtained according to the recommendations of the Helsinki Declaration. PBMCs were isolated from peripheral blood using a density gradient medium (Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway). Cells were cultured at a final density of $5\text{--}7 \times 10^5$ cells ml^{-1} in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% non-essential amino acids (Gibco), 1% sodium pyruvate (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco) and 2% phytohemagglutinin (Gibco).

The cell cultures were exposed to six different conditions: (1) untreated (control); (2) 0.4% of dimethylsulfoxide (permethrin and etoposide solvent); (3) 0.1 μM (0.039 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of permethrin (mixture of 27% *cis* and 71% *trans* isomers, CAS no. 52645-53-11; Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA); (4) 0.2% of ethanol (malathion solvent); (5) 0.1 μM (0.033 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of malathion (analytical grade, CAS no. 121-75-5; Sigma-Aldrich, USA); and (6) 1 μM of etoposide as a positive control. Each culture condition was performed in triplicate. The agents were administered at 0, 24 and 48 hours of culture. After 72 hours, the viability was evaluated by flow cytometry with 7-aminoactinomycin

D. The cells were harvested by centrifugation at 126 g for 15 minutes and then incubated with colchicine (Sigma-Aldrich) at 37°C for 90 minutes, and with hypotonic solution (0.075 M KCl; Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C for 20 minutes. The cells were then fixed with Carnoy's fixative solution (3:1 methanol: acetic acid; Merck). Cell suspensions were kept at 4°C until slide preparation.

2.2 | Fluorescence in situ hybridization analysis

FISH analysis for detecting gene breakages was undertaken. Dual-color break-apart probes were used to detect breakages of *KMT2A* (Vysis, Gaithersburg, MD, USA) and *IGH* (Vysis) genes. The *KMT2A* probe hybridizes at 11q23, the centromeric portion of its breakpoint cluster region (BCR) region is labeled with spectrum green fluorochrome and the telomeric region is labeled with spectrum orange. The *IGH* probe hybridizes at 14q32 and consists of two fragments; one hybridizes with the IGHV region labeled with spectrum green fluorochrome, and the other spanning the 3'-IGH region is labeled with spectrum orange. Each probe was hybridized in independent assays.

Using the above-mentioned break-apart probes the normal cells are observed with two yellow signals as a consequence of the co-localization of the green and orange signals (two green–orange fusion signals). Cells with gene breakage show one normal yellow allele, one orange and one green signal representing the broken allele. A total of 500 interphases and 30 metaphases were scored per each triplicate condition. In addition, the mitotic index was determined in each scored slide. The FISH analysis was performed in a double-blinded way.

2.3 | Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons were performed between the control (dimethyl sulfoxide [DMSO] or ethanol) and insecticide-treated groups. The Mann–Whitney *U*-test was used to compare cell viability, the number of total altered cells, and the number of cells with numerical or structural alterations (cells with *KMT2A* or *IGH* breakages). The comparisons were considered statistically significant when $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Viability tests and mitotic index

The viability estimated by flow cytometry showed a slight decrease in cultures treated with permethrin and malathion, compared to the solvents. However, cell viability was always above 80%. In addition, a slight decrease in mitotic index was observed with malathion and permethrin. However, no statistical differences were found between the different treatments (Figure 1).

3.2 | Analysis of *KMT2A* gene in interphase nuclei

The analysis of numerical alterations (copy number variations) showed a significant increase in the cultures treated with insecticides

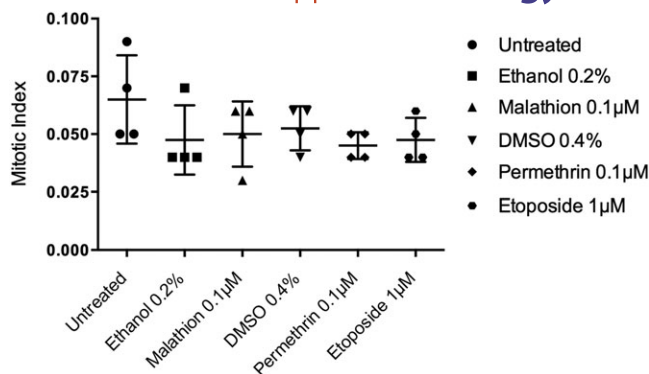


FIGURE 1 Mitotic index of cultures exposed to permethrin and malathion. No statistical difference was observed with Mann–Whitney *U*-test. DMSO, dimethyl sulfoxide

compared with the controls. These types of aberrations were more frequently observed in the cells exposed to permethrin (15 of 500 cells), followed by malathion (12.8 of 500 cells) ($P = .001$, $P = .013$, respectively). A significant difference was also detected in cells exposed to the solvents DMSO and ethanol compared to the untreated cells, although the p values were higher (DMSO $P = .037$, ethanol = 0.025) (Figure 2). The most frequent numerical alteration was the loss of one signal (Figure 3A,B).

For structural abnormalities, no statistical difference was found between solvents and untreated cultures. The highest number of cells with structural alterations was detected in the cultures exposed to malathion (12 of 500), followed by those treated with permethrin (8 of 500 cells); in both cases the increases were significant ($P = .013$, $P = .046$, respectively). In addition to the characteristic breakage expected for the break-apart *KMT2A* probe, a wide variety of structural lesion patterns were also found (Figures 3A,C and 4).

3.3 | Analysis of *IGH* gene in interphase nuclei

The frequency of baseline total abnormalities in the untreated cultures was 12.8 of 500 cells scored. The cells treated with the solvents did not increase statistically the number of abnormal cells. The highest

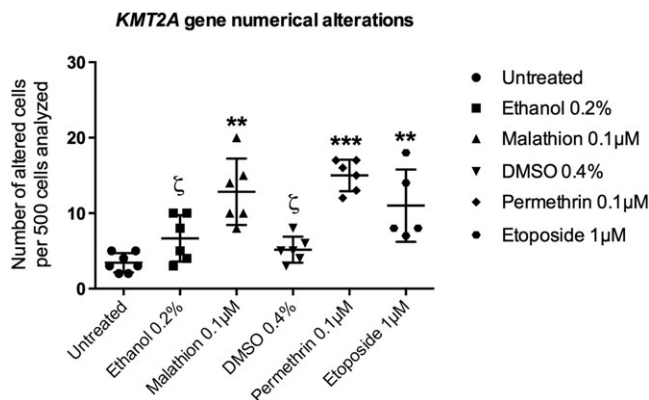


FIGURE 2 Copy number variations detected in *KMT2A* gene in cells exposed to insecticides. Mann–Whitney *U*-test, $**P < .01$, $***P < .005$, compared to the respective solvents. $\zeta P < .05$, compared to the untreated cells. DMSO, dimethyl sulfoxide

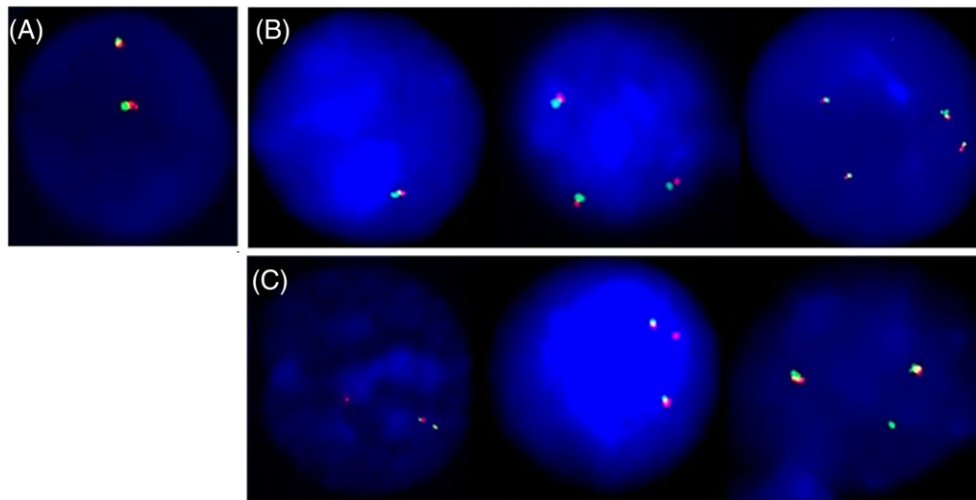


FIGURE 3 *KMT2A* gene analysis in cells exposed to insecticides. (A) Normal cell showing two normal *KMT2A* fusion signals. (B) Cells with numerical *KMT2A* aberrations: cell with loss of one *KMT2A* copy, and cells with one and two extra copies of *KMT2A*. (C) Cells with structural aberrations in *KMT2A* gene: cell with the conventional *KMT2A* breakage, a cell with two normal *KMT2A* fusion signals and an extra telomeric portion (orange signal), and a cell with two normal *KMT2A* fusion signals and an extra centromeric signal (green probe)

number of abnormal cells was observed in the cultures treated with permethrin (27.8 of 500 cells), followed by treatments with etoposide (24.6 of 500) and malathion (23.3 of 500); the three treatments showed statistically significant differences when compared to their respective controls ($P = .001$, $P = .002$, $P = .002$, respectively) (Figure 5).

The analysis of numerical alterations (copy number deviations) showed that permethrin treatment produced more cells with loss or gain of *IGH* copies (8.2 of 500 cells), followed by treatment with malathion (6.3 of 500), and with etoposide (5.8 of 500). The most common numerical alteration was the loss of one *IGH* copy. The increase in the number of cells with numerical alterations in the cultures exposed to permethrin and malathion was statistically significant when compared to solvents ($P = .032$, $P = .032$ respectively) (Figures 6 and 7A,B).

Structural alterations in *IGH* gene were more frequent with permethrin treatment (19.7 of 500), followed by etoposide (18.8 of 500) and malathion (17 of 500); these increases were significant in all three cases ($P = .001$, $P = .002$, $P = .004$, respectively). A wide variety of

patterns of structural damage was observed in cultures treated with malathion compared with the other treatments. In general, the structural alterations were more diverse and complex in the *IGH* gene than those found in the *KMT2A* gene (Figures 7A–C and 8).

3.4 | Analysis of *KMT2A* and *IGH* genes on metaphases

The analysis of the *KMT2A* gene showed the highest number of abnormal metaphases in cultures exposed to permethrin (three abnormal metaphases of 180 analyzed). The most frequently detected pattern was the deletion of the green probe (centromeric region); in different cells other patterns were detected, suggesting the presence of inversion, translocation and trisomy (Figure 9A–C).

A major number of metaphases with *IGH* abnormalities were detected in comparison to *KMT2A*. More abnormalities were detected with permethrin than with malathion (seven abnormal metaphases of 180 analyzed). The cultures exposed to permethrin presented more

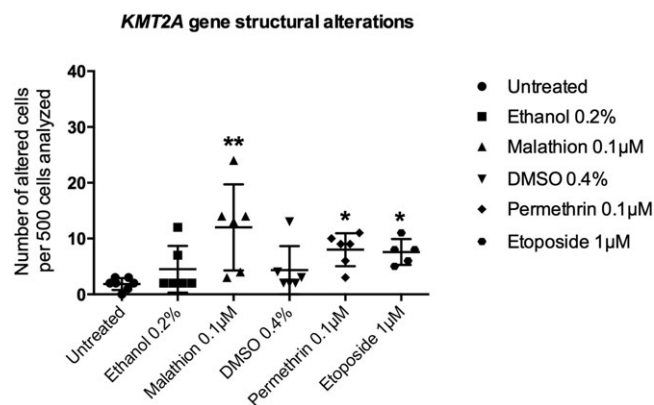


FIGURE 4 Structural alterations detected in *KMT2A* gene in cells exposed to insecticides. Mann-Whitney *U*-test, $*P < .05$, $**P < .01$, compared to the respective solvents. DMSO, dimethyl sulfoxide

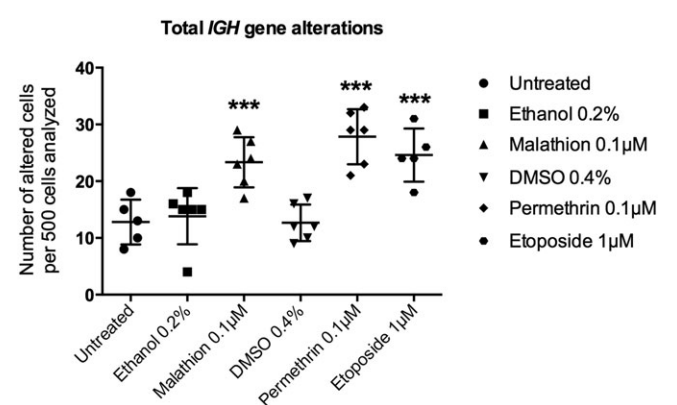


FIGURE 5 Numerical and structural *IGH* gene alterations in cells exposed to insecticides. Mann-Whitney *U*-test, $***P < .005$, compared to the respective solvents. DMSO, dimethyl sulfoxide

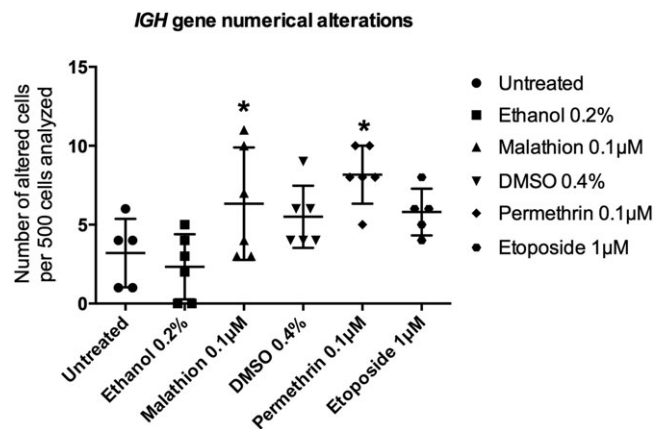


FIGURE 6 Numerical *IGH* gene alterations in cells exposed to insecticides. Mann-Whitney *U*-test, **P* < .05, compared to the respective solvents. DMSO, dimethyl sulfoxide

than twice the abnormal metaphases found in cultures exposed to DMSO; however, the difference was not significant (*P* = .066). The most frequent pattern observed in metaphases was the terminal deletion of *IGH*, although other abnormalities were detected as interstitial deletion, monosomy and more complex rearrangements as coexistence of an inversion with deletion (Figure 9D–F).

4 | DISCUSSION

Epidemiological studies suggest an association between pesticide exposure and the development of hematopoietic cancer (Alavanja & Bonner, 2012; Ding et al., 2012; Hernández & Menéndez, 2016; Rusiecki et al., 2009). However, there are limited studies that analyze the effects of pesticides in genes involved in leukemogenic rearrangements. Most studies that evaluate the genotoxicity of pesticides have used high concentrations (25–1800 μM) of these agents

(Barrueco et al., 1994; Herrera, Barrueco, Caballo, & de la Pe a, 1992; Surrallés et al., 1995; Turkez & Aydin, 2012; Undeğer & Başaran, 2005). However, it is important to analyze concentrations closer to those found in human environmental or occupational exposures. Therefore, the aim of this study was to provide evidence about the effect of the continued exposure to low concentrations (0.1 μM) of permethrin and malathion in *KMT2A* and *IGH* genes, which are frequently involved in the development of leukemia and lymphoma of B-cell lineage (Andersson et al., 2015; Chapiro et al., 2013; Moorman et al., 2012; Roulland et al., 2004).

The pesticide exposure caused a slight decrease in cell viability. However, the mitotic index was not affected significantly, reflecting the cell division capacity. In addition, dividing cells were found in all treatments, thus *KMT2A* and *IGH* genes were also analyzed in metaphase spreads. Based on the results of viability and the mitotic index it was determined that the cytotoxic effect of these agents at the concentration assessed is non-significant. In addition, both pesticides increased the frequency of numerical, copy number deviations and structural aberrations in the analyzed genes. Although numerical abnormalities induced by permethrin in *KMT2A*, and structural aberrations generated by both pesticides in *IGH* were particularly frequent.

For *KMT2A* a higher proportion of the conventional break-apart pattern 1 fusion (F), 1 green (G), 1 orange (O) was expected. However, the most frequent patterns in interphase and metaphase with both insecticides were 2F,1O signals and 2F,1G signals. These patterns could be formed through an alternative breakpoint occurring distant from the BCR, resulting in the split of the orange or green signals. Alternatively, these patterns could also arise as a consequence of a *KMT2A* break in a single sister chromatid that was not correctly attached by cohesins to the other sister chromatid (Glukhov et al., 2013). Patterns 1F,1O and 1F,1G were also frequent; a possible mechanism to generate them could be through interstitial or terminal deletions. More complex patterns

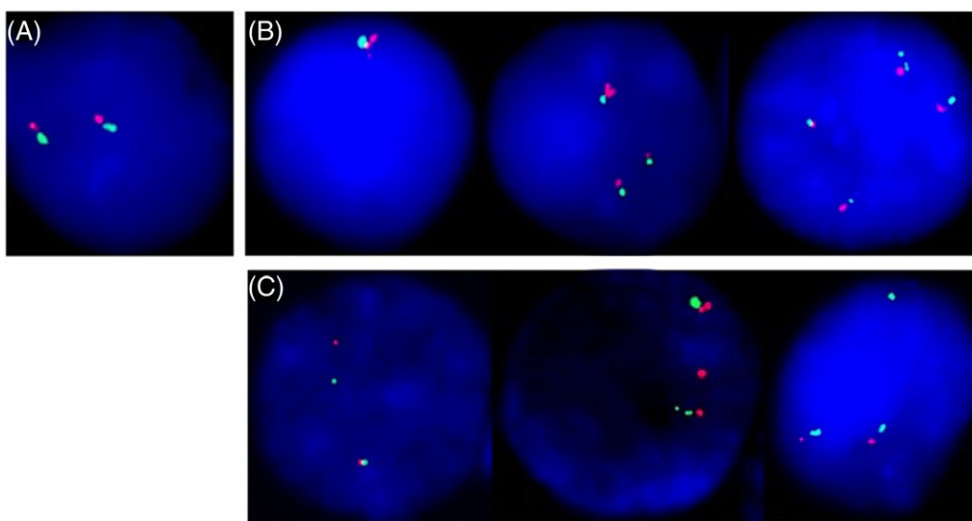


FIGURE 7 *IGH* gene alterations detected in cells exposed to insecticides. (A) Normal cell with two fused *IGH* copies. (B) Cells with numerical alterations in *IGH* gene: cell with loss of one *IGH* copy, and cells with one and two gains of *IGH* copies. (C) Cells with *IGH* gene structural alterations: a cell with the conventional *IGH* breakage; a cell with two normal *IGH* copies and one extra centromeric fragment, and a cell with two normal *IGH* copies and one extra telomeric portion

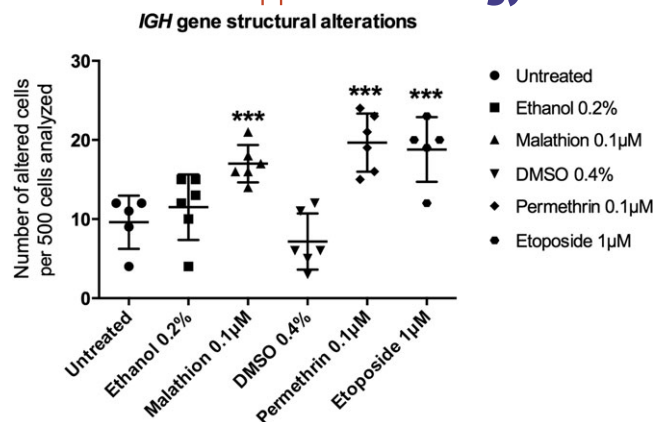


FIGURE 8 Structural alterations in *IGH* gene in cells exposed to insecticides. Mann-Whitney *U*-test, ****P* < .001, compared to the respective solvents. DMSO, dimethyl sulfoxide

were observed suggesting that more than one event occurred; most of them were previously reported in exposures to higher concentrations of these same pesticides and in cells treated with etoposide (Libura, Ward, Solecka, & Richardson, 2008; Sung, Libura, & Richardson, 2006).

The mechanism of induction of breakages in *KMT2A* is unknown. However, it is referred that this gene is susceptible to breakage given that the BCR is rich in AT, contains repetitive Alu, LINE and MER sequences, and presents a DNA topoisomerase II cleavage recognition site, as well as a scaffold and a matrix binding region (SAR/SEA) (Glukhov et al., 2013; Le et al., 2009; Sung et al., 2006). One mechanism proposed to cause damage is the inhibition of DNA topoisomerase II by pesticides. *KMT2A* possess a recognition site for

this enzyme, which makes it prone to damage (Glukhov et al., 2013; Sung et al., 2006). It has also been reported that the organophosphate, chlorpyrifos, inhibits DNA topoisomerase II and generates ruptures in *KMT2A* (Lu et al., 2015). Permethrin also has estrogenic activity. Catechol estrogens are metabolized by peroxidases generating semiquinones and quinones, which form DNA adducts and produce oxidative stress. The resulting quinones are analogous to benzene metabolites and to the flavonoids genistein and quercetin, which are capable of inhibiting DNA topoisomerase II and have been implicated in the induction of indirect damage to *KMT2A* (Chen et al., 2002; Du et al., 2010; Le et al., 2009; Schnyder et al., 2009; Strick, Strissel, Borgers, Smith, & Rowley, 2000).

IGH gene showed a greater number of alterations compared to *KMT2A*, even in control cultures. This may be caused by the larger size of the probe that can appear fragmented. However, it cannot be ruled out that *IGH* could be more susceptible to breakage than *KMT2A* as *IGH* presented more damage induced by the applied pesticides. The cell cultures with higher numerical abnormalities were those exposed to permethrin, confirming its aneuploidogenic effect. The aneuploidogenic effect of this pyrethroid was also suggested when applied in high acute concentrations (Institóris, Undeger, Siroki, Nehéz, & Dési, 1999; Navarrete-Meneses et al., 2017). Although the exposure to malathion caused both types of damage (numerical and structural), the most frequent was structural.

The *IGH* classical breakage (1F, 1V, 1R) was the most common structural alteration in interphase nuclei in all the cultures; however, in metaphase other rearrangements were detected. The most common interphase patterns were similar to those observed in *KMT2A* (2F, 1V and 2F, 1R), suggesting that the gene was broken at the 5' or 3' ends to the BCR.

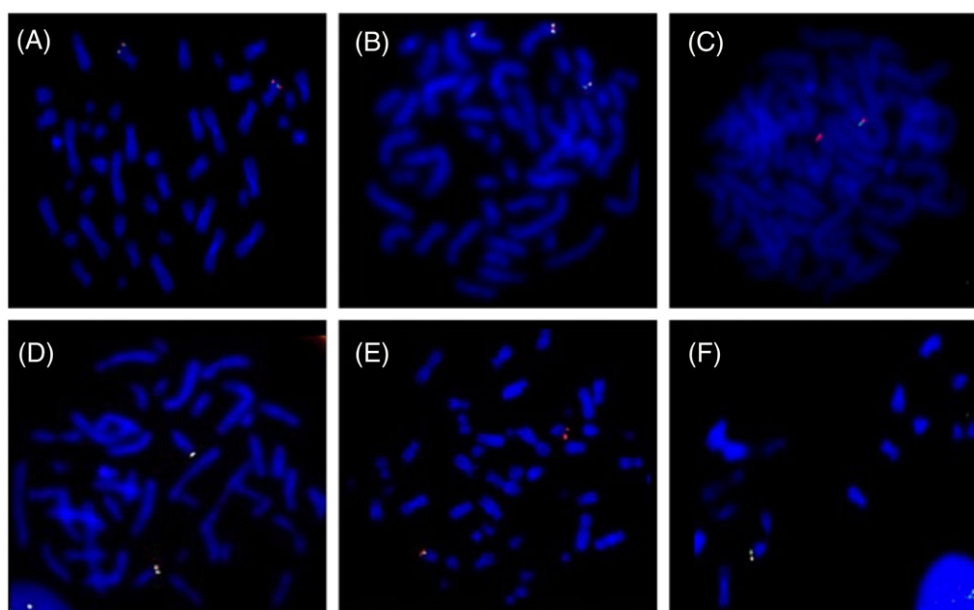


FIGURE 9 Metaphase spreads with *KMT2A* and *IGH* alterations. (A) Normal metaphase showing two *KMT2A* normal signals on chromosomes 11. (B) Abnormal metaphase with gain of a fused *KMT2A* signal, suggesting a trisomy of chromosome 11. (C) Abnormal metaphase showing one normal *KMT2A* fused signal and a chromosome with loss of the centromeric portion (green), suggesting an interstitial deletion. (D) Normal metaphase showing two *IGH* normal signals on chromosomes 14. (E) Abnormal metaphase showing a chromosome 14 with loss of the telomeric *IGH* portion. (F) Abnormal metaphase showing a chromosome 14 with an *IGH* signal close to the centromere and loss of the telomeric portion, suggesting an inversion with loss of the terminal region of *IGH*

To date there are no previous reports that show exposure to pesticide causes damage in *KMT2A* and *IGH* directly on metaphases; therefore, these results are relevant. The metaphase analysis of *KMT2A* did not show the classic breakage (1F, 1G, 1O); nevertheless, the detected patterns suggest deletion, inversion and a trisomy. The evidence that permethrin induces aneuploidy in metaphases confirmed the results observed in interphase nuclei at low and high concentrations (Navarrete-Meneses et al., 2017). For *IGH*, the metaphases showed a greater amount of alterations in comparison to those detected for *KMT2A*. The variety and complexity of patterns were also greater. In agreement to the interphase assay, the most recurrent pattern was the loss of the green probe localized at the telomeric region, suggesting a terminal deletion. It has been reported that deletions of the variable region (corresponding to green probe) may be the source of the DNA loss that accompanies VDJ recombination, and could participate in the oncogenic process (Huh, Mun, Yoo, Seong, & Chung, 2015). We also detected a paracentric inversion involving two breaks, one on the telomeric portion of *IGH* (14q32), and the other on the region close to the centromere of chromosome 14, followed by the inversion and rejoining of the broken fragment. In accordance to the interphase assay, the cultures with more abnormal metaphases were those exposed to permethrin. The metaphase analysis validates the patterns observed by FISH in interphase, giving a realistic valuation of actual breaks and rearrangements. In addition, the results demonstrate that the classic breakage is not the only abnormality that must be scored, as cells with other patterns can survive to progress to metaphase. These cells can proliferate despite the damaged genes, and could form oncogenic fusions as has been observed in the K567 cell line in our previous report, and in studies conducted in farmers exposed to pesticides who carry cells with *IGH-BCL2* fusions (Navarrete-Meneses et al., 2017; Roulland et al., 2004).

The results obtained show that exposure to low concentrations of permethrin and malathion are capable of inducing damage in *KMT2A* and *IGH* genes. These genes are important in the development of leukemia, and the lesions induced by these agents could represent the earlier steps for the development of this disease (Greaves & Wiemels, 2003; Roulland et al., 2004). However, other cell types that represent more closely the etiology of leukemia, such as stem cells and hematopoietic progenitors, have yet to be studied. In addition, the effect of these insecticides should be evaluated in vivo with different exposure times, to know if the same effect is observed or adequate repair of the damage occurs. The mechanism of induction of damage should also be studied in depth, and if there are sites in the genome that are more susceptible to damage by exposure to these pesticides.

ACKNOWLEDGMENTS

This article constitutes a partial fulfillment of the requirements of the PhD Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México). The doctoral student, María del Pilar Navarrete Meneses acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT), and UNAM. The authors would like to acknowledge Fundación Miguel

Alemán, Fondos Federales del Instituto Nacional de Pediatría, Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACyT CB-2012-01/183467.

CONFLICT OF INTEREST

The authors did not report any conflict of interest.

ORCID

M. P. Navarrete-Meneses  <http://orcid.org/0000-0002-2686-4101>

C. Salas-Labadía  <http://orcid.org/0000-0002-3301-7357>

D. Moreno-Lorenzana  <http://orcid.org/0000-0003-3029-4241>

P. Pérez-Vera  <http://orcid.org/0000-0001-5662-6991>

REFERENCES

- Alavanja, M. C. R., & Bonner, M. R. (2012). Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 15, 238–263. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632358>
- Alavanja, M. C. R., Hofmann, J. N., Lynch, C. F., Hines, C. J., Barry, K. H., Barker, J., ... Beane Freeman, L. E. (2014). Non-hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. *PLoS One*, 9, e109332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109332>
- Andersson, A. K., Ma, J., Wang, J., Chen, X., Gedman, A. L., Dang, J., ... St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2015). The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nature Genetics*, 47, 330–337. <https://doi.org/10.1038/ng.3230>
- Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C., & de la Peña, E. (1994). Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 14, 31–38.
- Błasiak, J., Jałoszynski, P., Trzeciak, A., & Szyfter, K. (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutation Research*, 445, 275–283.
- Borkhardt, A., Wilda, M., Fuchs, U., Gortner, L., & Reiss, I. (2003). Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 88, F436–F437.
- Chapiro, E., Radford-Weiss, I., Cung, H.-A., Dastugue, N., Nadal, N., Taviaux, S., ... Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (2013). Chromosomal translocations involving the IGH@ locus in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: 29 new cases and a review of the literature. *Cancer Genetics*, 206, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.04.004>
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., & Wang, X. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 65, 1419–1435. <https://doi.org/10.1080/00984100290071243>
- Deziel, N. C., Colt, J. S., Kent, E. E., Gunier, R. B., Reynolds, P., Booth, B., ... Ward, M. H. (2015). Associations between self-reported pest treatments and pesticide concentrations in carpet dust. *Environmental Health*, 14. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0015-x>
- Ding, G., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., ... Tian, Y. (2012). Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environmental Science & Technology*, 46, 13480–13487. <https://doi.org/10.1021/es303362a>
- Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., ... Wang, X. (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicological Sciences*, 116, 58–66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq120>
- Ferland, S., Côté, J., Ratelle, M., Thuot, R., & Bouchard, M. (2015). Detailed urinary excretion time courses of biomarkers of exposure to permethrin and estimated exposure in workers of a corn production farm in

- Quebec, Canada. *The Annals of Occupational Hygiene*, 59, 1152–1167. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mev059>
- Fuscoe, J. C., Setzer, R. W., Collard, D. D., & Moore, M. M. (1996). Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis*, 17, 1013–1020.
- Garry, V. F., Nelson, R. L., Griffith, J., & Harkins, M. (1990). Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 10, 21–29.
- Glukhov, S. I., Rubtsov, M. A., Alexeyevsky, D. A., Alexeevski, A. V., Razin, S. V., & Iarovaia, O. V. (2013). The Broken MLL Gene Is Frequently Located Outside the Inherent Chromosome Territory in Human Lymphoid Cells Treated with DNA Topoisomerase II Poison Etoposide. *PLoS One*, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075871>
- Greaves, M. F., & Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 3, 639–649. <https://doi.org/10.1038/nrc1164>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (1996). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders Company.
- Hernández, A. F., & Menéndez, P. (2016). Linking pesticide exposure with pediatric leukemia: potential underlying mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 461. <https://doi.org/10.3390/ijms17040461>
- Herrera, A., Barrueco, C., Caballo, C., & de la Peña, E. (1992). Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 20, 218–222.
- Huh, J., Mun, Y. C., Yoo, E. S., Seong, C. M., & Chung, W. S. (2015). Submicroscopic deletions of immunoglobulin heavy chain gene (IGH) in precursor B lymphoblastic leukemia with IGH rearrangements. *Annals of Laboratory Medicine*, 35, 128–131. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.128>
- IARC. (1990). IARC monograph. Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-13.pdf>
- IARC. (2016). IARC Monographs Volume 112: evaluation of – MonographVolume112.pdf. Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-07.pdf>
- Institóris, L., Undeger, U., Siroki, O., Nehéz, M., & Dési, I. (1999). Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology*, 137, 47–55.
- Krieger, R. I. (2010). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Elsevier.
- Lafiura, K. M., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., Ostrea, E. M., Matherly, L. H., Taub, J. W., & Ge, Y. (2007). Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatric Blood & Cancer*, 49, 624–628. <https://doi.org/10.1002/pbc.21283>
- Le, H., Singh, S., Shih, S.-J., Du, N., Schnyder, S., Loredó, G. A., ... Vaughan, A. T. (2009). Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 48, 806–815. <https://doi.org/10.1002/gcc.20685>
- Libura, J., Ward, M., Solecka, J., & Richardson, C. (2008). Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential. *European Journal of Haematology*, 81, 185–195. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01103.x>
- Lu, C., Liu, X., Liu, C., Wang, J., Li, C., Liu, Q., ... Shao, J. (2015). Chlorpyrifos induces MLL translocations through caspase 3-dependent genomic instability and topoisomerase II inhibition in human fetal liver hematopoietic stem cells. *Toxicological Sciences*, 147, 588–606. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv153>
- Matthews, G. (2008). *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. NY, USA: John Wiley & Sons.
- McDuffie, H. H., Pahwa, P., McLaughlin, J. R., Spinelli, J. J., Fincham, S., Dosman, J. A., ... Choi, N. W. (2001). Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 1155–1163.
- Menegaux, F., Baruchel, A., Bertrand, Y., Lescoeur, B., Leverger, G., Nelken, B., ... Clavel, J. (2006). Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occupational and Environmental Medicine*, 63, 131–134. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.023036>
- Moorman, A. V., Schwab, C., Ensor, H. M., Russell, L. J., Morrison, H., Jones, L., ... Harrison, C. J. (2012). IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 3100–3108. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.3907>
- Morgan, M. K. (2012). Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9, 2964–2985. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082964>
- Navarrete-Meneses, M. P., Salas-Labadía, C., Sanabrais-Jiménez, M., Santana-Hernández, J., Serrano-Cuevas, A., Juárez-Velázquez, R., ... Pérez-Vera, P. (2017). Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations in vitro. *Toxicology In Vitro*, 44, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.013>
- Permethrin. (2009). WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Retrieved December 22, 2017, from http://www.who.int/whopes/quality/en/Permethrin_specs_eval_WHO_March_2009.pdf
- Pluth, J. M., Nicklas, J. A., O'Neill, J. P., & Albertini, R. J. (1996). Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Research*, 56, 2393–2399.
- Quirós-Alcalá, L., Bradman, A., Nishioka, M., Harnly, M. E., Hubbard, A., McKone, T. E., ... Eskenazi, B. (2011). Pesticides in house dust from urban and farmworker households in California: an observational measurement study. *Environmental Health*, 10, 19. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-19>
- Ramos-Chavez, L. A., Sordo, M., Calderon-Aranda, E., Castañeda-Saucedo, E., Ostrosky-Wegman, P., & Moreno-Godinez, M. E. (2015). A permethrin/allevethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 78:7–14. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.956025>
- Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Briand, M., Pottier, D., & Gauduchon, P. (2004). Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Research*, 64, 2264–2269.
- Rusiecki, J. A., Patel, R., Koutros, S., Beane-Freeman, L., Landgren, O., Bonner, M. R., ... Alavanja, M. C. R. (2009). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 117, 581–586. <https://doi.org/10.1289/ehp.11318>
- Schinasi, L., & Leon, M. E. (2014). Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 4449–4527. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404449>
- Schnyder, S., Du, N. T., Le, H. B., Singh, S., Loredó, G. A., & Vaughan, A. T. (2009). Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. *Leukemia Research*, 33, 1400–1404. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.01.023>
- Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L., & Rowley, J. D. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4790–4795. <https://doi.org/10.1073/pnas.070061297>

- Sung, P. A., Libura, J., & Richardson, C. (2006). Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair*, 5, 1109–1118. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.018>
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., & Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 341, 169–184.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M., & Smith, M. T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, 388, 85–95.
- Turkez, H., & Aydin, E. (2012). The effects of taurine on permethrin-induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63, 27–34. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2114>
- Turner, M. C., Wigle, D. T., & Krewski, D. (2010). Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 118, 33–41. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900966>
- Undeğer, U., & Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0616-6>
- US EPA. (2015). About Pesticides. Washington, DC: US EPA. Retrieved from <http://www.epa.gov/pesticides/about/>
- US EPA. (n.d.). Health and environmental effects profile for malathion (Reports & Assessments). EPA/600/X-84/328 (NTIS PB88180468). Washington, DC: US EPA. Retrieved from <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=39349>
- Zeljezic, D., Vinkovic, B., Kasuba, V., Kopjar, N., Milic, M., & Mladinic, M. (2017). The effect of insecticides chlorpyrifos, α -cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere*, 182, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.010>

How to cite this article: Navarrete-Meneses MP, Pedraza-Meléndez AI, Salas-Labadía C, Moreno-Lorenzana D, Pérez-Vera P. Low concentrations of permethrin and malathion induce numerical and structural abnormalities in *KMT2A* and *IGH* genes in vitro. *J Appl Toxicol*. 2018;1–9. <https://doi.org/10.1002/jat.3638>

Mini Review

María del Pilar Navarrete-Meneses and Patricia Pérez-Vera*

Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence

<https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0070>

Received November 8, 2018; accepted January 23, 2019

Abstract: Pyrethroid insecticides are commonly used worldwide. The chronic effects of these compounds are of concern given that epidemiological studies have suggested an association with hematological cancer, particularly in children. However, the biological evidence at molecular and cellular levels is limited. A review on the molecular and cellular effects of pyrethroids is helpful to guide the study of the biological plausibility of the association of pyrethroids with hematological cancer. We reviewed studies suggesting that pyrethroids are genotoxic, induce genetic rearrangements, alter gene expression and modify DNA. All of these biological modifications could potentially contribute to the carcinogenic process in hematopoietic cells.

Keywords: insecticides; leukemia; lymphoma; permethrin; pyrethroids.

Introduction

Pyrethroids are among the most commonly used pesticides worldwide. For example, in China alone 3000 tons are produced every year (1). Pyrethroids are an essential tool in agriculture, vastly reducing crop loss to pests (2). These chemicals are often used for impregnating the clothes of persons exposed to insects, such as soldiers, travelers and forestry workers (3, 4). The World Health Organization (WHO) estimates that vector-borne diseases account for more than 17% of all infectious diseases, causing more

than 1 million deaths annually, and has recommended the use of pyrethroids for the treatment of mosquito nets (5). Pyrethroids are also very important for public health, being commonly used in hospitals. Particularly in children, these pesticides are frequently used to treat scabies and lice (6). Furthermore, a great number of household insecticides contain pyrethroids (7, 8). All these uses of pyrethroids highlight their major importance in countless human activities, including the control of several vector-borne diseases, such as malaria, dengue and Zika. However, there is concern regarding the possible chronic and acute adverse effects of these insecticides, because millions of people worldwide may be exposed in different ways to these products (1).

This potentially global exposure is of great concern because pyrethroids could be associated with increased cancer risk. Epidemiological studies have suggested that the exposure to these insecticides could be associated with hematological cancer, particularly with childhood leukemia (1). Although epidemiological studies have suggested an association of pyrethroids with hematopoietic cancer, these studies show certain limitations given that are questionnaire-based, making it difficult to accurately know the level and type of exposure. In addition, the information regarding the biological mechanisms supporting this epidemiological association is not completely conclusive and rather controversial. As a consequence, the International Agency of Research on Cancer (IARC) considers that certain pyrethroids, such as permethrin and deltamethrin, are not classifiable with regard to their carcinogenicity to humans, and more research is needed (9). On the other hand, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), considers these insecticides as likely to be carcinogenic (4). Epidemiological studies evaluating the association of pyrethroids with cancer have been compiled (10–13). However, a review synthesizing the available information regarding the effects of pyrethroids at cellular and molecular levels, focusing on the relationship of these effects with cancer induction, is still missing.

Several reports show that pyrethroids alter diverse biological functions (14–26). Pyrethroids bind directly

*Corresponding author: Patricia Pérez-Vera, PhD, Cancer Genetics Laboratory, Human Genetics Department, National Pediatrics Institute, Insurgentes Sur 3700-C, C.P. 04530 Mexico City, Mexico, Phone: +52 55 1084090 ext. 1471, E-mail: pperezvera@yahoo.com

María del Pilar Navarrete-Meneses: Cancer Genetics Laboratory, Human Genetics Department, National Pediatrics Institute, Mexico City, Mexico; and Graduate Program in Biological Sciences, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico

to DNA (27, 28), produce epigenetic modifications (21), disturb endocrine function (29–31), induce oxidative stress (32–34) and have many other effects (22, 34–36). The biological activity produced by pyrethroids may be potentially related to the carcinogenic process (37). A compilation of the recent information regarding the biological effects of pyrethroids together with the epidemiological information would help to better understand the biological plausibility linking these insecticides with cancer.

We review the current information regarding pyrethroids and their association with cancer, focusing on hematological cancer. We include information regarding the epidemiological studies in adults and children, given that there are differences between these groups. We also include the available studies showing the *in vitro* and *in vivo* biological effects of pyrethroids. Finally, we discuss the possible carcinogenic effects of pyrethroids, but first we give essential background considerations regarding pyrethroid mechanism of action, classification, use and exposure.

Literature searching

Available studies regarding pyrethroid insecticides, their global use, epidemiological data on the effect of exposure in humans, and their biological and molecular effects in human cells were collected from Pubmed, Google scholar, ScienceDirect and Medline databases until August 2018. Several combinations of the keywords: pesticides, insecticides, pyrethroids, permethrin, cypermethrin, deltamethrin, exposure, human, EPA, WHO, IARC, effect, epidemiology, levels, adults, forestry workers, children, cancer, risk, leukemia, lymphoma, hematopoiesis, acute lymphoblastic leukemia, childhood leukemia, multiple myeloma, leukemogenesis, genotoxicity, carcinogenicity, toxicity, chromosome aberrations, micronuclei, comet assay, cellular, apoptosis, proliferation, gene expression, DNA methylation, endocrine disruptor and mechanism were applied for searching.

The papers were reviewed with the aim of finding information addressing: 1) general characteristics of pyrethroids, 2) regulatory information regarding pyrethroids, 3) exposure data in humans (adults and children), 4) epidemiological studies associating pyrethroids with any type of cancer and with hematopoietic cancer (lymphoma, leukemia, multiple myeloma), 5) effect of pyrethroids on human cells, 6) the effect of pyrethroids on chromosomes, DNA, gene expression, cell signaling, biological processes, immune system, endocrinological system, and on oxidative stress, derived from *in vivo* and *in vitro* studies. All the literature concerning this information was included. Firstly, abstracts were

searched and compiled, duplicates were eliminated, and then the papers were selected focusing on the information described above. The full texts of the selected papers were carefully reviewed and the more relevant articles for this review were included. Additional studies were selected from the references of the reviewed articles. Studies addressing the effect of pyrethroids on insects, on aquatic species or on neurological system or other effects not associated with cancer were excluded. Papers written in a language different from English or published in non-peer reviewed journals were excluded. Studies involving human or murine models were preferred. All the information was searched, selected and reviewed by both authors.

Use and exposure to pyrethroid pesticides

Pyrethroids are synthetic insecticides derived from the natural pyrethrins and are divided into two major groups. Natural pyrethrins are chemical compounds produced by the chrysanthemum flower (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (38). Pyrethroids are synthetic insecticides obtained from pyrethrins. The first pyrethroids obtained were Type I (first generation) pyrethroids, such as permethrin and allethrin (Table 1). Type I pyrethroids are devoid of a cyano moiety at the α -position and are less persistent in the environment. Therefore, these insecticides are mainly used for control of indoor pests (38, 39). Type II (second generation) pyrethroids have a cyano group at the α -position and show improved efficacy and persistence. Examples of Type II pyrethroids are cypermethrin, fenvalerate and deltamethrin (Table 1) (7, 38). Both groups of pyrethroids are frequently used in countless human activities.

After the first synthetic pyrethroids were produced, their use and production have increased over decades. The use of pyrethroids increased even more when dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) was banned. In 2007, pyrethroids accounted for 17% of global insecticide sales. In 2011, the WHO recommended the use of pyrethroid mosquito nets to tackle malaria (4, 40). Regarding permethrin, a total of 1000 tonnes are applied each year in the United States. Approximately 70% of the volume produced is destined for non-agricultural uses, such as residential settings and mosquito abatement, and 30% is used on crops for agriculture. Because the use of pyrethroids has considerably risen worldwide, the human exposure through multiple routes has correspondingly increased (13, 41).

Humans are in contact with pyrethroids through multiple routes of exposure. This exposure can be occupational,

Table 1: Pyrethroids Type I and Type II.

Type I	Molecule	Type II	Molecule
<u>Permethrin</u>		<u>Cypermethrin</u>	
Allethrin		Fenvalerate	
Bifenthrin		Deltamethrin	
Phenothrin		Cyfluthrin	
Resmethrin		Fenpropathrin	
Tefluthrin		Flucythrinate	
Tetramethrin		Flumethrin	

for example, farmers, or non-occupational, for example, through household products (8, 42, 43). Individuals can be in direct contact with these chemicals through dietary ingestion, inhalation or non-dietary ingestion (43). The reference oral dose for permethrin recommended by U.S. Environmental Protection Agency (EPA) is 0.05 mg/kg/day, and 0.01 mg/kg/day for cypermethrin (8, 44). Pyrethroids can also be absorbed through skin, when using household products, impregnated clothes, shampoos or repellents (3, 7, 43, 45). Particularly children are in contact with pyrethroid-based products when treated for lice and scabies (6). Children can also be exposed through floor dust and floor wipes in addition to dietary ingestion of contaminated food

and water (8, 46). After pyrethroids enter the organism they are distributed in all the tissues and organs, and quantities of these chemicals can be detected.

Levels of all pyrethroids have been detected in numerous human samples. Metabolites of pyrethroids such as permethrin, cypermethrin and deltamethrin, have been detected in the urine of children and adults (1, 8, 47). The detection of pyrethroid metabolites correlates with exposure to permethrin and other pyrethroids from contaminated food, dust, air and floors (8). Derived from these studies, an accumulated dose of 0.002 mg/kg/day has been estimated (8). Moreover, fetal exposure has been reported because pyrethroids have the potential to cross the

placental barrier (48). Metabolite levels of 0.2 ng/mL have been detected in umbilical cord blood samples (48). Pyrethroid metabolites have also been detected in breast milk (49). Because metabolites of these insecticides have consistently been detected in numerous human samples, the metabolic reactions of pyrethroids have been of interest.

After pyrethroids enter the organism, metabolism and elimination occur. In mammals, pyrethroids in general are rapidly metabolized and almost completely eliminated in urine and feces several days after exposure (38). Permethrin reaches a peak of concentration in human plasma 7 h after oral exposure and is excreted almost completely within the next 48 h through urine (50). Pyrethroids do not leave residues in tissues, given that they are biodegradable and are not bio-accumulated (38). The most important metabolic pathways for pyrethroids are ester hydrolysis and oxidation, which are both mediated by carboxyl esterases and several *cytochrome P450* family isoforms (38). Although pyrethroids are relatively rapidly eliminated compared to other pesticides, there is concern regarding their harmful chronic effects, including cancer development.

Pyrethroid insecticides and hematological cancer

Cancer comprises a group of diseases strongly associated with environmental and lifestyle causes, so the identification of factors that could lead to cancer is of great importance in the field of cancer prevention (37, 51, 52). Different environmental factors have been associated with cancer, for example, tobacco, alcohol and ultraviolet irradiation, and their potentials to induce cancer have been demonstrated, and thus, have been classified as carcinogens by the IARC. However, there are certain groups of environmental factors, such as pesticides, whose carcinogenic effects are still controversial, and thus, are regarded as not classifiable as carcinogens (9, 53). Therefore, it is of great importance to further study the potential of these pesticides to contribute to the carcinogenic process. In addition, contrary to other types of environmental factors that have been regulated or banned (tobacco, DDT), the use of some pesticides, including pyrethroids has increased worldwide in the last decades (54).

As mentioned, the WHO, through the IARC, has identified certain potentially carcinogenic agents (52), including some pesticides. However, there are a large number of pesticides that have not been classified as carcinogens due to the lack of evidence. Several pyrethroids, such as

permethrin, are in this situation, being considered by the IARC as not classifiable regarding its carcinogenicity due to the lack of data (9, 10). However, the EPA classifies permethrin as a probable human carcinogen (4, 10). In addition, numerous studies have shown that several pesticides are genotoxic (38). This damage could lead to chromosome instability and oncogenic rearrangements, potentially transforming normal cells into malignant clones (37).

Although epidemiological studies have investigated the association of pyrethroid exposure with different types of cancer, such as colon, lung, melanoma, female breast and prostate, a recent systematic review that included 18 articles, concluded that there is no evidence of an increased risk of most cancers analyzed and pyrethroid exposure. However, the association of pyrethroid exposure with multiple myeloma and with childhood leukemia was not ruled out, and further studies were suggested (13). Taken together, this indicates that pyrethroid insecticides may be associated mainly with hematological cancer.

This is of great importance because hematological neoplasms are a group of diseases of high incidence and mortality in adults and children worldwide (41). New cases of leukemia, lymphoma and myeloma are expected to account for 10% of the estimated 1,735,350 new cancer cases diagnosed in the US in 2018, and are expected to cause the deaths of an estimated 58,100 people, that represents the 9.5% of the deaths from cancer in 2018, based on the estimated total of 609,640 cancer deaths (41). In addition, leukemia is the most common cancer in children, and its incidence has increased in the last years (55). Thus, it is of great importance to study if the exposure to pesticides is associated with the etiology of these diseases. Although several epidemiological studies analyze pesticide exposure and cancer risk (55, 56), few studies specifically investigate pyrethroid pesticides and hematological cancer risk (1, 12, 13). Given that the population potentially exposed to these agents includes children and adults, studies have been focused on one or another age group, and different results have been found. It is both important to evaluate the effects of pyrethroids in adults and in children, given that both groups are exposed globally, and in both groups a potentially increase in hematological cancer risk has been suggested.

Studies including adult populations are generally focused on occupational exposure, especially farmers (12, 56, 57). However, in children the exposure occurs generally at home (8). There is a close connection between exposure in adults and in children, because exposure of the parents has an effect on the descendants (58). In addition, pediatric leukemia likely can originate in utero

as the result of genetic damage in fetal hematopoietic stem cells, possibly induced by maternal exposure to certain compounds. This injury could cause malignant cell transformation potentially leading to the development of the disease (58). However, there are few studies that have evaluated the biological basis of the association between pyrethroid exposure and hematological cancer. Such studies could help support the epidemiological data that suggests an association between pyrethroids with leukemia/lymphoma and could contribute to elucidate the mechanisms of carcinogenicity of these compounds, specifically in cells of hematopoietic origin.

Pyrethroid exposure and hematological cancer in adults

Almost any individual can be exposed to insecticides. The adult populations that have been included in epidemiological studies are mainly exposed occupationally, for example, farmers and fumigators (12, 57, 59). However, a 2010 study on 5046 samples collected from 1999 to 2002, detected pyrethroid metabolites (3-PBA 3-phenoxi benzoic acid) in the urine of 70% of the US general population older than 6 years, which means that the majority of individuals are likely exposed. The concentrations of pyrethroid metabolites detected in this study were significantly higher in children (43). Furthermore, pyrethroid metabolites have been detected in pregnant women exposed at home (60). It is thus of great importance to evaluate the effects of these compounds in the general population besides individuals with occupational exposure.

Regarding occupational exposure, a study that included 49,093 fumigators of the prospective cohort, Agricultural Health Study (AHS) from North Carolina and Iowa, concluded that there is no association between permethrin with most of the types of cancer analyzed, after conducting a self-reported assessment of exposure (10). However, relative risks (RR) estimated for lymphohematopoietic cancers and for leukemia were elevated, but the findings were not consistent across all exposure metrics. In addition, there was a suggestion of an increased risk for multiple myeloma with increased lifetime exposure-days [RR=5.72; 95% confidence interval (CI), 2.76–11.87], and other exposure metrics. The results of this study were taken with reservations given that the number of exposed multiple myeloma cases was very small (15 cases), and a further follow-up of the results, focusing on multiple myeloma, was intended (10). An additional follow-up, focused on the development of non-Hodgkin lymphoma and its subtypes in 54,306 applicators of the

AHS, showed that the exposure to permethrin is significantly associated with multiple myeloma risk (RR=2.2 95% CI 1.4–3.5), showing an exposure-response trend (61). On the other hand, pyrethroid exposure is associated with a different type of hematological cancer in children.

Childhood pyrethroid exposure and hematological cancer

In recent decades there has been a growing public concern regarding childhood exposure to pyrethroids (42, 62). It has been demonstrated in several studies that children are exposed in different ways to these agents, and its metabolites can be detected in their urine (1, 8). A 2012 review of data from observational exposure measurement studies that examined children's exposure to pyrethroids in media including floor wipes, floor dust, food, air and/or urine collected at home in the US, showed that the majority of children (67–100%) were exposed to pyrethroids, as confirmed by the detection of urinary 3-PBA. This review found that children were likely exposed to low levels of several pyrethroids, but primarily permethrin and cypermethrin, from several sources, including diet (8).

Children are particularly vulnerable because of diverse developmental, physiological and nutritional factors (42). In 2010 a systematic review and meta-analysis that included 17 epidemiological case-control studies conducted in the USA, Canada, Mexico, Japan, France, Brazil and Germany, concluded that exposures to residential pesticides during pregnancy [odds ratio (OR)=1.54; 95% CI, 1.13–2.11] and during childhood (OR=1.38; 95% CI, 1.12–1.7), are significantly associated with leukemia risk (11). However, the type of pesticide was not always specified in the reviewed studies. The reports that have specifically included pyrethroids have suggested an association with childhood leukemia (1, 63, 64). The use of shampoos containing pyrethroids, and other insecticides to treat pediculosis, was associated with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in a French hospital-based case-control study that included 280 incident cases of childhood acute leukemia and 288 controls (OR=2.0; 95% CI, 1.1–3.4) (6).

Acute leukemias make up 31% of total pediatric cancer and are the most common type of neoplasm in children (41). In the US alone, more than 3000 new cases are diagnosed each year (51, 65). In several countries, the incidence of acute leukemia has increased in recent years (1, 66). ALL represents 80% of acute leukemias, and the most frequent subtype is B-cell ALL (65). In the majority of cases, this disease apparently has an intrauterine

origin, in which maternal exposure to certain agents could induce genetic damage in fetal hematopoietic stem cells, potentially representing the initial events in the development of leukemia (58). The risk for developing diseases, such as congenital leukemia, induced by pesticide exposure in children, extends to the prenatal stage (60).

The risk for congenital leukemia, which appears in the first year of age, has been associated with pyrethroids in various countries. A case-control study in a Brazilian population that included 252 cases of childhood acute leukemia and 423 controls, reported a significant association between in utero pesticide exposure, particularly pyrethroids (permethrin), and the risk of leukemia [(ALL) OR=2.47; 95% CI 1.17–5.25 and acute myeloid leukemia (AML) OR=7.28; 95% CI 2.60–20.38] in children under 2 years of age (64). Because these studies are based only on questionnaires to estimate exposure, levels of exposure could be incorrectly estimated. In 2012 in Shanghai, another hospital-based case-control study that included 176 children with ALL and 180 controls, reported that levels of pyrethroid metabolites in urine correlated with an increased risk of developing ALL (OR=2.75; 95% CI 1.43–5.29 for three metabolites combined) (1). This study has special relevance because, in contrast to other epidemiological studies that are based only in questionnaire data, the levels of urine metabolites were measured, so the exposure to pyrethroids could be precisely determined. Although different epidemiological studies have evaluated the association of pyrethroid exposure with childhood leukemia, there are limited molecular and biological studies showing the biological plausibility of this association.

Very few references offer biological and molecular evidence supporting the association of pyrethroids exposure with childhood leukemia, and more research is needed in this area (26, 55, 67, 68). A single case report of a newborn diagnosed with leukemia positive for rearrangement in the *MLL* gene, suggested a causal relationship between in utero exposure to permethrin and the development of congenital AML in the proband. An additional in vitro experiment was included in this case report. A Southern blot showed that exposure to permethrin induces breaks in the *MLL* gene in the BV173 cell line. *MLL* breaks are frequent events seen in children less than 1 year old who are diagnosed with leukemia (67). However, this study is based on a single case report.

Another study that highlighted the association between pyrethroids with childhood leukemia at a molecular level was reported in 2007. The incidence of the oncogenic fusion *RUNX1-RUNX1T1* was assessed in umbilical cord blood of newborns in a population from

the Philippines exposed to propoxur and cypermethrin. They found that the oncogenic fusion was associated with higher levels of pesticides in the meconium of infants prenatally exposed. These results showed that the prenatal exposure to pesticides might be a causal factor for the generation of genetic rearrangements associated with leukemia (68).

In addition, studies suggest that pyrethroids exert several biological effects (14, 17, 19, 21–23, 27, 29), which could contribute in different ways and in distinct moments to the carcinogenic process. Currently, the biological plausibility of the association of pyrethroids with hematological cancer in children and adults is not precisely known. To help guide the study of the current knowledge regarding pyrethroids and hematopoietic cancer, we compile several studies that report the molecular and cellular effects of pyrethroids, together with an explanation of the possible relationship of these biological effects to carcinogenesis.

Potential carcinogenic mechanisms of pyrethroids

In vitro and in vivo studies have suggested that pyrethroids have diverse genotoxic effects to different extents. However, the number of these studies is limited and not completely concordant. Through genotoxicity assays such as micronucleus, comet assay, sister chromatid exchange and chromosomal aberrations, it has been suggested that these agents induce DNA damage, chromosomal aberrations as well as aneuploidy in peripheral blood lymphocytes and in other systems (Table 2) (14–16, 18, 19, 69–85).

It was reported that the in vitro exposure to 200 μM of permethrin for 24 h induces breaks and rearrangements in genes associated with childhood and adult leukemia and lymphoma, such as the *MLL* and *IGH* genes, in mononuclear cells from healthy donors, as detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) (74). In addition, an assay using centromeric FISH probes, showed that permethrin has the potential to induce aneuploidy when chromosomes 12, 18 and 14/22 were analyzed (74). Breaks in these genes, particularly *IGH*, were also found when the mononuclear cells were exposed continuously to very low concentrations of permethrin (0.1 μM , 72 h) (78). The rearrangements induced by permethrin were also detected in metaphases, which means that the cells could divide in spite of the damage and could potentially transmit the damage to daughter cells (78). This is indicative of specific mechanisms by which pyrethroids can

Table 2: In vitro studies assessing the genotoxicity of pyrethroids.

Pyrethroid	Assay	Cellular model	Exposure time	Result (effective concentration)	Reference
Allethrin	Chromosomal aberrations	Chinese hamster cells	24 h	Strongly positive only with S9 mix	Matsuoka et al., 1979 (80)
	Sister chromatid exchange	PBMCs	48 h	Induces sister chromatid exchanges (28 μM , 256 μM)	Herrera et al., 1992 (14)
Fenvalerate	Micronucleus	Chinese hamster ovary cells	48 h	Induces micronuclei (26 μM , 64 μM , 128 μM)	Caballo et al., 1992 (70)
	Chromosome aberrations			Induces chromosome aberrations in the presence of S9 mix (238.1 μM –357.2 μM)	
	Sister chromatid exchanges			Induces sister chromatid exchanges with and without S9 mix (23.8 μM –357.2 μM)	
Permethrin	Chromosomal aberrations	PBMCs	21 h	Induces aberrations (192 μM –383 μM)	Barrueco et al., 1994 (15)
	Chromosomal aberrations		2 h	Induces aberrations: (383 μM –511 μM)	
Permethrin	Micronucleus	PBMCs and whole blood (WB)	48 h	Permethrin: Mostly negative results. Positive in one volunteer, WB (256 μM) ^b	Surrallés et al., 1995 (71)
Cypermethrin				Cypermethrin: Slightly positive. Two volunteers, WB (480.4 μM)	
Deltamethrin				Deltamethrin: Slightly positive. One volunteer, WB (197.9 μM , 395.8 μM). One volunteer, PBMCs (197.9 μM)	
Fenpropathrin				Fenpropathrin: Slightly positive. Two volunteers, WB (28.6 μM , 143.1 μM)	
Fenvalerate				Fenvalerate: Mostly negative results	
Deltamethrin	Comet assay	Human leukocytes	1 h	Comet assay: Positive with S9 mix (198 μM –792 μM)	Villarini et al., 1998 (79)
	Sister chromatid exchanges		2 h	Sister chromatid exchanges: Negative (19.8 μM –148.5 μM)	
Permethrin	Micronucleus	Primary nasal mucosal cells	2 h	Micronucleus: Negative (19.8 μM –148.5 μM)	Tisch et al., 2002 (72)
	Comet assay		1 h	Induces DNA damage (500–1000 μM)	
Permethrin	Comet assay	PBMCs	0.5 h	Permethrin: Induces DNA damage (511 μM)	Undeğer and Başaran, 2005 (16)
Cypermethrin				Cypermethrin: Induces DNA damage (480.4 μM)	
Cypermethrin	Comet assay	Chinese hamster ovary cells	3 h	Induces DNA damage (1000–5000 μM)	Patel et al., 2007 (76)
Deltamethrin	DNA damage-induced gene expression	HepG2	24 h	Induce luciferase activity (DNA damage response 1 μM , 10 μM)	Zhang et al., 2009 (82)
α -Cypermethrin	Gadd153-Luc test system				
	Sister chromatid exchange	PBMCs	24 and 48 h	Induces sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations (12, 24, 36, 48 μM)	Kocaman and Topaktaş, 2009 (83)
Cypermethrin	Chromosomal aberrations			Induces micronuclei (12 and 24 μM)	Sandal and Yilmaz, 2011 (84)
	Comet assay	Lymphocytes from healthy smokers and nonsmoker donors	1 h	Induces significant DNA damage in cells from smokers and nonsmokers donors (10 μM)	
Permethrin	Chromosomal aberrations	PBMCs	72 h	Induces aberrations (511 μM)	Turkez and Aydin, 2012 (18)
	Micronucleus			Induces micronuclei (511 μM)	

Table 2 (continued)

Pyrethroid	Assay	Cellular model	Exposure time	Result (effective concentration)	Reference
Permethrin/ allethrin	Micronucleus	PBMCs	24 and 36 h	Induce micronuclei 25 μM /0.46 μM	Ramos-Chavez et al., 2015 (19)
Permethrin Nanopermethrin	Apoptosis MTT	Erythrocytes and lymphocytes	24, 48, 72 h	Permethrin/allethrin Cytotoxic	Sundaramoorthy et al., 2016 (73)
α -Cypermethrin	Morphology Micronucleus Viability Comet assay	Human lymphocytes HepG2 cell line	4 and 24 h	Induces morphological changes Induce micronucleus (30, 65, 130, 260 μM) Reduces significantly cell viability in both lymphocytes and HepG2 cells (0.262 μM , 24 h) Increases DNA damage in lymphocytes and HepG2 cells (4 h, 0.262 μM) Induces micronuclei in both cell types (0.06–0.628 μM , 24 h)	Želježić et al., 2016 (85)
Permethrin	Cytokinesis-block micronucleus cytome Oxidative stress biomarkers Aneuploidy and breaks on <i>MLL</i> and <i>IGH</i> genes by FISH	PBMCs	24 h	Do not affect oxidative stress biomarkers Induces <i>MLL</i> and <i>IGH</i> breaks 200 μM	Navarrete-Meneses et al., 2017 (74)
α -Cypermethrin	Oncogenic fusions nested RT-PCR Comet FISH <i>TP53</i> and <i>cMyc</i> genes	Lymphocytes	72 h	Induces <i>ETV6-RUNX1</i> fusion (0.1 μM)	Zeljezic et al., 2017 (81)
Permethrin	Immunofluorescence for detecting phosphorylated histone H2AX foci Detection of proteins participating in DNA recombination by Western blot Cytotoxicity <i>MLL</i> and <i>IGH</i> aberrations by FISH	Whole blood PBMCs	14 days 1.5 h 72 h	Does not induce significant DNA damage (0.0087 μM –7.2 μM No significant effect was detected on <i>TP53</i> and <i>c-Myc</i> genes (0.0087 μM –7.2 μM) Induces DNA DSB (8, 200 μM) No cytotoxic Increase in the amount of proteins participating in DNA recombination was not detected Induces damage on <i>MLL</i> and <i>IGH</i> (0.1 μM)	Suárez-Larios et al., 2017 (75) Navarrete-Meneses et al., 2018 (78)

^aPBMCs, Peripheral blood mononuclear cells. RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

induce oncogenic damage or a particular susceptibility of the genes assessed. These findings are in accordance with an independent study on mononuclear cells from healthy donors, that showed the potential of permethrin to induce DNA double strand breaks (DSB), detected by immunofluorescence through the phosphorylation of the H2AX protein (75). However, in the same study, no increase in p-Ku80 or Rad51 proteins was detected. Therefore, there was no evidence of activation of the DNA repair system, that could give rise to chromosome rearrangements after permethrin exposure (75). An additional study on mononuclear cells from a healthy donor found no association between α -cypermethrin exposure with damage in the *TP53* and *c-Myc* genes, which are also closely related to carcinogenesis (81). Opposing results are often seen among studies assessing genotoxicity of pyrethroids in vitro (Table 2). These rather controversial findings could be attributed to several reasons, such as the type of

pyrethroid evaluated and its purity, the source of the cells that are studied (frequently from different healthy donors), the time of exposure, the concentrations included and the diverse endpoints, which may show different sensibility. All of these differences could impact the results obtained, which have been positive in some studies and negative in others, making it difficult to build conclusions (Table 2) (14–16, 18, 19, 70–74, 76, 79–85).

In addition, murine models have also suggested that pyrethroids generate numerical (aneuploidy) and structural chromosomal aberrations in vivo (17, 86, 87). These genetic abnormalities could lead to leukemic transformation and clonal expansion, depending on the affected cell and the specific moment when the genetic lesion occurs (58, 88). Although the potential of pyrethroids to damage DNA was reported several years ago, until recently, their capacity to interact directly with DNA was demonstrated (Figure 1) (27, 28). Permethrin interacts through partial

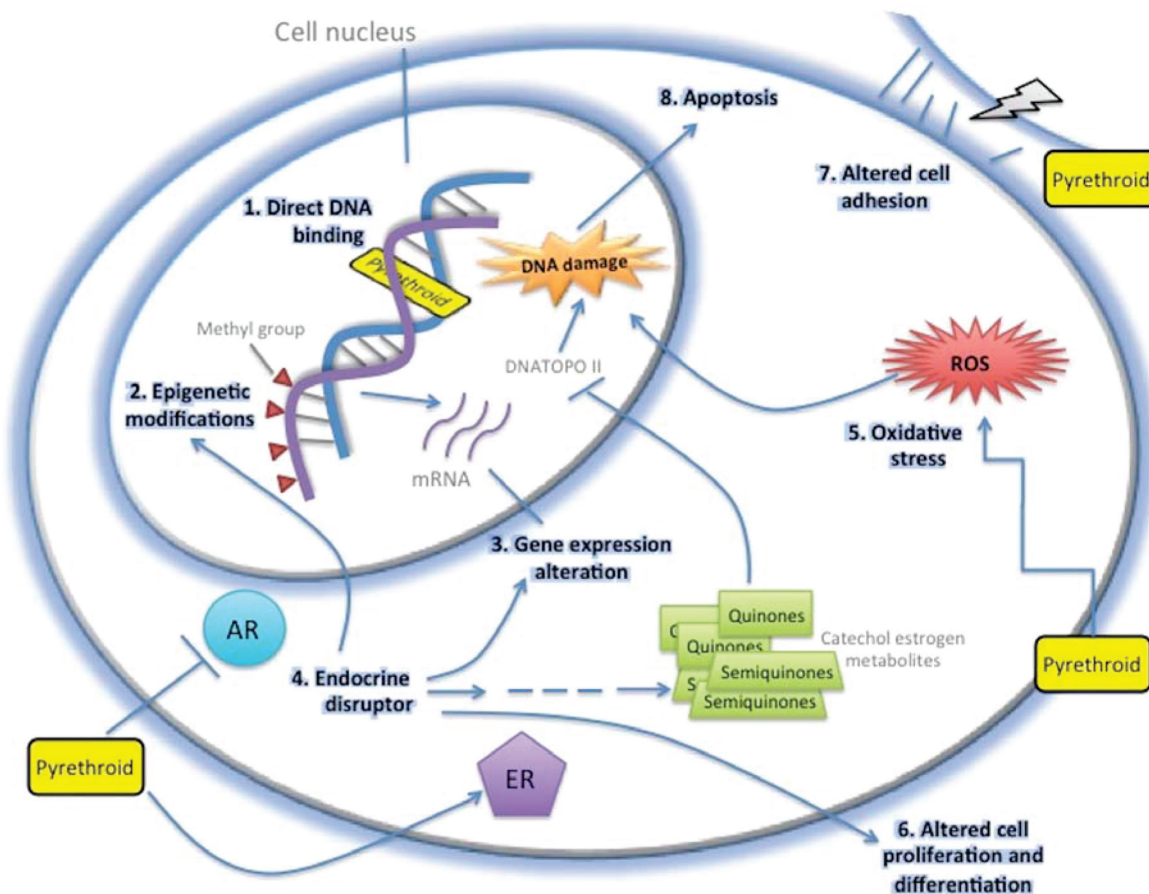


Figure 1: Molecular effects exerted by pyrethroids.

1. Bind directly to DNA. 2. Cause DNA methylation and other epigenetic modifications. 3. Alter gene expression. 4. Disrupt estrogen (ER) and androgen (AR) receptors, potentially leading to the production of quinones and semiquinones that could affect DNA topoisomerase II, causing DNA damage. 5. Produce ROS. 6. Alter proliferation and differentiation, possibly by the disrupting AR and ER. 7. Alter cell adhesion. 8. Induce apoptosis through the increase in DNA damage.

intercalation and by direct binding to minor and major DNA grooves. Moreover, permethrin has higher affinity in regions rich in GC base pairs (27), which are characterized as having high gene density. In addition to their genotoxic effect, the potential epigenetic effects of pesticides have recently become a concern.

Recent data suggest that pyrethroids can modify gene expression as well as DNA methylation. It was found that pyrethroids modify gene methylation affecting reproductive functions (20, 21). However, the DNA methylation produced by pyrethroids needs to be investigated focusing on other cancers such as hematological neoplasms. Modifications in epigenetic patterns are of great importance, given that they could lead to overexpression of oncogenes as well as the down regulation of tumor suppressors (Figure 1). Moreover, an *in vitro* study revealed that exposure to pyrethroids can modify the expression of the *WNT10B* gene, which is also strongly implicated in leukemia (24).

In addition to modifying gene expression and methylation, pyrethroids can also act at the cellular functional level, affecting hematopoiesis. *In vivo* and *in vitro* studies suggest that pyrethroids, such as cypermethrin, can inhibit the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor and stem cells (22, 23). This inhibition is of great importance because progenitor and stem cells produce all blood cells. Moreover, an arrest in the differentiation of progenitor and stem cells is characteristic of diseases such as leukemia (65). These findings provide evidence that pyrethroids can affect cells of the hematopoietic system (22, 23); in addition, pyrethroids can affect the immune system at the cellular level, as these insecticides inhibit the production of cytokines and antibodies and also alter the macrophage function (26, 35, 89, 90). The disruption of the immune system could further contribute to the development of cancer and is a hallmark of this disease (37).

Pyrethroids can also act as endocrine disruptors, as agonists or antagonists of the estrogen receptors, androgen receptors or thyroid hormones (29, 30). This is important because endocrine disruptors can influence the regulation of the cell cycle (31). Pyrethroids increase the proliferation of the breast carcinoma cell line MCF-7 through the activation of the estrogen receptor (29). These compounds could affect chromatin remodeling and other epigenetic modifications through the activation of estrogen receptors, which are expressed in several cells, including the hematopoietic system. Moreover, pyrethroids could alter the metabolism of catechol estrogens by peroxidases, leading to the production of semiquinones and quinones, which are capable of forming DNA adducts as well as generating

reactive oxygen species (ROS) (91). In addition, quinones potentially affect DNA topoisomerase II, which could lead to breaks in certain susceptible sites of the genome (breakpoint cluster regions of certain genes), given that this enzyme participates in DNA repair and recombination, modifying DNA topology through the induction of DSB that need to be rejoined (91). Furthermore, there are genes, such as *MLL*, with particular susceptibility to the breakage by DNA topoisomerase II; the inhibition of this enzyme produces ruptures in this gene which participates in diverse oncogenic fusions driving the leukemogenic process (Figure 1) (77, 92).

Additional evidence showing that the disruption of the endocrine function can damage DNA was described in a large cohort study known as the “NewGeneris Project” (Newborns and Genotoxic exposure risks) that showed that *in utero* exposure to chemicals with hormonal activity, estrogenic or androgenic, is associated with the presence of micronuclei in the umbilical cord blood mononuclear lymphocytes of newborns. The detection of micronuclei in these cells gives an estimate of the genome damage accumulated in stem cells as well as in circulating lymphocytes (93). This finding is of importance given that it reflects the effect of maternal exposure on the developing fetus.

Another biological effect exerted by pyrethroids that could lead to genomic damage is the induction of ROS, which is closely associated with cancer. Oxidative stress can induce cell damage or apoptosis affecting lipids in the cell membrane, modifying the structure of proteins, and directly damaging DNA (94). Oxygen species are involved in mutagenesis and genomic instability, contribute epigenetically to cancer development and progression, and are inducers of genetic programs that lead to cell invasion and malignancy (95). It has been shown in *in vivo* and *in vitro* studies that pyrethroids induce ROS (Figure 1) (18, 34, 96–98).

In sum, the diverse cellular and molecular effects that pyrethroids exert may be potentially associated with carcinogenesis. Effects such as high proliferation, chromosome instability, epigenetic modifications, among others, are hallmarks of cancer (37). It remains to be elucidated whether certain cells, such as the hematopoietic stem and progenitor cells, are more affected by pyrethroids compared to other cell types, or if there are certain sites of the genome with increased susceptibility to these chemicals. Efforts in the discovery of the mechanism of the potential carcinogenesis exerted by pyrethroids are very important, to elucidate the biological plausibility linking pyrethroid exposure and lymphohematopoietic cancer. At this time, the available evidence is still considered controversial

and insufficient to accurately recognize pyrethroids as promoters of hematological cancer. More investigations at the epidemiological and biological levels are needed, to completely rule out their possible carcinogenic potential or to consider them as carcinogens.

Conclusion

Insecticides are undoubtedly indispensable for multiple human activities in public health and agricultural production, and therefore are extensively used worldwide. The use of organochlorine and organophosphate agents has decreased or even disappeared with the growing evidence showing their harmful effects, leading to a significant increase in the use of pyrethroids, because they are regarded as being less toxic. At the epidemiological level, evidence suggests that pyrethroid exposure may be associated with hematopoietic cancer, particularly in children. Reviews on the epidemiological data concerning pyrethroids and cancer have been presented; however, a compilation of this information together with the evidence resulting from *in vitro* and *in vivo* investigations regarding pyrethroid effects was missing. To guide the study of the current knowledge about pyrethroids and hematopoietic cancer, which is still a very controversial topic, we offer a compilation of several studies showing that these compounds are likely genotoxic, cytotoxic, potentially disturb gene methylation and expression, induce oxidative stress, and are also capable of affecting the function of hematopoietic and immune cells, in addition to their function as endocrine disruptors. The diverse cellular and molecular effects that pyrethroids exert may be potentially associated with carcinogenesis. Additional research on the potential carcinogenic mechanisms of these chemicals is of great importance to establish the biological plausibility of the association of pyrethroids with hematopoietic cancer.

Acknowledgments: Financial support was provided by CONACyT CB-2012-01-183467 (P.P.-V.) and by National Pediatrics Institute. This article constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). María del Pilar Navarrete-Meneses acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) CVU 385279, and UNAM.

Declaration of Interests: The authors report no declarations of interest.

References

- Ding G, Shi R, Gao Y, Zhang Y, Kamijima M, Sakai K, et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environ Sci Technol* 2012;46(24):13480–7.
- Matthews G. *Pesticides: health, safety and the environment*. UK: John Wiley & Sons; 2008:249.
- Rosbach B, Appel KE, Mross KG, Letzel S. Uptake of permethrin from impregnated clothing. *Toxicol Lett* 2010;192(1):50–5.
- US EPA O of PP. About Pesticides | Pesticides | US EPA [Internet]. Available from: <http://www.epa.gov/pesticides/about/>.
- Pages from vector059to118-2.pdf – vector088to118.pdf [Internet]. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vector088to118.pdf.
- Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, et al. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup Environ Med* 2006;63(2):131–4.
- Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology. In: Perveen F, editor. *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management* [Internet]. InTech; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-advances-in-integrated-pest-management/pyrethroid-insecticides-use-environmental-fate-and-ecotoxicology>.
- Morgan MK. Children’s exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9(8):2964–85.
- IARC Monographs Volume 53. IARC monograph [Internet]. 1990. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-13.pdf>.
- Rusiecki JA, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):581–6.
- Turner MC, Wigle DT, Krewski D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ciênc Saúde Coletiva* 2011;16(3):1915–31.
- Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastra L. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 2008;18(10):1209–26.
- Boffetta P, Desai V. Exposure to permethrin and cancer risk: a systematic review. *Crit Rev Toxicol* 2018;48(6):433–42.
- Herrera A, Barrueco C, Caballo C, de la Peña E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1992;20(3):218–22.
- Barrueco C, Herrera A, Caballo C, de la Peña E. Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog Carcinog Mutagen* 1994;14(1):31–8.
- Undeğer U, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Arch Toxicol* 2005;79(3):169–76.
- Institóris L, Undeğer U, Siroki O, Nehéz M, Dési I. Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology* 1999;137(1):47–55.

18. Turkez H, Aydin E. The effects of taurine on permethrin-induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63(1):27–34.
19. Ramos-Chavez LA, Sordo M, Calderon-Aranda E, Castañeda-Saucedo E, Ostrosky-Wegman P, Moreno-Godinez ME. A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A* 2015;78(1):7–14.
20. Xia D, Parvizi N, Zhou Y, Xu K, Jiang H, Li R, et al. Paternal fenvalerate exposure influences reproductive functions in the offspring. *Reprod Sci* 2013;20(11):1308–15.
21. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol* 2012;34(4):708–19.
22. Mandarapu R, Prakhya BM. In vitro myelotoxic effects of cypermethrin and mancozeb on human hematopoietic progenitor cells. *J Immunotoxicol* 2015;12(1):48–55.
23. Chatterjee S, Basak P, Chaklader M, Das P, Pereira JA, Chaudhuri S, et al. Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: an experimental model to study the toxic effects of pesticide. *Environ Toxicol* 2014;29(1):84–97.
24. Kasat K, Go V, Pogo BGT. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression. *Environ Int* 2002;28(5):429–32.
25. Zhou J-L, Ding Z, Ge X, Shi Q-M, Wang H-X, Chen G, et al. Cypermethrin inhibits interleukin-6-induced androgen receptor transactivation through signal transducer and activator of transcription 3. *Toxicol Mech Methods* 2017;27(9):717–22.
26. El Okda E-S, Abdel-Hamid MA-A, Hamdy AM. Immunological and genotoxic effects of occupational exposure to α -cypermethrin pesticide. *Int J Occup Med Environ Health* 2017;30(4):603–15.
27. Ahmadi F, Ghanbari K. Proposed model for binding of permethrin and deltamethrin insecticides with ct-DNA, a structural comparative study. *Ecotoxicol Environ Saf* 2014;106:136–45.
28. Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology* 2005;216(2–3):244–52.
29. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H, Wang X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65(19):1419–35.
30. Du G, Shen O, Sun H, Fei J, Lu C, Song L, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2010;116(1):58–66.
31. Yang O, Kim HL, Weon J-I, Seo YR. Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis. *J Cancer Prev* 2015;20(1):12–24.
32. Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 1999;105(3):197–205.
33. Mignini F, Nasuti C, Fedeli D, Mattioli L, Cosenza M, Artico M, et al. Protective effect of alpha-lipoic acid on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26(4):871–81.
34. Gabbianelli R, Falcioni G, Nasuti C, Cantalamessa F. Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology* 2002;175(1–3):91–101.
35. Punareewattana K, Smith BJ, Blaylock BL, Longstreth J, Snodgrass HL, Gogal RM, et al. Topical permethrin exposure inhibits antibody production and macrophage function in C57BL/6N mice. *Food Chem Toxicol* 2001;39(2):133–9.
36. Wang X, Gao X, He B, Zhu J, Lou H, Hu Q, et al. Cis-bifenthrin induces immunotoxicity in adolescent male C57BL/6 mice. *Environ Toxicol* 2017;32(7):1849–56.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
38. Krieger RI. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Elsevier, 2010. 1238 p.
39. Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G, Gabbianelli R. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology* 2003;191(2):233–44.
40. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 2007;59(3):151–62.
41. Facts and Statistics | Leukemia and Lymphoma Society [Internet]. Available from: <http://www.lls.org/http%3A//lls.org.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics>.
42. Roberts JR, Karr CJ, Paulson JA, Brock-Utne AC, Brumberg HL, Campbell CC, et al. Pesticide exposure in children. *Pediatrics* 2012;130(6):e1757–63.
43. Barr DB, Olsson AO, Wong L-Y, Udunka S, Baker SE, Whitehead RD, et al. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ Health Perspect* 2010;118(6):742–8.
44. Leng G, Gries W, Selim S. Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicol Lett* 2006;162(2–3):195–201.
45. ATSDR – Toxicological Profile: Pyrethrins and Pyrethroids [Internet]. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=787&tid=153>.
46. Lu C, Barr DB, Pearson MA, Walker LA, Bravo R. The attribution of urban and suburban children's exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a longitudinal assessment. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009;19(1):69–78.
47. Glorennec P, Serrano T, Fravallo M, Warembourg C, Monfort C, Cordier S, et al. Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in western France. *Environ Int* 2017;104:76–82.
48. Neta G, Goldman LR, Barr D, Apelberg BJ, Witter FR, Halden RU. Fetal exposure to chlordane and permethrin mixtures in relation to inflammatory cytokines and birth outcomes. *Environ Sci Technol* 2011;45(4):1680–7.
49. Limon-Miro AT, Aldana-Madrid ML, Alvarez-Hernandez G, Antunez-Roman LE, Rodriguez-Olibarria G, Valencia Juillerat ME. Breast milk intake and mother to infant pesticide transfer measured by deuterium oxide dilution in agricultural and urban areas of Mexico. *Chemosphere* 2017;181:682–9.
50. Mylène Ratelle JC. Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicol Lett* 2014;232(2):369–75.
51. Cancer Facts and Statistics 2015 | Research | American Cancer Society [Internet]. [cited 2015 Apr 21]. Available from: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>.

52. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001;411(6835):390–5.
53. Sankpal UT, Pius H, Khan M, Shukoor MI, Maliakal P, Lee CM, et al. Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumour Biol* 2012;33(5):1265–74.
54. Saillenfait A-M, Ndiaye D, Sabaté J-P. Pyrethroids: exposure and health effects – an update. *Int J Hyg Environ Health* 2015;218(3):281–92.
55. Hernández AF, Menéndez P. Linking pesticide exposure with pediatric leukemia: potential underlying mechanisms. *Int J Mol Sci* 2016;17(4):461.
56. Alavanja MCR, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2012;15(4):238–63.
57. Roulland S, Lebaillly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 2004;64(6):2264–9.
58. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3(9):639–49.
59. Weichenthal S, Moase C, Chan P. A Review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort. *Environ Health Perspect* 2010;118(8):1117–25.
60. Berkowitz GS, Obel J, Deych E, Lapinski R, Godbold J, Liu Z, et al. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ Health Perspect* 2003;111(1):79–84.
61. Alavanja MCR, Hofmann JN, Lynch CF, Hines CJ, Barry KH, Barker J, et al. Non-hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. *PLoS One* 2014;9(10):e109332.
62. Garry VF. Pesticides and children. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198(2):152–63.
63. Malagoli C, Costanzini S, Heck JE, Malavolti M, De Girolamo G, Oleari P, et al. Passive exposure to agricultural pesticides and risk of childhood leukemia in an Italian community. *Int J Hyg Environ Health* 2016;219(8):742–8.
64. Ferreira JD, Couto AC, Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. In utero pesticide exposure and leukemia in Brazilian children < 2 years of age. *Environ Health Perspect* 2013;121(2):269–75.
65. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354(2):166–78.
66. Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, Sánchez-Zubieta F, Cárdenas-Cardós R, Escamilla-Asian G, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer* 2013;132(7):1646–50.
67. Borkhardt A, Wilda M, Fuchs U, Gortner L, Reiss I. Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88(5):F436–7.
68. Lafuira KM, Bielawski DM, Posecion NC, Ostrea EM, Matherly LH, Taub JW, et al. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr Blood Cancer* 2007;49(5):624–8.
69. Gabbianelli R, Nasuti C, Falcioni G, Cantalamessa F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology* 2004;203(1–3):17–26.
70. Caballo C, Herrera A, Barrueco C, Santa-María A, Sanz F, de la Peña E. Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratog Carcinog Mutagen* 1992;12:243–9.
71. Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1995;341(3):169–84.
72. Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259(3):150–3.
73. Sundaramoorthy R, Velusamy Y, Balaji APB, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chem Biol Interact* 2016;257:119–24.
74. Navarrete-Meneses MP, Salas-Labadía C, Sanabrais-Jiménez M, Santana-Hernández J, Serrano-Cuevas A, Juárez-Velázquez R, et al. Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations in vitro. *Toxicol In Vitro* 2017;44:17–26.
75. Suárez-Larios K, Salazar-Martínez A-M, Montero-Montoya R. Screening of pesticides with the potential of inducing DSB and successive recombinational repair. *J Toxicol* 2017;2017:9.
76. Patel S, Bajpayee M, Pandey AK, Parmar D, Dhawan A. In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol In Vitro* 2007;21(8):1409–18.
77. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013;27(11):2165–76.
78. Navarrete-Meneses MP, Pedraza-Meléndez AI, Salas-Labadía C, Moreno-Lorenzana D, Pérez-Vera P. Low concentrations of permethrin and malathion induce numerical and structural abnormalities in KMT2A and IGH genes in vitro. *J Appl Toxicol* 2018;38:1262–70.
79. Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, et al. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* 1998;130(2–3):129–39.
80. Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat Res* 1979;66(3):277–90.
81. Zeljezic D, Vinkovic B, Kasuba V, Kopjar N, Milic M, Mladinic M. The effect of insecticides chlorpyrifos, α -cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere* 2017;182:332–8.
82. Zhang R, Niu Y, Du H, Cao X, Shi D, Hao Q, et al. A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. *Toxicol In Vitro* 2009;23(1):158–65.
83. Kocaman AY, Topaktaş M. The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of alpha-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2009;50(1):27–36.
84. Sandal S, Yilmaz B. Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environ Toxicol* 2011;26(5):433–42.
85. Želježić D, Mladinić M, Žunec S, Lucić Vrdoljak A, Kašuba V, Tariba B, et al. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers

- of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food Chem Toxicol* 2016;96:90–106.
86. Turkez H, Togar B, Polat E. Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats. *Cytotechnology* 2012;64(4):459–64.
87. Roma GC, de Oliveira PR, Araujo AM, Bechara GH, Mathias MIC. Genotoxic and mutagenic effects of permethrin in mice: micronuclei analysis in peripheral blood erythrocytes. *Microsc Res Tech* 2012;75(12):1732–6.
88. Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;(39):87–90.
89. Diel F, Horr B, Borck H, Savtchenko H, Mitsche T, Diel E. Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes in vitro. *Toxicol Lett* 1999;107(1–3):65–74.
90. Aouey B, Derbali M, Chtourou Y, Bouchar M, Khabir A, Fetoui H. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24(6):5841–56.
91. Schnyder S, Du NT, Le HB, Singh S, Loredó GA, Vaughan AT. Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. *Leuk Res* 2009;33(10):1400–4.
92. Le H, Singh S, Shih S-J, Du N, Schnyder S, Loredó GA, et al. Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48(9):806–15.
93. Merlo DF, Agramunt S, Anna L, Besselink H, Botsivali M, Brady NJ, et al. Micronuclei in cord blood lymphocytes and associations with biomarkers of exposure to carcinogens and hormonally active factors, gene polymorphisms, and gene expression: The NewGeneris cohort. *Environ Health Perspect* 2014;122(2):193–200.
94. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48(6):749–62.
95. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol* [Internet] 2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361160/>.
96. Wang X, Martínez M-A, Dai M, Chen D, Ares I, Romero A, et al. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ Res* 2016;149:86–104.
97. Li H-Y, Zhong Y-F, Shi N. [Effect of deltamethrin on production of reactive oxygen species in PC12 cells]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis* 2008;26(11):654–8.
98. Maurya SK, Mishra J, Tripathi VK, Sharma R, Siddiqui MH. Cypermethrin induces astrocyte damage: role of aberrant Ca(2+), ROS, JNK, P38, matrix metalloproteinase 2 and migration related reelin protein. *Pestic Biochem Physiol* 2014;111:51–9.