

Principales herramientas epigenéticas para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas

Main epigenetic tools for the diagnosis and monitoring of hematological malignancies

Juliana P. Sánchez-Álvarez MSc¹, Paola A. Acevedo-Toro MSc²

Resumen: el análisis exhaustivo de los patrones de metilación del ADN es una parte fundamental para entender las bases moleculares del desarrollo y progresión de las neoplasias hematológicas, debido a que la hipermetilación en regiones promotoras afecta directamente vías carcinogénicas y conduce a la inactivación de genes involucrados en procesos celulares fundamentales como el ciclo celular y la apoptosis. En esta revisión de literatura se presenta una descripción de las técnicas más utilizadas para el estudio de la metilación: la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación (MSP), el análisis combinado restricción bisulfito (COBRA), la secuenciación dependiente de bisulfito (BSP), la pirosecuenciación con bisulfito y las técnicas basadas en micromatrices; describiendo su principio, aplicación en la investigación de las neoplasias hematológicas y algunas de sus fortalezas y debilidades.

Palabras clave: metilación de ADN, neoplasias hematológicas, reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación del ADN, análisis por micromatrices.

Abstract: the comprehensive analysis of DNA methylation patterns is important to understanding the molecular basis of development and progression of hematological malignancies. The hypermethylation in promoter regions directly affects carcinogenic pathways and leads to the inactivation of genes involved in fundamental cellular processes such as cell cycle and apoptosis. In this review are presented the most widely used techniques to DNA methylation analysis: methylation specific polymerase chain reaction (MSP), combined bisulfite restriction analysis (COBRA), bisulfite-sequencing polymerase chain reaction (BSP), bisulfite pyrosequencing and microarrays; describing its principles, usefulness in the hematological malignancies study, and some of its strengths and weaknesses.

¹Microbióloga y Bioanalista. Estudiante de maestría en Microbiología y Bioanálisis, énfasis Hematología. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

²Microbióloga y Bioanalista. MSc en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente Escuela de Microbiología, Grupo de Investigación Hematopatología Molecular (HEMO). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correspondencia: Calle 67 Número 53-108, Bloque 5, oficina 435. Correo electrónico: micropao@gmail.com

Conflicto de intereses: las autoras declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2015; 21: 43-62

Módulo 4 (Hematología), número 12. Editora Médica Colombiana S.A. 2015[®]

Recibido el 27 de enero de 2015; aceptado el 05 de febrero de 2015

Key words: DNA methylation, hematologic neoplasms, polymerase chain reaction, DNA sequencing, microarray analysis.

Sánchez-Álvarez JP, Acevedo-Toro PA. Principales herramientas epigenéticas para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 43-62.

La epigenética se puede definir como el estudio de los cambios heredables en la expresión génica causados por mecanismos distintos a modificaciones en la secuencia del ADN [1]. Estos mecanismos desempeñan un papel clave en los procesos fisiológicos de los mamíferos, ya que determinan la especificidad en el crecimiento y la diferenciación de cada célula en el organismo, por tanto, un perfil de expresión génica anormal modifica la identidad celular, causando cambios en el fenotipo y aumento de la susceptibilidad a ciertas enfermedades. Los eventos epigenéticos están involucrados en múltiples procesos como el envejecimiento y en la patogénesis de múltiples enfermedades como las autoinmunes y los cánceres hematológicos, en las cuales ha sido ampliamente estudiado y ha ayudado a justificar el aumento de su prevalencia [2].

La metilación del ADN es quizá el mecanismo epigenético más comúnmente descrito en las neoplasias hematológicas [3]. Este proceso se produce por la transferencia de grupos metilo al carbono 5 (C5) de las citosinas que están presentes en el dinucleótido citosina-fosfato-guanina (CpG) a partir de la S-adenosil metionina (SAM), un donante de metilos. Esta reacción es catalizada por enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) [4]. La hipermetilación ocurre en las islas CpG normalmente no metiladas, las cuales se encuentran localizadas en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores, lo que produce la inactivación o silenciamiento de estos genes [5]. Por tal razón, los cambios en los patrones de metilación del ADN en diversos genes se han relacionado con la progresión de los cánceres hematológicos [6-9].

Las alteraciones epigenéticas representan una característica importante en el desarrollo del cáncer, incluso de las neoplasias hematológicas, cuyas características clínicas muestran una alta variabilidad interindividual y comprenden los cánceres que se originan a partir de órganos hematopoyéticos primarios (médula ósea y sangre), como los mielomas y las leucemias, y los procedentes de órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos), como los linfomas [10].

Para definir mejor el impacto de las alteraciones causadas por la metilación del ADN sobre la patogénesis de las neoplasias hematológicas es necesario establecer detalladamente los perfiles de metilación de cada una de ellas. De esta manera, se obtendrá una mejor comprensión del proceso de transformación y, posiblemente, de las implicaciones en el cuidado del paciente en las áreas de diagnóstico, pronóstico e intervenciones terapéuticas [11]. Por lo tanto, cada vez es más necesario el diseño de nuevos métodos para la determinación de la metilación aberrante de los genes que brinden una imagen más completa de las vías celulares implicadas en cada tipo de neoplasia hematológica [12].

En este artículo se revisarán las técnicas para el análisis de los patrones de metilación del ADN más utilizadas en el estudio de las neoplasias hematológicas, exponiendo su principio, aplicación en la investigación de las neoplasias hematológicas y algunas de sus fortalezas y debilidades.

Métodos de detección de la metilación del ADN

Inicialmente, el estudio de los patrones de metilación de secuencias individuales y específicas del ADN se fundamentaba casi exclusivamente en la digestión con endonucleasas sensibles e insensibles a la metilación [13]. El ADN digerido con una enzima de restricción sensible a la metilación es cortado en o cerca del sitio de reconocimiento de la enzima en la secuencia de interés que no se encuentra metilada, pero no en aquellas que sí están metiladas. Posteriormente, el estado de metilación es determinado por el procedimiento de transferencia de Southern usando una sonda específica [14] o mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*) (véase figura 1) [15]. Entre las principales ventajas de esta técnica se encuentra que no requiere modificaciones de la secuencia del ADN, lo que lo hace un método relativamente simple y que previene el daño en el material genético; sin embargo, presenta ciertos inconvenientes como un análisis limitado, debido a la disponibilidad de sitios de restricción en el fragmento de interés y la posibilidad de digestiones incompletas que producen falsos positivos [16].

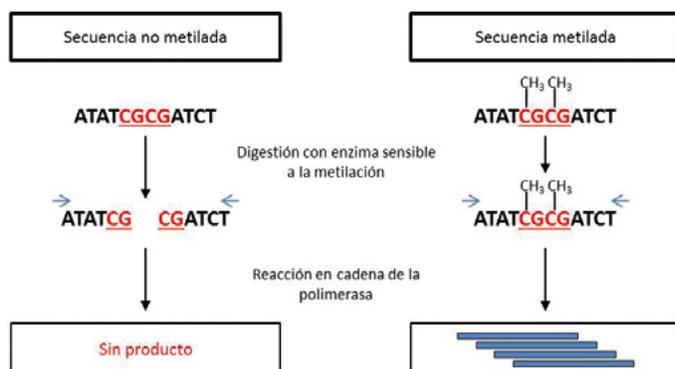


Figura 1. Esquema de la técnica basada en enzimas de restricción sensibles a la metilación combinada con la reacción en cadena de la polimerasa. El ADN es tratado con la enzima sensible a la metilación y, posteriormente, amplificado por reacción en cadena de la polimerasa. Cuando la secuencia se encuentra sin metilar la enzima corta en su sitio de reconocimiento, por lo tanto, no hay amplificado y no se encuentra producto de la reacción. Cuando la secuencia se encuentra metilada, los grupos metilo protegen de la digestión por la enzima de restricción y, por tanto, no se produce el corte de la secuencia en el sitio de reconocimiento de la enzima, permaneciendo intacta. En este caso la secuencia es amplificada, previo diseño de cebadores específicos, obteniendo el producto de reacción. Tomada y modificada de "CpG methylation analysis--current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology" por AR Sepulveda y colaboradores, 2009, *J Mol Diagn*, 11, p. 269. Copyright© 2009 por American Society for Investigative Pathology y la Association for Molecular Pathology.

Actualmente, la mayoría de las técnicas de detección de la metilación del ADN están basadas en el uso de enzimas de restricción y la previa conversión con bisulfito de sodio de la secuencia, la cual consiste en una serie de reacciones químicas (sulfonación, deaminación y desulfonación) que dan paso a la transformación de las citosinas no metiladas en uracilos, que serán convertidos en timinas durante la síntesis *in vitro* del ADN en la reacción en cadena de la polimerasa [17] (véase figura 2).

Reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación

La reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación (MSP) proporciona información cualitativa del estado de metilación de una secuencia concreta. Esta técnica fue originalmente descrita por Herman y colaboradores en 1996 [18] y desde entonces ha sido predominantemente usada para el análisis de genes supresores de tumores en muestras primarias de pacientes [19,20]. La reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación incluye el tratamiento inicial con bisulfito y el uso de dos pares de cebadores específicos, uno para regiones metiladas y otro para las no metiladas, diseñados para discriminar entre las citosinas convertidas y las no convertidas (véase figura 2) [21]. Aproximadamente el 0,1% del ADN metilado puede ser detectado mediante esta técnica, por lo que se considera altamente sensible [11]; no obstante, no discrimina entre los niveles bajos y altos de metilación en una secuencia determinada.

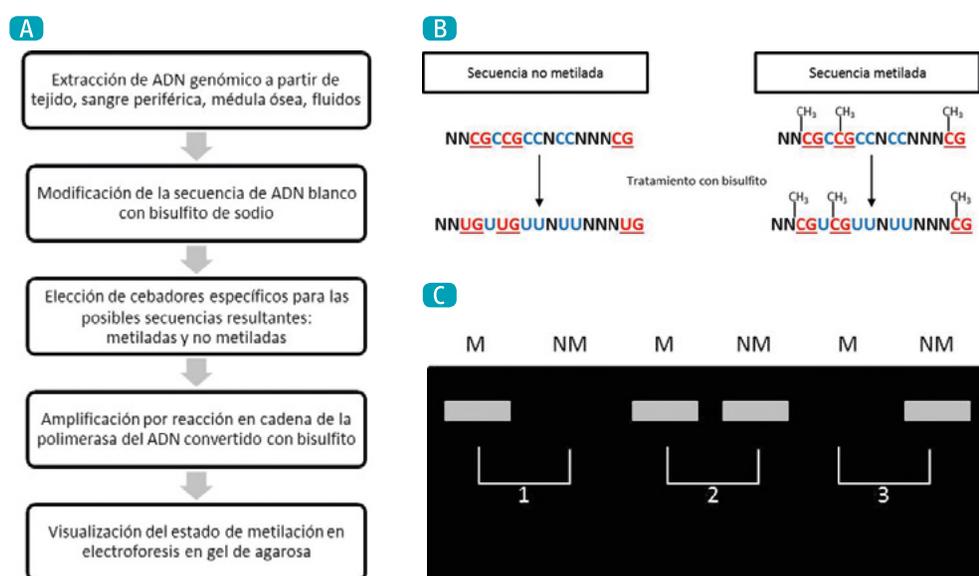


Figura 2. A. Esquema general de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación (MSP). El ADN de las muestras es extraído, modificado con bisulfito de sodio y amplificado con dos pares de cebadores previamente diseñados. El primero reconoce y se une exclusivamente a secuencias metiladas y el segundo reconoce las secuencias que no están metiladas. Finalmente, el estado de la metilación se visualiza en gel de agarosa. B. Efecto de la modificación de bisulfito sobre las secuencias ricas en CpG. Las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las metiladas no sufren ninguna modificación. C. Representación de los posibles resultados de la MSP visualizados en la electroforesis en gel de agarosa. M: secuencia metilada; NM: secuencia no metilada; 1: ADN metilado; 2: ADN hemimetilado; 3: ADN no metilado.

Las desventajas de esta técnica se deben sobre todo a los efectos del bisulfito en el ADN, ya que se ha demostrado que causa una degradación extensa en las secuencias diana y mayores pérdidas en los pasos de purificación, lo que puede afectar el rendimiento del ensayo y la inducción de sesgos en la amplificación [22]. También existe riesgo de arrojar resultados falsos positivos o sobreestimar la metilación de una secuencia dada debido a la conversión incompleta del bisulfito que lleva a que la secuencia sin metilar pueda ser amplificada por el cebador específico de metilación [23]. En contraposición, diferentes casas comerciales han diseñado

estuches encaminados a la recuperación y purificación del ADN convertido con bisulfito (p. ej. DAPKI, Zymo Research, California, Estados Unidos), y se han implementado técnicas para garantizar la conversión completa del ADN, pero no todos los estudios tienen en cuenta estos aspectos [24].

Utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación en el estudio de las neoplasias hematológicas

A pesar de sus desventajas, la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación ha sido utilizada ampliamente en estudios epigenéticos relacionados con neoplasias hematológicas, debido a que es un ensayo sencillo y costo-efectivo [11]. La discriminación de genes específicos que están modificados por mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, ha sido posible gracias al empleo de esta técnica. En la patogénesis de las leucemias el silenciamiento de genes por hipermetilación es frecuente, entre ellos los genes supresores de tumores, genes asociados a apoptosis y genes reguladores del ciclo celular [25].

Gracias a la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación se han podido realizar diversos estudios encaminados a conocer los eventos biológicos que están presentes en el inicio, la progresión y fenómenos de resistencia en las neoplasias hematológicas; además, se ha facilitado la identificación de biomarcadores que pueden tener un valor pronóstico y, mejor aún, brindar la posibilidad de realizar una terapia personalizada y dirigida [7,26-30]. Algunos genes hipermetilados relacionados con neoplasias hematológicas que han sido identificados utilizando esta técnica se describen en la [tabla 1](#).

Análisis combinado de restricción bisulfito

El análisis combinado de restricción bisulfito (COBRA; del inglés, *combined bisulfite restriction analysis*) es una técnica cuantitativa que determina el nivel de metilación de un gen específico en pequeñas cantidades de ADN genómico. Este método se compone básicamente de los siguientes pasos: una reacción en cadena de la polimerasa estándar después del tratamiento con bisulfito de sodio, la digestión con enzimas de restricción y la cuantificación de la metilación de la secuencia determinada [39].

Xiong y colaboradores describieron esta técnica, en la que se incluye inicialmente la conversión de las citosinas no metiladas en uracilos para la posterior amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. Previamente, se realiza el diseño de unos cebadores que sean complementarios con la secuencia de ADN convertido y no contengan dinucleótidos CpG en la región correspondiente del ADN original sin convertir; esto produce que durante la amplificación no se discrimine entre los ADN molde según su estado de metilación [40].

Antes de iniciar la digestión, los productos de la reacción en cadena de la polimerasa son purificados y luego digeridos con una enzima de restricción que tiene un sitio de reconocimiento CpG en la secuencia de ADN original sin convertir. De esta manera, el corte sólo ocurre si la secuencia CpG se mantuvo intacta en la conversión con bisulfito, es decir, si sus citosinas se encontraban originalmente metiladas; entretanto, los sitios que se encontraban originalmente no metilados no son cortados [40].

Tabla I. Genes hipermetilados en muestras de pacientes con neoplasias hematológicas determinadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación

Genes	Tipo de neoplasia hematológica	Hallazgo relevante	Referencia
p15, p16, p53 y DAPK	Leucemia mieloide crónica (fase crónica)	Genes del ciclo celular y apoptosis que se encuentran hipermetilados	Bodoor y cols., 2014 [26]
p16INK4a	Leucemia mieloide crónica (fase crónica, acelerada y blástica)	Implicado en la progresión de fase clínica	Ahmad y cols., 2014 [27]
SHP-1	Leucemia mieloide crónica (fase acelerada y blástica)	Implicado en la progresión de fase clínica	Li y cols., 2014 [28]
p15, MGMT, RAR β , p16, DAPK y FHIT	Leucemia mieloide crónica (fase blástica)	Implicados en la progresión de fase clínica	Uehara y cols., 2012 [6]
BIM	Leucemia mieloide crónica	Relacionado con respuesta reducida al tratamiento con Imatinib	San Jose y cols., 2009 [29]
MLH1, RPRM, FEM1B y THAP2	Leucemia mieloide crónica	Potenciales biomarcadores de resistencia al Imatinib	You y cols., 2012 [7]
GRAF	Leucemia mieloide aguda	Gen hipermetilado que podría ser un evento temprano en esta leucemia	Qian y cols., 2011 [30]
MEG3	Leucemia mieloide aguda	Hipermetilación del gen asociada con mal pronóstico	Benetatos y cols., 2010 [31]
p15	Leucemia mieloide aguda	Potencial biomarcador en esta leucemia	Bodoor y cols., 2014 [26]
C/EBP ζ	Leucemia mieloide aguda	Hipermetilación y baja expresión del gen	Yao y cols., 2011 [32]
TSC2	Leucemia mieloide aguda	Hipermetilación del promotor asociada con baja expresión de la proteína TSC2 que participa en el ciclo celular	Xu y cols., 2009 [33]
SFRP1 y SFRP2	Leucemia mieloide aguda	Posiblemente involucrados en la iniciación de la enfermedad (detectadas en pacientes con diagnóstico <i>de novo</i>)	Ghasemi y cols., 2015 [34]
MT3	Leucemia mieloide aguda	Gen inactivado en pacientes pediátricos	Tao y cols., 2014 [35]
DAPK	Leucemia linfocítica crónica	Potencial biomarcador de esta leucemia	Bodoor y cols., 2014 [26]
CALCA	Leucemia linfocítica crónica	Asociado con pacientes de alto riesgo de infiltración a sistema nervioso central	Paixao y cols., 2006 [36]
DLC1, SHP-1, p15, p16	Leucemia linfocítica crónica	Relacionados con un estado de diagnóstico avanzado	Forsterova y cols., 2010 [37]
p15, p16, p53	Leucemia linfocítica aguda	Genes del ciclo celular y apoptosis que se encuentran hipermetilados	Bodoor y cols., 2014 [26]
PTEN	Leucemia linfocítica aguda (con cromosoma Filadelfia positivo)	Relacionada con la resistencia al Imatinib en pacientes con Filadelfia positivo	Montiel-Duarte y cols., 2008 [38]

La eficiencia de la digestión puede ser verificada con el empleo de un control de digestión, utilizando por ejemplo una enzima con secuencia de reconocimiento CATG, que no debe permanecer después de la conversión con bisulfito. Por lo tanto, si se produce algún clivaje indica que no hubo metilación del ADN o que se presentó una conversión incompleta con el bisulfito. Finalmente, los productos de las digestiones son separados en gel de poliacrilamida desnaturalizado y transferidos

a una membrana por *electroblotting* para luego ser hibridados con oligonucleótidos y cuantificados por una fosforimagen [40] (véase figuras 3 y 4).



Figura 3. Esquema general sobre la técnica COBRA descrita por Xiong y colaboradores (1997) [40].

El análisis combinado de restricción bisulfito es comúnmente usado para la determinación del estado de metilación de un gran conjunto de muestras, es técnicamente simple y, dependiendo de la región que está siendo investigada, puede brindar información sobre el estado de metilación de varios sitios CpG de la secuencia en una sola reacción [41]. Aunque, cabe señalar que sólo proporciona información sobre el estado de metilación de ADN de los sitios CpG que son parte del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción.

Este método, basado en la electroforesis en gel, tiene varios inconvenientes: consume mucho tiempo, requiere una gran cantidad de muestra y presenta un poder de separación limitada [42]. Además, el sistema amplifica todo el ADN, es decir, no hay una amplificación preferencial del ADN metilado, por lo que las muestras que contenían originalmente sólo trazas de ADN metilado lo presentan de igual forma en el producto de la reacción en cadena de la polimerasa. Estas pequeñas cantidades no se pueden detectar fácilmente a través de la restricción enzimática [43].

Además de esto, el principal inconveniente del análisis combinado de restricción bisulfito es que la información cuantitativa no se puede extraer fácilmente a partir del ensayo. Los intentos para cuantificar el ADN metilado se han realizado mediante hibridación de los productos de restricción con cebadores marcados radiactivamente. Aunque se han obtenido resultados

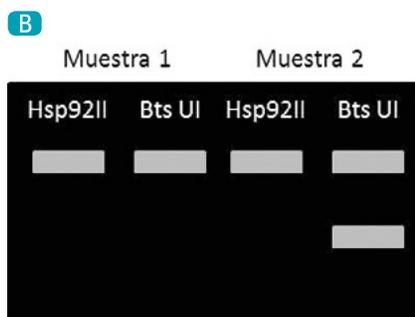
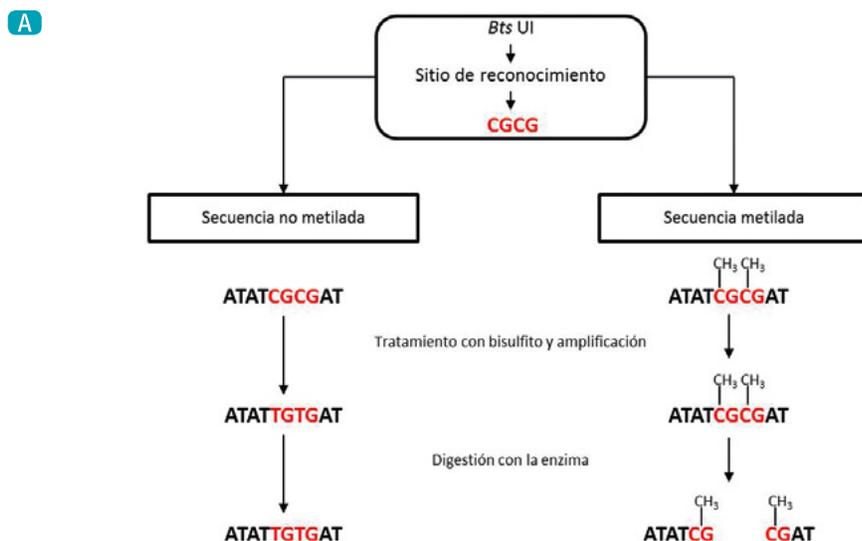


Figura 4. A. Esquema de acción de la enzima de restricción Bts UI en las secuencias metiladas y no metiladas. El sitio de reconocimiento de la enzima es la secuencia CGCG. Cuando una secuencia de ADN no metilada es sometida al tratamiento con bisulfito y luego amplificada, las citosinas son convertidas a timinas, lo que produce la pérdida del sitio de reconocimiento de la enzima y, en consecuencia, evita que la secuencia sea cortada, permaneciendo intacta. Cuando una secuencia metilada es sometida al mismo procedimiento, las citosinas metiladas no son modificadas por el bisulfito y, por tanto, la enzima está en la capacidad de reconocer y cortar la secuencia. B. Representación de la visualización en gel de poliacrilamida del control negativo y de muestras con o sin metilación. En el ensayo debe

incluirse un control de digestión con una enzima de restricción como la Hsp92II, cuya secuencia de reconocimiento es CATG, que debe ser destruida por la conversión del bisulfito. Cualquier escisión por la Hsp92II indica una conversión incompleta del bisulfito de sodio. Muestra 1: sin metilación; muestra 2: 100% metilada. Obsérvese la presencia de dos bandas correspondientes a los dos fragmentos formados por la escisión de la enzima Bts UI.

exitosos bajo este enfoque, el método es laborioso e implica el uso de un isótopo radioactivo. De igual manera, se ha intentado cuantificar las intensidades de los fragmentos de ADN teñidos con bromuro de etidio usando programas informáticos de edición de imágenes. El problema de este enfoque es la subestimación de las señales fuertes; además, la fluorescencia del fondo de las imágenes del gel es con frecuencia variable lo que afecta los cálculos y hace imposible comparar de forma confiable los niveles de metilación en las muestras [41].

Por tal razón, se han realizado modificaciones de la técnica con el propósito de realizar una cuantificación precisa y reproducible del ADN metilado, como la combinación del análisis combinado de restricción bisulfito y la electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF; del inglés, *capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection*) [42] y el Bio-COBRA, que combina el sistema original con la plataforma del bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc., California, Estados Unidos) [41]. Estas técnicas modificadas ofrecen ciertas ventajas como una buena separación, eficiencia, alta sensibilidad y cuantificación de pe-

queños tamaños de muestra, lo cual convierte al análisis combinado de restricción bisulfito en una importante herramienta para el desarrollo de parámetros diagnósticos y pronósticos para la detección y manejo de las enfermedades.

Utilidad del análisis combinado de restricción bisulfito en el estudio de las neoplasias hematológicas

El análisis combinado de restricción bisulfito ha permitido conocer con más de detalle los niveles de metilación de los genes involucrados en el comienzo, la progresión y la resistencia al tratamiento en las neoplasias hematológicas, debido a su carácter cuantitativo y la capacidad de realizarse en gran cantidad de muestras. Algunos genes hipermetilados relacionados con neoplasias hematológicas que han sido identificados utilizando esta técnica se describen en la [tabla 2](#).

Tabla 2. Genes hipermetilados en muestras de pacientes con neoplasias hematológicas determinados mediante el análisis combinado de restricción bisulfito

Genes	Tipo de neoplasia hematológica	Hallazgo relevante	Referencia
hMSH2	Leucemia linfocítica aguda	El incremento de la metilación de este gen disminuye la supervivencia en los pacientes con leucemia linfocítica aguda	Wang y cols., 2014 [44]
RASSF6 y RASSF10	Leucemia linfocítica aguda	El perfil de hipermetilación de este gen es diferente al de los tumores sólidos. Estos son frecuentes en la patogénesis de la leucemia linfocítica aguda	Hesson y cols., 2009 [45]
TWIST2	Leucemia linfocítica aguda	La inactivación epigenética tiene un rol dual en el pronóstico de la enfermedad y la resistencia a quimioterapia	Thathia y cols., 2011 [46]
HOXA5	Leucemia mielocítica crónica	La hipermetilación del gen está fuertemente correlacionada con la progresión a fase blástica	Strathdee y cols., 2007 [47]
TTC12	Leucemia linfocítica aguda	La expresión es inhibida en asociación con la hipermetilación del gen	Wattanawarapom y cols., 2007 [48]
CD38 y HOXA4	Leucemia linfocítica crónica	Estos marcadores pueden ser usados para estratificar el riesgo	Irving y cols., 2011 [49]

Utilizando el análisis combinado de restricción bisulfito se pudo determinar en 118 pacientes con leucemia linfocítica crónica una puntuación global de la metilación en un panel de genes: CD38, HOXA4 (homeobox A4) y BTG4 (gen 4 de translocación de células B), que tiene un valor predictivo en la progresión de la enfermedad, lo que demuestra que este enfoque permite estratificar el riesgo de un buen o mal curso en los pacientes con leucemia linfocítica crónica [49].

Wattanawarapom y colaboradores ilustraron con más detalle el comportamiento de la metilación del gen TTC12 (dominio 12 repetido de tetratricopéptido) de los leucocitos de individuos sanos y las médulas óseas de pacientes con remisión completa y con leucemia linfocítica aguda, en los que pudieron determinar las medias estadísticas y los niveles más altos de metilación, siendo mayores en el último grupo, lo que demuestra la asociación entre la regulación epigenética y la leucemia linfocítica aguda [48].

Técnicas de secuenciación en el análisis de metilación del ADN

El análisis de todos los dinucleótidos CpG en una secuencia dada permite tener una visión más amplia de los niveles de metilación del ADN. Cambios en muy pocos o incluso en un solo dinucleótido CpG son suficientes para alterar la expresión de un gen. Esto ha sido posible verificarlo gracias al análisis de metilación cuantitativa en los promotores de genes susceptibles de ser estudiados. En la actualidad los métodos más utilizados para la cuantificación de la metilación en una región específica son: la secuenciación con bisulfito y la pirosecuenciación [50].

Secuenciación dependiente de bisulfito de sodio

La secuenciación con bisulfito (BSP; del inglés, *bisulfite sequencing PCR*) es el estándar de oro para el mapeo de la metilación alelo específica en los sitios CpG de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa luego de la conversión con bisulfito de sodio. Casi todas las investigaciones que estudian la metilación del ADN dependen directa o indirectamente de los datos obtenidos para la región de interés arrojados por la secuenciación con bisulfito de sodio [51].

Esta técnica consiste en la conversión del ADN con bisulfito de sodio, seguido de la amplificación de una región de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa y, finalmente, la secuenciación del producto de amplificación de forma directa o posterior a la clonación en un vector adecuado [24] (véase [figura 5](#)).

Tradicionalmente, la secuenciación con bisulfito basada en clonación es la más comúnmente utilizada, además es la primera técnica descrita para el análisis de metilación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Con este método se realiza inicialmente una reacción de conversión con bisulfito de sodio seguido del proceso de desnaturalización, amplificación y clonación. Después de la expansión y purificación de los plásmidos, los productos de inserción de la reacción en cadena de la polimerasa son secuenciados. El estado de metilación de cada CpG en la región de interés es determinado por la secuencia de cada clon expandido [52,53]. Para obtener una mayor sensibilidad se requiere de seis reacciones de secuenciación.

Una de las ventajas de esta técnica es que es la única opción para la determinación de la metilación de haplotipos en el laboratorio [54]; sin embargo, presenta varios inconvenientes debido a que tiene múltiples pasos laboriosos (p. ej. el tratamiento con bisulfito, la clonación de los fragmentos de la reacción en cadena de la polimerasa, la construcción de vectores recombinantes, la identificación de clones positivos y la secuenciación del ADN), lo que implica una mano de obra intensiva y capacitada, y mucho tiempo de procesamiento, lo cual es inadecuado para el análisis de muestras de alto rendimiento [50]. Además, existen evidencias de que los amplicones con citosinas pueden ser más difíciles de clonar eficientemente [55].

La secuenciación con bisulfito directa, es decir, sin realizar la clonación previa, provee información sobre el estado de metilación promedio para cada CpG mediante la comparación de los resultados de la región de interés con una secuencia de referencia del ADN genómico respectivo. Este método constituye una forma corta, más rápida y menos dispendiosa de realizar la secuenciación [24]. Algunos inconvenientes de este tipo de análisis son la mala calidad de la señal debido a la sobredimensión de citosinas causada por artefactos que afectan el análisis

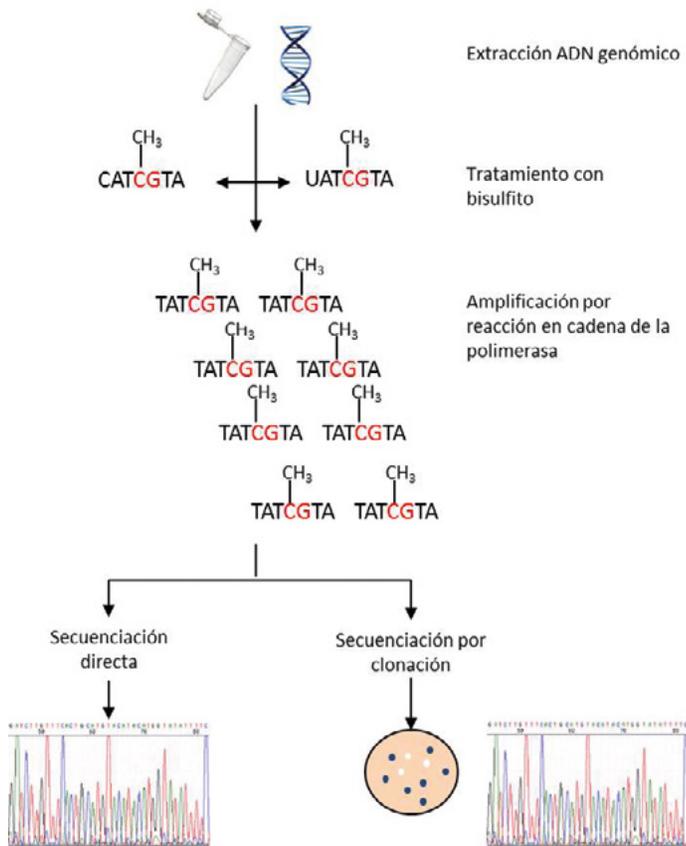


Figura 5. Esquema general de la secuenciación con bisulfito directa y por clonación. Inicialmente se realiza la extracción del ADN genómico para ser convertido con bisulfito, amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa y secuenciado de forma directa o luego de un paso previo de clonación.

del electroferograma y las señales brindadas por la conversión incompleta con el bisulfito. A pesar de esto, la secuenciación con bisulfito brinda una información del estado de metilación a lo largo de las hebras de ADN individuales, donde por ejemplo los patrones bimodales de metilación son claramente evidentes. Además, requiere de poco conocimiento técnico y se puede realizar utilizando estuches disponibles comercialmente [56].

Pirosecuenciación con bisulfito

Colella y colaboradores desarrollaron, en 2003, un método altamente cuantitativo para evaluar el nivel de metilación en sitios específicos utilizando la tecnología de pirosecuenciación. Los análisis de metilación por pirosecuenciación (“PyroMethA”) son una modificación del análisis combinado de restricción bisulfito, en el que el análisis de restricción es sustituido por una reacción de pirosecuenciación altamente cuantitativa [57].

La pirosecuenciación es un método de secuenciación por síntesis que monitorea cuantitativamente la incorporación en tiempo real de los nucleótidos mediante la conversión enzimática del pirofosfato liberado en una señal de luz proporcional. Este método combina un protocolo

de reacción simple con medidas reproducibles y precisas del grado de metilación en varias CpG con una alta resolución cuantitativa. Después del tratamiento con bisulfito de sodio y la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa, el grado de cada metilación en cada posición de CpG en una secuencia se determina a partir de la relación de timina y citosina [58](véase figura 6).

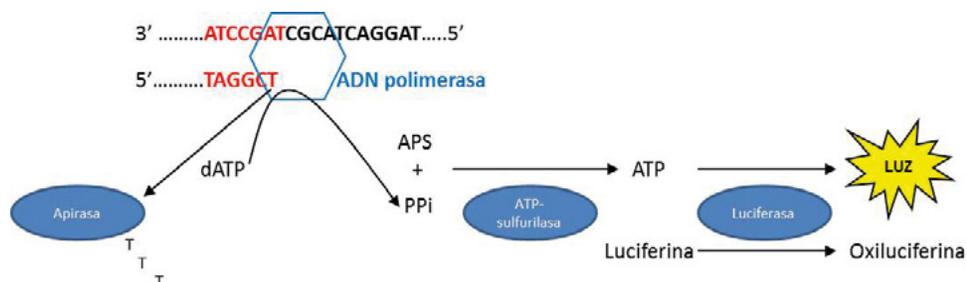


Figura 6. Esquema general de la pirosecuenciación. El proceso inicia con la incorporación de uno de los cuatro deoxiribonucleótidos (dNTPs), si este es complementario a la hebra molde la ADN polimerasa cataliza la incorporación y libera pirofosfato (PPi). Utilizando APS (adenosina 5'-fosfosulfato) como sustrato la ATP-sulfonilasa convierte cuantitativamente el pirofosfato recién liberado en ATP (adenosín trifosfato), lo que activa la conversión de la luciferina a oxiluciferina por la acción de la luciferasa. Esta reacción genera una señal de luz proporcional a la cantidad de ATP producido. Un equipo capta la señal y genera un picograma, el cual muestra picos representando los nucleótidos incorporados. La apirasa degrada los dNTPs que no son incorporados.

Este método tiene como ventaja la inclusión de un control interno, el cual corresponde a una secuencia de ADN que contiene citosinas no convertidas, lo que permite la cuantificación precisa de varios sitios CpG en una sola reacción. Uno de los inconvenientes que se presentan es que sólo pueden ser secuenciados en cada reacción 20 a 30 pares de bases, lo que limita el número de CpG que pueden ser evaluadas [39].

Utilidad de las técnicas de secuenciación en el estudio de las neoplasias hematológicas

La secuenciación con bisulfito es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de metilación de genes en las neoplasias hematológicas ya que es considerado el estándar de oro en los estudios epigenéticos. Esta técnica ha sido útil en la detección de potenciales biomarcadores que lideran los procesos de transformación, progresión y resistencia de los cánceres hematológicos. Por su parte, la pirosecuenciación ha permitido la cuantificación fidedigna del estado de metilación en los mismos procesos, lo que ha permitido realizar estratificaciones de riesgo de recaída, resistencia y enfermedad residual, que posibilitan realizar un pronóstico en los pacientes con este tipo de enfermedades. Algunos genes hipermetilados relacionados con las neoplasias hematológicas que han sido identificados utilizando estas técnicas se describen en la [tabla 3](#).

En los estudios de metilación de genes implicados en las neoplasias hematológicas usualmente la secuenciación con bisulfito y la pirosecuenciación son empleadas de manera simultánea o concomitantemente con otras técnicas. Bohne y colaboradores utilizaron la secuenciación y la pirosecuenciación para identificar y asociar la modulación epigenética de la hipermetilación del gen ERG (gen

Tabla 3. Genes hipermetilados en muestras de pacientes con neoplasias hematológicas determinados mediante técnicas de secuenciación

Genes	Tipo de neoplasia hematológica	Hallazgo relevante	Referencia
HOXA5	Leucemia mieloide aguda	La cuantificación de la metilación de HOXA5 por pirosecuenciación es útil para predecir el pronóstico a corto plazo en la leucemia mieloide aguda	Kim y cols., 2010 [59]
	Leucemia mieloide crónica	La hipermetilación de este gen está fuertemente correlacionada con la progresión a fase blástica, y ha sido determinado por secuenciación con bisulfito	Strathdee y cols., 2007 [47]
Ligandos NKG2D	Leucemia mieloide aguda	La hipermetilación de los ligandos de NKG2D ha sido determinada por pirosecuenciación y se ha demostrado que contribuyen a la evasión del sistema inmune de las células tumorales en la leucemia mieloide aguda	Baragaño Raneros y cols., 2015 [60]
MT3	Leucemia mieloide aguda	Este gen es inactivado en los pacientes pediátricos. El estado de metilación ha sido determinado por secuenciación con bisulfito	Tao y cols., 2014 [35]
CASP8AP2	Leucemia linfocítica aguda	El análisis del estado de metilación de este gen ha sido realizada por secuenciación de bisulfito, la cual mostró hipermetilación asociada con enfermedad mínima residual (MRD) y respuesta pobre al tratamiento	Li y cols., 2013 [61]
ERG	Leucemia linfocítica aguda de células T	Este gen es importante en la diferenciación hematopoyética. Se encuentra hipermetilado según los análisis por secuenciación con bisulfito	Bohne y cols., 2009[62]
BIM	Leucemia mieloide crónica	La baja regulación de BIM es epigenéticamente controlada por hipermetilación en pacientes con leucemia mieloide crónica y tienen un impacto desfavorable en el pronóstico. La hipermetilación de este gen ha sido determinada por secuenciación con bisulfito	San Jose-Eneriz y cols, 2009 [29]
hMSH2	Leucemia linfocítica aguda	El incremento de la metilación disminuye la supervivencia en los pacientes con leucemia linfocítica aguda. La cuantificación de la metilación se realizó por pirosecuenciación	Wang y cols., 2014 [44]

relacionado con entroblastos de transformación específicos) con la leucemia linfocítica aguda de células T [62]. Por su parte, Tao y colaboradores determinaron el estado de hipermetilación del gen MT3 (metalotioneina 3) mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación y la secuenciación con bisulfito en niños que padecen leucemia mieloide aguda [35]. Wang y colaboradores, utilizando simultáneamente dos técnicas cuantitativas, el análisis combinado de restricción bisulfito y la pirosecuenciación, demostraron la implicación

del gen hMSH2 (homólogo en humanos-2 de mutS) en el desarrollo de la leucemia linfocítica aguda y en la supervivencia de estos pacientes [44].

Otra de las aplicaciones actuales de las técnicas de secuenciación con bisulfito es la nueva generación de secuencias de metilomas que proveen perfiles digitales individuales para cánceres humanos, que podrían potencialmente proveer un método robusto para la clasificación epigenética de los subtipos de tumores. Por ejemplo, Queiros y colaboradores, utilizando cinco biomarcadores epigenéticos lograron clasificar a los pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B en los tres subtipos clínicos-biológicos (de células inmaduras, intermedias y maduras tipo B) [63].

Técnicas para análisis de metilación basadas en micromatrices

Las micromatrices (del inglés, *microarrays*) para el análisis de metilación son técnicas moleculares ampliamente usadas para determinar el estado de metilación de múltiples genes de forma simultánea. Estas técnicas se basan fundamentalmente en un proceso de hibridación. El sistema consiste en soportes sólidos de cristal o plástico en los que se encuentran dispuestas diferentes sondas específicas de ADN que pertenecen a genes determinados. El ADN tiene la propiedad física de hibridar con secuencias complementarias según ciertas condiciones de temperatura y pH. De esta forma, si en una muestra biológica se encuentra la secuencia complementaria a la sonda de la micromatriz estas hibridan y se pueden visualizar con un trazador, generalmente un fluorocromo. Luego, la micromatriz se escanea y se obtiene la imagen que será analizada en un programa informático especializado [64].

En los últimos años ha existido un aumento creciente en el uso de la tecnología de micromatrices en la metilación y diversos métodos han sido diseñados para obtener una mayor cobertura en el estudio de los cambios de metilación en todo el epigenoma y en genes específicos con el objetivo de mejorar la comprensión de las neoplasias hematológicas [65]. El estuche *Illumina HumanMethylation450 Bead Chip* (Illumina, Inc., California, Estados Unidos) es una de las plataformas de micromatrices mejor comprendidas y actualmente disponibles, que debido al alto costo de las tecnologías de secuenciación de próxima generación es ampliamente usada como una herramienta para el análisis de los niveles de metilación en todo el genoma. Esta tecnología permite una alta resolución en los perfiles de metilación del genoma humano ya que cubre el 99% de genes de secuencia referenciados y aproximadamente 250.000 islas CpG. Esta plataforma está centrada en los promotores de genes y las regiones intergénicas, pero también contiene sitios de interés adicional como las regiones sensibles a DNAsas y los potenciadores. En comparación con los enfoques de secuenciación, las matrices de metilación son una alternativa de bajo costo que permiten el perfilado de un gran número de muestras, aunque con una resolución reducida [66].

Otra técnica de metilación basada en micromatrices es el sistema *Epiect Methyl II PCR Array* (Qiagen N.V., Venlo, Países Bajos), la cual utiliza la tecnología *MethylScreen*, que se basa en la escisión diferencial de secuencias diana por dos enzimas de restricción cuya actividad depende de la presencia o ausencia de citosinas metiladas en el sitio de reconocimiento. Después de la digestión con estas enzimas se cuantifica, por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo

real, la cantidad de ADN restante en cada reacción enzimática. Esto permite calcular de forma fiable y sencilla el estado de metilación de genes individuales (véase figura 7) [67]. Este método es relativamente simple y requiere poco ADN, pero como todas las técnicas que utilizan enzimas de restricción la detección de la isla CpG depende de si la enzima de restricción reconoce los sitios analizados y la digestión incompleta produce falsos positivos [13].

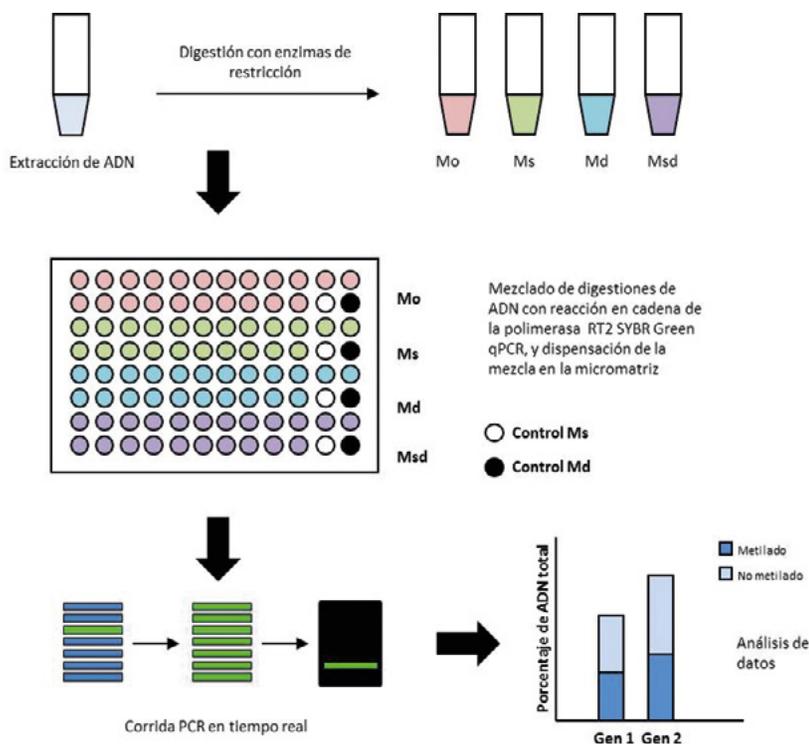


Figura 7. Esquema del estudio *EpiTect Methyl II PCR Array*. El ADN genómico extraído se somete a cuatro reacciones en tubos separados, en los cuales se adicionan la solución tampón y la combinación de enzimas de restricción apropiada. En el primer tubo se realiza una digestión simulada (Mo) en la que se agrega la solución tampón, pero no se incluyen las enzimas. En el segundo y tercer tubo se llevan a cabo las digestiones enzimáticas, uno empleando una enzima de restricción sensible a la metilación HhaI (Ms) y el otro una enzima dependiente de la metilación MspI (Md), los cuales determinarán la posterior detección de la fracción metilada y no metilada del ADN, respectivamente. Luego, las mezclas Ms y Md son adicionadas en un cuarto tubo de digestión (Msd). El producto de cada una de las digestiones es mezclado con el estuche RT² SYBR Green qPCR Mastermix y es dispensado en el plato que contiene dicho panel y donde previamente se depositaron los cebadores específicos para los genes. Posteriormente, se procede a realizar la corrida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real basada en inmunofluorescencia y, finalmente, se establece el porcentaje de metilación de los promotores de los genes estudiados. Tomada y modificada de "EpiTect Methyl II PCR Array System: A simple tool for screening regional DNA methylation of a large number of genes or samples without bisulfite conversion" por Jiang y colaboradores, 2012, p. 3. Copyright© 2012 por QIAGEN.

Los microarreglos pese a ser una tecnología novedosa y efectiva, presentan algunas limitaciones que los hace inadecuados en algunas configuraciones experimentales; por ejemplo, parámetros como la influencia de las variaciones de la secuencia en el ADN, las condiciones de amplificación y la sensibilidad en los métodos no han sido ampliamente investigados [68]. Además, cada vez se encuentra disponible esta tecnología en laboratorios no especializados, por lo que existe una creciente necesidad de herramientas informáticas de fácil uso que permitan la manipulación

y análisis de un conjunto grande de datos de metilación [69], al igual que sistemas de validación de estos métodos respecto a los estándares de oro mediante la creación de un manual de buenas prácticas entre los investigadores, que asegure que los datos obtenidos son de la mayor calidad posible [65].

Utilidad de las técnicas basadas en micromatrices en el estudio de neoplasias hematológicas

La tecnología de micromatrices puede ayudar a identificar la variación interindividual en los patrones de metilación en todo el genoma, permite observar los efectos epigenéticos en la diferenciación celular, las remisiones, las recaídas y la resistencia al tratamiento de las neoplasias hematológicas; además, posibilita estratificar y clasificar los tumores o subtipos de leucemias. Algunos estudios realizados en pacientes con neoplasias hematológicas que han sido identificados utilizando esta técnica se describen en la [tabla 4](#).

Tabla 4. Estudios realizados en pacientes con neoplasias hematológicas que emplearon técnicas basadas en micromatrices

Estudio realizado	Tipo de neoplasia hematológica	Hallazgo relevante	Referencia
Análisis de un panel de 22 genes supresores de tumores	Leucemia mieloide crónica	Del panel de 22 genes supresores de tumores se encontró un único gen hipermetilado, el SLC5A8, en pacientes recién diagnosticados	Chin y cols., 2014 [70]
Visión global del genoma (metiloma)	Leucemia linfocítica aguda	Los patrones de metilación en los promotores específicos permiten identificar diferentes subtipos de leucemia linfocítica aguda con la translocación que involucra al gen MLL, lo que tiene influencia en la clínica y opción terapéutica	Stumpel y cols., 2009 [71]
Visión global del genoma (metiloma), evaluación de 807 genes e identificación de 13 genes hipermetilados en la vía TP53	Leucemia linfocítica aguda	El análisis demostró simultánea y frecuente inactivación de los genes involucrados en la vía TP53, que se encuentran relacionados con el pronóstico de la enfermedad	Vilas-Zorzone y cols., 2011 [72]
Análisis de 807 genes	Leucemia mieloide aguda	La hipermetilación se encontró en muestras de leucemia mieloide aguda con riesgo de recaída	Wilop y cols., 2011 [73]

Conclusiones

En todo tipo de neoplasia un gran número de genes implicados en las vías celulares fundamentales pueden ser afectados por una ganancia en la metilación (hipermetilación) y por el conducente silenciamiento transcripcional [4]. Los patrones alterados de metilación del ADN pueden servir como biomarcadores para la detección, pronóstico y predicción de la respuesta al tratamiento de diferentes enfermedades. Además, ensayos clínicos con terapias dirigidas epigenéticamente han dado resultados prometedores en el caso de las neoplasias hematopoyéticas [74].

Las innumerables aplicaciones clínicas de las pruebas para el análisis de metilación de las islas CpG para cánceres hematológicos son prometedoras; sin embargo, un paso crítico para que estas metodologías puedan utilizarse en el diagnóstico molecular clínico es la decisión sobre cuál método emplear. En primera instancia las pruebas deben basarse en los objetivos del estudio a realizar, la selección y el número de islas CpG en los genes o promotores que se evaluarán en cada muestra; debe anticiparse también la heterogeneidad entre lo que es normal y lo anormal, la calidad de los tejidos, las células o el material de ADN o, si es un archivo de patología, determinar si las sustancias fijadoras podrían afectar el método de elección [16].

En la actualidad existe una gran diversidad de técnicas para el análisis de metilación además de las que han sido expuestas en esta revisión. Otros métodos de detección como el MethyLight [75], la fusión de alta resolución sensible a metilación (MS-HRM; del inglés, *methylation-sensitive high-resolution melting*) [76], el análisis cuantitativo de alelos metilados (QAMA; del inglés, *quantitative analysis of methylated alleles*) [77], la extensión de los cebadores del nucleótido simple sensible a la metilación (MS-SNuPE; del inglés, *methylation-sensitive single nucleotide primer extension*) [78], son algunos ejemplos de los métodos de detección de la metilación del ADN que han sido implementados por diferentes investigadores en el mundo. Por tal razón, se hace necesario realizar comparaciones de las diferentes metodologías que permitan establecer una estandarización de los ensayos y desarrollar paneles específicos de cada tipo de neoplasia hematológica para poder utilizar las técnicas de detección de la metilación del ADN en el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades.

El reto es grande, pero el entendimiento de la información que proporciona cada método y sus ventajas y desventajas pueden encaminar a los investigadores a seleccionar una metodología apropiada según sus necesidades y a aumentar el conocimiento sobre la red epigenética que controla la expresión de proteínas y como estas interactúan para producir la progresión de las neoplasias hematológicas, no sólo para realizar el diagnóstico por el laboratorio sino para diseñar nuevas estrategias terapéuticas que combatan la generación de resistencia a los actuales medicamentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Luz Marina Jaramillo y a Laura Medina Gómez por su apoyo en la revisión del manuscrito.

Bibliografía

1. Ngalamika O, Zhang Y, Yin H, Zhao M, Gershwin ME, Lu Q. Epigenetics, autoimmunity and hematologic malignancies: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2012; 39: 451-465.
2. Han Y, Ren J, Yu W, Terashima M, Muegge K. Malignant Transformation and Epigenetics. En: Lu Q, Chang CC, Richardson BC, eds. *Epigenetics and Dermatology*. Boston, Estados Unidos: Academic Press; 2015: 113-135.
3. Ntziachristos P, Mullenders J, Trimarchi T, Aifantis I. Mechanisms of epigenetic regulation of leukemia onset and progression. *Adv Immunol* 2013; 117: 1-38.
4. Baer C, Plass C. Aberrant DNA Methylation. En: Caplan MJ, Boron WF, Boulpaep EL, Bradshaw RA, Bylund DB, Carlson BM, et al., eds. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier B.V.; 2014.
5. Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 347-357.

6. Uehara E, Takeuchi S, Yang Y, Fukumoto T, Matsuhashi Y, Tamura T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Oncol Lett* 2012; 3: 190-192.
7. You R-I, Ho C-L, Hung H-M, Hsieh Y-F, Ju J-C, Chao T-Y. Identification of DNA methylation biomarkers in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Genomic Med Biomarkers Health Sci* 2012; 4: 12-15.
8. Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 1062-1067.
9. Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, Konya J, et al. Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2298-2305.
10. Vecchio L, Seke Etet PF, Kipanyula MJ, Krampera M, Nwabo Kamdje AH. Importance of epigenetic changes in cancer etiology, pathogenesis, clinical profiling, and treatment: what can be learned from hematologic malignancies? *Biochim Biophys Acta* 2013; 1836: 90-104.
11. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006; 20: 1-13.
12. French SW, Dawson DW, Miner MD, Doerr JR, Malone CS, Wall R, et al. DNA methylation profiling: a new tool for evaluating hematologic malignancies. *Clin Immunol* 2002; 103: 217-230.
13. Jorda M, Peinado MA. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer. *Mutat Res* 2010; 693: 84-93.
14. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.
15. Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-I CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4987-4989.
16. Sepulveda AR, Jones D, Ogino S, Samowitz W, Gulley ML, Edwards R, et al. CpG methylation analysis--current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009; 11: 266-278.
17. Rother KI, Silke J, Georgiev O, Schaffner W, Matsuo K. Influence of DNA sequence and methylation status on bisulfite conversion of cytosine residues. *Anal Biochem* 1995; 231: 263-265.
18. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826.
19. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229.
20. Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 2003; 101: 2784-2788.
21. Sasaki M, Anst J, Bassett W, Kawakami T, Sakuragi N, Dahiya R. Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 305-309.
22. Munson K, Clark J, Lamparska-Kupsik K, Smith SS. Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive QPCR. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 2893-2903.
23. Sriraksa R, Chaopatchayakul P, Jearanaikoon P, Leelayuwat C, Limpiboon T. Verification of complete bisulfite modification using Calponin-specific primer sets. *Clin Biochem* 2010; 43: 528-530.
24. Hernandez HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *Biotechniques* 2013; 55: 181-197.
25. Wang YL, Qian J, Lin J, Yao DM, Qian Z, Zhu ZH, et al. Methylation status of DDI3 gene in chronic myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 54.
26. 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.
27. Ahmad I, Mir R, Javid J, Farooq S, Yadav P, Zuberi M, et al. Epigenetic Silencing of P16 (INK4a) Gene by Promoter Hypermethylation in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14: S139.
28. Li Y, Yang L, Pan Y, Yang J, Shang Y, Luo J. Methylation and decreased expression of SHP-1 are related to disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Rep* 2014; 31: 2438-2446.
29. San Jose-Eneriz E, Agirre X, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, Martin V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1877-1889.
30. Qian J, Qian Z, Lin J, Yao DM, Chen Q, Li Y, et al. Abnormal methylation of GRAF promoter Chinese patients with acute myeloid leukemia.

- Leuk Res 2011; 35: 783-786.
31. Benetatos L, Hatzimichael E, Dasoula A, Dranitsaris G, Tsiara S, Syrrou M, et al. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2010; 34: 148-153.
 32. Yao DM, Qian J, Lin J, Wang YL, Chen Q, Qian Z, et al. Aberrant methylation of CCAAT/enhancer binding protein zeta promoter in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011; 35: 957-960.
 33. Xu Z, Wang M, Wang L, Wang Y, Zhao X, Rao Q, et al. Aberrant expression of TSC2 gene in the newly diagnosed acute leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 891-897.
 34. Ghasemi A, Rostami S, Chahardouli B, Alizad Ghandforosh N, Ghotaslou A, Nadali F. Study of SFRP1 and SFRP2 methylation status in patients with de novo Acute Myeloblastic Leukemia. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2015; 9: 15-21.
 35. Tao YF, Xu LX, Lu J, Cao L, Li ZH, Hu SY, et al. Metallothionein III (MT3) is a putative tumor suppressor gene that is frequently inactivated in pediatric acute myeloid leukemia by promoter hypermethylation. *J Transl Med* 2014; 12: 182.
 36. Paixao VA, Vidal DO, Caballero OL, Vettore AL, Tone LG, Ribeiro KB, et al. Hypermethylation of CpG island in the promoter region of CALCA in acute lymphoblastic leukemia with central nervous system (CNS) infiltration correlates with poorer prognosis. *Leuk Res* 2006; 30: 891-894.
 37. Forsterova K, Votavova H, Schwarz J, Karban J, Stuka C, Trnny M. Advanced rai stage in patients with chronic lymphocytic leukaemia correlates with simultaneous hypermethylation of plural tumour suppressor genes. *Folia Biol (Praha)* 2010; 56: 158-164.
 38. Montiel-Duarte C, Cordeu L, Agirre X, Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Jose-Eneriz ES, et al. Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk Res* 2008; 32: 709-716.
 39. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 576-581.
 40. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2532-2534.
 41. Brena RM, Auer H, Kornacker K, Hackanson B, Raval A, Byrd JC, et al. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e17.
 42. Chen HC, Chang YS, Chen SJ, Chang PL. Determination of the heterogeneity of DNA methylation by combined bisulfite restriction analysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Chromatogr A* 2012; 1230: 123-129.
 43. Kneip C, Schmidt B, Fleischhacker M, Seegerbarth A, Lewin J, Flemming N, et al. A novel method for sensitive and specific detection of DNA methylation biomarkers based on DNA restriction during PCR cycling. *Biotechniques* 2009; 47: 737-744.
 44. Wang CX, Wang X, Liu HB, Zhou ZH. Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of hMSH2 decrease overall survival of acute lymphoblastic leukemia patients via modulating cell cycle and apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 355-362.
 45. Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, Catchpole D, Brini AT, Chiaramonte R, et al. The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer* 2009; 8: 42.
 46. 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: 371-378.
 47. 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: 5048-5055.
 48. Wattanawaraporn R, Singhsilarak T, Nuchprayoon I, Mutirangura A. Hypermethylation of TTC12 gene in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 2370-2373.
 49. Irving L, Mainou-Fowler T, Parker A, Ibbotson RE, Oscier DG, Strathdee G. Methylation markers identify high risk patients in IGHV mutated chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 2011; 6: 300-306.
 50. Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, Fan W, Qian X, et al. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab Invest* 2010; 90: 282-290.
 51. Applied Biosystems. Methylation Analysis by Bisulfite Sequencing: Chemistry, Products and Protocols from Applied Biosystems. 2007.
 52. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* 2006; 1: 2353-2364.
 53. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display

- of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1827-1831.
54. Warnecke PM, Storzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 2002; 27: 101-107.
 55. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E65-65.
 56. Lewin J, Schmitt AO, Adorjan P, Hildmann T, Piepenbrock C. Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* 2004; 20: 3005-3012.
 57. Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35: 146-150.
 58. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques* 2003; 35: 152-156.
 59. Kim SY, Hwang SH, Song EJ, Shin HJ, Jung JS, Lee EY. Level of HOXA5 hypermethylation in acute myeloid leukemia is associated with short-term outcome. *Korean J Lab Med* 2010; 30: 469-473.
 60. Baragano Raneros A, Martin-Palanco V, Fernandez AF, Rodriguez RM, Fraga MF, Lopez-Larrea C, et al. Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. *Genes Immun* 2015; 16: 71-82.
 61. Li ZG, Jiao Y, Li WJ, Deng GR, Cui L, Gao C, et al. Hypermethylation of two CpG sites upstream of CASP8AP2 promoter influences gene expression and treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2013; 37: 1287-1293.
 62. Bohne A, Schlee C, Mossner M, Thibaut J, Heesch S, Thiel E, et al. Epigenetic control of differential expression of specific ERG isoforms in acute T-lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 817-822.
 63. Queiros AC, Villamor N, Clot G, Martinez-Trillos A, Kulis M, Navarro A, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia* 2014; Sep 19 [Epub ahead of print].
 64. Romero A, Blanco F. Aplicación de los microarrays en el laboratorio clínico. *Ed Cont Lab Clín* 2012; 15: 112-118.
 65. Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, et al. Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *Br J Cancer* 2013; 109: 1394-1402.
 66. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 679-692.
 67. Jiang Q, Liu CX, Gu X, Wilt G, Shaffer J, Zhang Y, et al. EpiTect Methyl II PCR Array System: A simple tool for screening regional DNA methylation of a large number of genes or samples without bisulfite conversion. SABiosciences, Qiagen. 2012. Disponible: http://www.sabiosciences.com/manuals/WP_ADNA_EpiTectMethyl2.pdf. Consultado: febrero 2015.
 68. Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 528-542.
 69. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 705-719.
 70. Chin YM, Mohd-Yacob A, Ramachandran S, Zakaria Z. DNA Methylation of SLC5A8, a Tumor Suppressor Gene in Chronic Myeloid Leukemia. *IJHSR* 2014; 4: 55-60.
 71. Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, 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: 5490-5498.
 72. Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martin-Palanco V, Martin-Subero JI, San Jose-Eneriz E, Garate L, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2011; 6: e17012.
 73. Wilop S, Fernandez AF, Jost E, Herman JG, Brummendorf TH, Esteller M, et al. Array-based DNA methylation profiling in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 155: 65-72.
 74. Kurkjian C, Kummar S, Murgu AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer* 2008; 32: 187-235.
 75. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E32.
 76. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008; 3: 1903-1908.
 77. Zeschnigk M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L, Lohmann DR. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e125.
 78. Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2529-2531.