



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
DR. IGNACIO CHÁVEZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Desarrollo de un panel de pruebas moleculares
para detectar mutaciones en los genes NPM1,
DNMT3A, IDH1/2 en casos de leucemia mieloide
aguda.**

TESIS

PRESENTA
JOAQUÍN GARCÍA SOLORIO

ASESOR
D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

CO-ASESOR
MC. VÍCTOR ALFREDO PÉREZ CONTRERAS

FEBRERO 2022 MORELIA, MICHOACÁN



La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

El estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo recibió beca del CONACyT durante la realización de su tesis

Registro de becario:1042482

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la memoria de tesis que
presentó:

Químico Farmacobiólogo Joaquín García Solorio

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Doctora en Ciencias Biomédicas

Bertha Fenton Navarro

Doctora en Ciencias Biológicas

Virginia Robinson Fuentes

Maestro en Ciencias Biológicas

Víctor Alfredo Pérez Contreras

Dirección de tesis

Doctor en Ciencias en Biología Celular

Carlos Cortés Penagos

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Marcadores Moleculares Oncológicos

ABREVIATURAS

- CD. Cluster of differentiation.
- CpG. Dinucleotido de citosina y guanina.
- CR. Complete Remission.
- DNMT3AR882. DNA metiltransferasa 3 alfa con mutación en R882.
- DNMT3AWT. DNA metiltransferasa 3 alfa silvestre.
- HSC. Células madre hematopoyéticas.
- IDH1. Enzima Isocitrato deshidrogenasa 1.
- IDH2. Enzima Isocitrato deshidrogenasa 2.
- LMA. Leucemia mieloide aguda.
- LSC. Células madre leucémicas.
- MDS. Síndrome mielodisplásico.
- MPN. Neoplasias mieloproliferativas.
- MPP. Progenitor multipotente
- OMS. Organización mundial de la salud.
- OS. Supervivencia global.
- Pre-LSC. Células madre Preleucémicas.
- SAM. S-Adenosyl-L-Metionina.
- TET2. Ten eleven translocation.
- WES. Whole exome sequencing.
- WGS. Whole genome sequencing.
- α -KG. Alfa cetoglutarato.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1 MARCO TEÓRICO.....	10
1.1 Leucemia mieloide aguda (LMA).....	10
1.2 Clasificación de la leucemia mieloide aguda por la Organización Mundial de la Salud	12
1.2.1 Leucemia mieloide aguda con recurrentes anormalidades genéticas.....	12
1.3 Origen de la leucemia mieloide aguda.....	13
1.4 Panorama genético de la leucemia mieloide aguda	15
1.5 Mutaciones en el gen NPM1 en casos de leucemia mieloide aguda.....	17
1.6 Mutaciones en el gen DNMT3A en leucemia mieloide aguda.	19
1.7 Mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 en leucemia mieloide aguda.....	20
1.8 Tratamiento convencional y específico con inhibidores de NPM1, IDH y DNMT3A mutante en leucemia mieloide aguda.....	23
1.9 Pronostico de la leucemia mieloide aguda.....	24
1.10 Valor pronóstico de las mutaciones en NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2 en los casos de leucemia mieloide aguda.....	26
1.11 El papel de las herramientas diagnósticas moleculares en la leucemia mieloide aguda	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	28
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVO GENERAL.....	29
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
6. ESTRATEGIA	30
7. MATERIALES Y METODOS.....	31
7.1 Tipo y clasificación del estudio	31
7.2 Criterios de inclusión.....	31
7.3 Criterios de exclusión	31
7.4 Criterios de eliminación.....	31
7.5 Diseño de oligonucleótidos.....	31
7.6 Extracción de DNA.....	31
7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa alelo específica.....	32
7.8 Diseño del Gblock.....	32

7.9 Electroforesis en gel de agarosa	33
7.10 Purificación de productos de PCR	33
8 RESULTADOS	33
8.1 Diseño de los oligonucleótidos de NPM1, DNMT3A, IDH1 e IDH2.....	33
8.2 Diseño del programa de PCR	35
8.3 Análisis de la funcionalidad de los oligonucleótidos	36
8.4 Análisis por secuenciación de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos de los controles internos de NPM1, DNMT3A e IDH1/2.	37
8.5 Características de las muestras seleccionadas para buscar las mutaciones en NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2	38
8.6 Análisis de las mutaciones en NPM1	39
8.6.1 Validación	40
8.7 Análisis de la mutación en R882H en DNMT3A.....	41
8.8 Análisis de la mutación R140Q en IDH2	42
8.9 PCR del Gblock.....	43
9 DISCUSIÓN GENERAL	44
10 CONCLUSIONES	45
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia que surge de las células madre y progenitores hematopoyéticos. Durante el curso de la transformación maligna, estas células experimentan una evolución genética y epigenética continua y una diversificación clonal. Como consecuencia, la LMA se compone de poblaciones heterogéneas de células malignas. Las subclonas de las células leucémicas suelen contener conjuntos distintos de anomalías citogenéticas y mutaciones somáticas, lo que resulta en una considerable complejidad genética. En la clasificación de la leucemia mieloide aguda realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se describen las anomalías genéticas y su asociación con características clínico patológicas distintivas, así como la significancia pronóstica de cada una de ellas. En las últimas revisiones se ha incluido a la LMA con mutaciones genéticas que afectan a NPM1 (Nucleophosmin 1), CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) y RUNX1 (RUNX Family Transcription Factor 1), sin embargo, existe una variedad de estudios que revelan la significancia que tienen otras mutaciones en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo genes que codifican para proteínas con diferentes funciones que van desde señalización (por ejemplo FLT3, C-KIT y NRAS), modificadores de la cromatina (MLL, ASXL), genes supresores de tumores (TP53, WT1) hasta los genes que codifican para proteínas con funciones de reguladores epigenéticos. Todos estos tipos de aberraciones cromosómicas y mutaciones pueden ser coexistentes entre unas y otras en los casos de LMA y así dar una diferente perspectiva de la evolución que presentaran los pacientes. Actualmente existen investigaciones donde se observa una coexistencia considerable de las mutaciones en DNMT3, IDH1/2 con los genes NPM1, CEBPA y RUNX1, las cuales no se han asociado a las alteraciones cromosómicas balanceadas características del desarrollo de LMA y su valor pronóstico aún no está bien dilucidado en las clasificaciones oficiales de LMA; aunado a esto las mutaciones juegan un papel importante en los casos de LMA con cariotipo normal, por ser dianas terapéuticas de medicamentos aprobados por la "Food and Drug Administration". Tal es el caso de los inhibidores de IDH (ivosidenib para IDH1 y enasidenib para IDH2) aprobados en 2017 para pacientes adultos con LMA refractaria o la azacitidina, un agente hipometilante e inhibidor de DNMT3A aprobado en septiembre del 2020 para el tratamiento continuo de pacientes adultos con LMA que lograron la primera remisión completa; sin embargo, aún sigue en investigación el papel propio de estas mutaciones con respecto al diagnóstico y si pueden llegar a ser marcadores independientes del pronóstico por sí solos.

Palabras clave: PCR, Alelo específico, Metilación, Epigenética, Pronóstico.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a neoplasm that arises from stem cells and hematopoietic progenitors. During the course of malignant transformation, these cells undergo continuous genetic and epigenetic evolution and clonal diversification. As a consequence, AML is composed of heterogeneous populations of malignant cells. Leukemic cell subclones often contain distinct sets of cytogenetic abnormalities and somatic shocks, resulting in considerable genetic complexity. In the classification of acute myeloid leukemia carried out by the World Health Organization (WHO), the genetic abnormalities and their association with distinctive clinical pathological characteristics are described, as well as the prognostic significance of each of them. In recent reviews, AML with modified genes that impair NPM1 (Nucleophosmin 1), CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) and RUNX1 (RUNX Family Transcription Factor 1) have been included, however, there are a variety of studies that reveal the significance of other changes in the development of the disease, for example genes that code for proteins with different functions ranging from signaling (for example FLT3, C-KIT and NRAS), chromatin modifiers (MLL, ASXL) , tumor suppressor genes (TP53, WT1) to genes that code for proteins with epigenetic regulatory functions. All these types of chromosomal aberrations and mutations can coexist with each other in cases of AML and thus give a different perspective of the evolution that patients will present. Currently there are investigations where a considerable coexistence of the identical ones in DNMT3, IDH1/2 with the NPM1, CEBPA and RUNX1 genes is observed, which have not been associated with the balanced chromosomal alterations characteristic of the development of AML and their prognostic value is not yet known. well diluted in the official LMA ratings; In addition to this, they will play an important role in cases of AML with normal karyotype, as they are therapeutic targets of advanced drugs by the "Food and Drug Administration". Such is the case of IDH inhibitors (ivosidenib for IDH1 and enasidenib for IDH2) approved in 2017 for adult patients with refractory AML or azacitidine, a hypomethylating agent and DNMT3A inhibitor approved in September 2020 for the continuous treatment of adult patients with AML who achieved first complete remission; however, the role of these users with respect to diagnosis and whether they can become independent markers of prognosis on their own is still under investigation.

Keywords: PCR, Allele specific, Methylation, Epigenetics, Prognosis.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Leucemia mieloide aguda (LMA)

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una forma de neoplasia maligna que se caracteriza por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos por la proliferación, clonalidad, diferenciación anormal y ocasionalmente una diferenciación pobre de células del sistema hematopoyético. A pesar de que fue incurable hace 50 años, los casos de LMA ahora son curables en 35 a 40% en los pacientes adultos menores de 60 años de edad y en un 5 a 15% de pacientes mayores de 60 años de edad (Döhner *et al.*, 2010). La LMA es uno de los tipos de leucemia más comunes en adultos. Aun así, los casos de LMA son raros, representando solo un 1% de todos los cánceres en Estados Unidos de América. La LMA es una enfermedad generalmente de personas de edad avanzada y es raro que se presente antes de los 45 años. Se ha establecido que el promedio de edad en las personas que han sido diagnosticadas con LMA es de 68 años; sin embargo, existen casos reportados de LMA en niños por lo cual existe la posibilidad de padecer LMA en edad temprana. La LMA es ligeramente más común en hombres que en mujeres. Según los nuevos datos de la sociedad americana del cáncer estimaron que para 2019 los casos nuevos de leucemia en Estados Unidos de América fueron alrededor de 61,780 y 22,840 de ellos fueron mortales según la American Cancer Society. En México, no se cuenta con información confiable respecto de esta enfermedad; la incidencia, la prevalencia y la mortalidad son datos que no se pueden considerar exactos, aunque se han realizado diferentes esfuerzos locales o regionales para obtener información epidemiológica (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014). El perfil epidemiológico de los tumores malignos en México, publicado en 2011, registra 2495 casos de leucemia mieloide de 2004 a 2006, para el año 2008 hubo 4,338 egresos hospitalarios, de los que 2896 fueron específicamente por LMA. De acuerdo con la información de egresos hospitalarios del sector salud publicada en las bases de datos de 2011 a 2015, hubo 16,291 egresos por LMA, de los que 52% fueron hombres y 48% mujeres, mientras que 68.9% fueron adultos y 31.1% correspondieron a menores de 17 años de edad. El 10.5% de los egresos se debió a defunción y 84.5% a curación o mejoría según la Secretaría de Salud en México. A pesar de que los avances en los tratamientos de LMA han dejado un significativo mejoramiento en los resultados de pacientes jóvenes, el pronóstico de los pacientes de edad avanzada los cuales se reportan como mayoría de los nuevos casos, permanece débil (Shah *et al.*, 2013). Incluso con los tratamientos de hoy en día, el 70% de los pacientes de 65 años de edad morirán dentro del 1 año del diagnóstico (Meyers *et al.*, 2013).

En esta neoplasia existe un desorden clonal de las células madre hematopoyéticas (Hematopoietic Stem Cells, HSC) caracterizado por la inhibición de la diferenciación y la subsecuente acumulación de células en varios estadios de incompleta maduración (blastos) y la reducción de la producción de las células sanas de los elementos hematopoyéticos, estas

citopenias causan manifestaciones clínicas como los síntomas de anemia (fatiga), neutropenia (infecciones) y la trombocitopenia (hemorragia), los cuales están generalmente presentes en el momento del diagnóstico y son dominantes durante el tratamiento. Durante la progresión leucémica, los blastos de LMA ocupan y probablemente alteran el nicho donde las células madre hematopoyéticas residen (Morrison *et al.*, 2014). Si la cantidad de blastos en la médula ósea es de 20%, como mínimo, se considera diagnóstico de LMA (Arber *et al.*, 2016). Morfológicamente hablando, los blastos de LMA varían en el tamaño, son ligeramente más grandes que los linfocitos, presentan bastones de Auer y el núcleo es grande; generalmente contienen varios nucléolos. Los blastos de LMA expresan antígenos que también son expresados en las células mieloides sanas inmaduras, incluyendo marcadores de diferenciación CD13, CD33 y CD34 (Campos *et al.*, 1989). En raras ocasiones, los blastos pueden exhibir características morfológicas e inmunofenotípicas de células mieloides y linfoides, lo que dificulta su clasificación como de origen mieloide o linfoide. Estos casos se clasifican como leucemia fenotípica mixta y por lo general son de peor pronóstico (Wolach *et al.*, 2015). Las categorías de clasificación de la LMA pueden estar basadas en 3 factores, por ejemplo, si existe historial de tratamiento, antecedentes de neoplasias hematológicas (LMA secundaria, por ejemplo, síndrome mielodisplásico o neoplasias mieloproliferativas) o si se desarrolla cuando no existe ningún antecedente previo de LMA (LMA de novo). Los factores de riesgo pueden ser síndromes familiares como síndrome de Down, desórdenes genéticos, ambiental o por exposición a radiación con fines terapéuticos y no terapéuticos, así como por agentes quimioterapéuticos antineoplásicos como los agentes alquilantes (Deschler *et al.*, 2006). Uno de ellos son los inhibidores de la topoisomera II que están estrechamente relacionados con la LMA con translocación 11q.23 (Pendleton *et al.*, 2014). Sin embargo, las alteraciones genéticas son las principales causas, algunas de ellas son las anormalidades cromosómicas por ejemplo las translocaciones t(8;21), t(15;17) y la inversión del cromosoma 16, todas ellas asociadas a un buen pronóstico (Döhner, *et al.*, 2015); alrededor de 40% - 50% de todos los casos de LMA son citogenéticamente normales (LMA-CN) (Gaidzik *et al.*, 2008) y las mutaciones son identificadas en más del 97% de los casos (Patel *et al.*, 2012). Las anormalidades moleculares encontradas en LMA-CN se encuentran en genes específicos que afectan genes con diferentes funciones que van desde proteínas con funciones de señalización, regulación de la transcripción y epigenéticas.

1.2 Clasificación de la leucemia mieloide aguda por la Organización Mundial de la Salud

En el 2001, como parte de un esfuerzo de integrar los avances realizados en el diagnóstico y manejo LMA, la organización mundial de la salud (OMS) introdujo un nuevo sistema de clasificación seguido por una versión revisada en el 2008. Los conceptos que subyacen a esta clasificación se derivaron de numerosos estudios clínicos y científicos publicados y de la experiencia de más de 100 patólogos, clínicos y científicos de todo el mundo que colaboraron para desarrollar esta clasificación por consenso (Harris, *et al.*, 1997). Después, en 2016 se publica una nueva versión de la clasificación de la LMA que se distinguía por incorporar información genética junto con la morfología, inmunofenotipo y presentación clínica para definir seis entidades principales de la enfermedad: LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con características relacionadas con la mielodisplasia, LMA relacionada con la terapia, LMA no especificado de otra manera, sarcoma mieloide y proliferación mieloide relacionada con el síndrome de Down (Arber, *et al.*, 2016).

1.2.1 Leucemia mieloide aguda con recurrentes anormalidades genéticas

Entre los casos de LMA con anomalías genéticas recurrentes, 11 son los subtipos que se delinean de acuerdo con distintas translocaciones cromosómicas. Además, las entidades como NPM1 mutado y LMA con CEBPA mutado fueron introducidas como parte de la revisión de 2008 (Vardiman, *et al.*, 2009), posteriormente se introdujo LMA con BCR-ABL1 positivo y LMA con RUNX1 mutado en la revisión del 2016 (Arber, *et al.*, 2016).

Tabla 1: Leucemia mieloide aguda (LMA) con recurrentes anormalidades genéticas

- LMA con t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
- LMA con PML-RARA
- LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
- LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- LMA (Megacarioblastica) con t(1;22) (p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
- LMA con BCR-ABL1 (Entidad provisional)
- LMA con mutación en NPM1
- LMA con mutaciones bialélicas de CEBPA
- LMA con mutación en RUNX1 (Entidad provisional)

1.3 Origen de la leucemia mieloide aguda

Los trabajos pioneros realizados por Janet Rowley establecieron que la leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad genética, a través del descubrimiento de anormalidades cromosómicas somáticas como las translocaciones t(8;21) y t(15;17) en las células leucémicas de algunos pacientes (Rowley *et al.*, 1973). El cambio de una célula normal a una célula maligna requiere de la adquisición de múltiples mutaciones somáticas que colectivamente forman parte del fenotipo maligno (Grove *et al.*, 2014). Los genomas del cáncer son genéticamente heterogéneos y esto es más probable que refleje heterogeneidad a nivel de las células madre leucémicas (Leukemic stem cell, LSC) (Figura 1). Las HSC normales, al igual que otras células madre, están indiferenciadas a lo largo de su vida. Adicionalmente, las células madre hematopoyéticas pueden sufrir auto-renovación (expansión clonal) o diferenciación (extinción clónica) división simétrica. En promedio, se cree que las HSC humanas se dividen una vez cada 40 semanas (Catlin *et al.*, 2011). La patogénesis molecular de LMA no ha sido completamente definida. Las recurrentes variaciones en las estructuras cromosómicas (ej., t(15;17), t(8;21), inv(16), t(9;21), t(9;11), del5, del7, etc.) están establecidas como diagnósticas y marcadores pronósticos, sugiriendo que la adquisición de anormalidades genéticas juegan un papel esencial en la transformación leucémica; sin embargo, alrededor del 50% de los casos de LMA aguda tienen un cariotipo normal (CN) y muchas de esas anormalidades estructurales ausentes (Bullinger *et al.*, 2010; Suela *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2009). Los análisis de secuenciación dirigida han identificado mutaciones severas que proveen información diagnóstica y pronóstica, incluidas mutaciones en FLT3, NPM1, CEBPA y TET2 (Bacher *et al.*, 2010). El advenimiento de la secuenciación masiva permitió el descubrimiento de mutaciones recurrentes en DNMT3A (Ley *et al.*, 2010) e IDH1 (Mardis *et al.*, 2009). A pesar de esos esfuerzos, más del 25% de pacientes con LMA no tienen mutaciones en un gen conocido asociado a leucemia (Shen *et al.*, 2011).

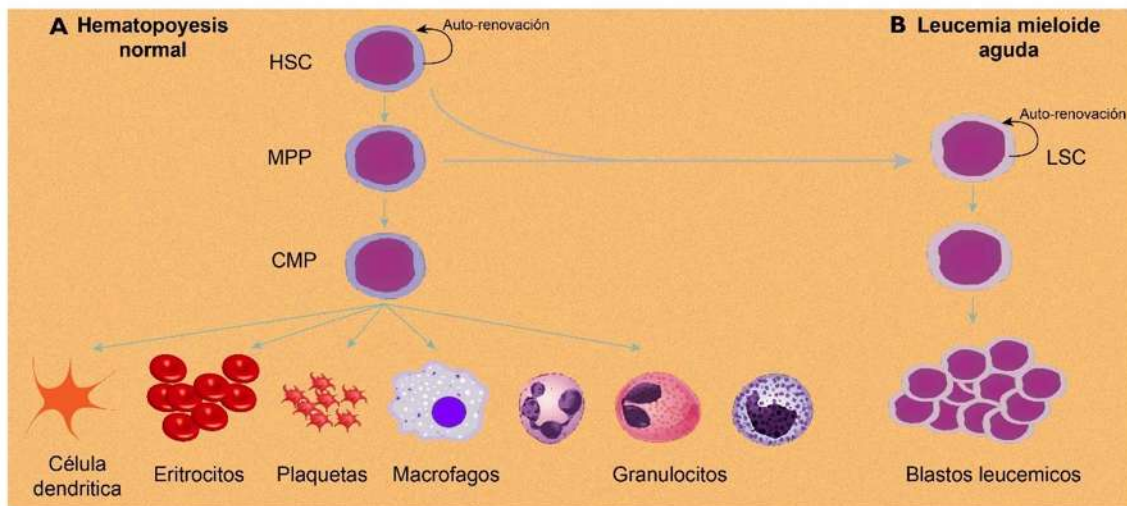


Figura 1. Hematopoyesis normal y generación de blastos mieloides leucémicos. (A) Las HSC de auto renovación residen en la parte superior de la jerarquía, dando lugar a progenitores multipotentes que a su vez dan lugar a progenitores comprometidos con el linaje que eventualmente producen células sanguíneas diferenciadas terminalmente. **(B)** La LMA está organizada como una jerarquía iniciada por células madre de leucemia autorrenovadoras que dan lugar a progenitores leucémicos, que a su vez dan lugar a estadios de leucemia. HSC: Hematopoietic stem cells, MPP: Multi-Potent Progenitor, CMP: Common myeloid progenitor, LSC: Leukemic stem cells. (Tomado y adaptado de Thomas & Majeti 2017).

1.4 Panorama genético de la leucemia mieloide aguda

El cambio de una célula normal a una célula maligna requiere de la adquisición de múltiples mutaciones somáticas que colectivamente forman parte del fenotipo maligno (Grove *et al.*, 2014). Las HSC normales, al igual que otras células madre, están indiferenciadas a lo largo de su vida. Adicionalmente, las células madre hematopoyéticas pueden sufrir autorrenovación (expansión clonal) o diferenciación (Pina *et al.*, 2007). La patogénesis molecular no ha sido completamente definida. Alrededor del 50% de los casos de leucemia mieloide aguda tienen un cariotipo normal y muchas de esas anormalidades estructurales ausentes (Bullinger *et al.*, 2010). Los análisis de secuenciación dirigida han identificado mutaciones severas que provén información diagnóstica y pronóstica, incluidas mutaciones en RUNX1, CEBPA y NPM1 (Papaemmanuil *et al.*, 2016; Ley *et al.*, 2013). Las tres mutaciones principales son en FLT3, NPM1 y DNMT3A, que se encuentran especialmente en la LMA *de novo* con cariotipo normal; sin embargo, algunos otros genes, como SRSF2, SF3B1, U2AF1 o BCOR, a menudo se encuentran mutados en leucemia mieloide aguda secundaria. Aunado a esto, las mutaciones en TP53, las cuales casi siempre son asociadas con un cariotipo complejo, se encuentran principalmente en leucemia mieloide aguda relacionada con la terapia. Se ha demostrado que algunas mutaciones (por ejemplo, en los genes DNMT3A, TET2 y ASXL1) aparecen años antes del diagnóstico (Genovese, *et al.*, 2014). Estas mutaciones se caracterizan por ser los primeros eventos dentro de la "hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (siglas en inglés CHIP)" caracterizada por la expansión clonal de células que portan estas mutaciones las cuales ocurren en personas sanas y su incidencia aumenta con la edad, estas mutaciones se asocian con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades hematológicas malignas (Jaiswal, *et al.*, 2014). Por lo tanto, se consideran eventos preleucémicos que inician la enfermedad. Se ha demostrado que persisten en la reincidencia y en la remisión completa y que proporcionan una ventaja selectiva multilinaje sobre las células madre y progenitoras hematopoyéticas normales *in vivo* (Hirsch, *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos de LMA, las mutaciones no se encuentran de forma aislada, sino que están asociadas con otras mutaciones recurrentes o con anomalías citogenéticas. Inicialmente, los análisis genéticos se centraban en LMA con cariotipo normal pero recientemente se han expandido para incluir todos los tipos y evaluar los cambios genéticos, así como epigenéticos (Ley, *et al.*, 2013). Anteriormente las mutaciones fueron agrupadas como de clase I (segundos eventos en la leucemogénesis), las cuales proveen ventajas de proliferación o supervivencia celular y son marcadores de pronóstico, por ejemplo, FLT3 y RAS. Las de clase II (primeros eventos en la leucemogénesis) que alteran la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos y la apoptosis. Además, las mutaciones en CEBPA, RUNX1, y probablemente NPM1 son mutaciones de tipo II. En el caso de las translocaciones y mutaciones de clase II definen entidades clinicopatológicas específicas en la clasificación de la OMS. Ahora se entiende, que hay más de dos clases de mutaciones en LMA (Ley, *et al.*, 2013), de las cuales la mayoría son mutaciones

cooperadoras (Ohgami, *et al.*, 2015). Estas observaciones indican que estas mutaciones no clasificadas pueden caer en varias subcategorías que van desde mutaciones que afectan a reguladores de la metilación del DNA, el splicing, remodeladores de la cromatina (Figura 2). Del mismo modo, estas mutaciones no clasificadas tienen una alta concurrencia, tal es el caso de las mutaciones entre DNMT3A y NPM1, así como con IDH1/2 (Boissel, *et al.*, 2010). Las mutaciones en DNMT3A y NPM1 coexisten tanto con las mutaciones de clase I como con las de clase II, por lo tanto, estas mutaciones pueden no clasificarse simplemente en mutaciones "clásicas" de clase I o clase II, sino que caerían en nueva categoría de mutaciones, todo esto con la propiedad de tener un potencial informativo de carácter pronóstico.

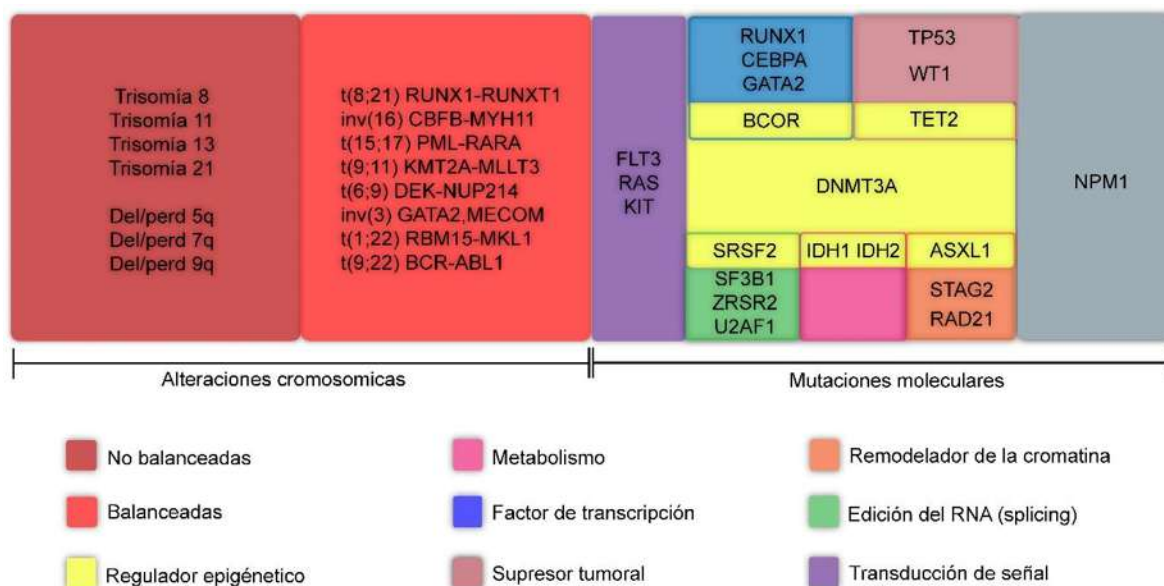
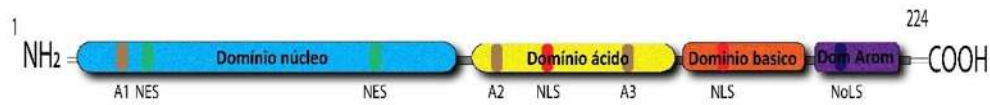


Figura 2. Heterogeneidad genética en LMA. Los múltiples análisis de secuenciación masiva en casos de leucemia mieloide aguda permitieron desvelar un gran número de genes significativamente mutados, además de las recurrentes anormalidades cromosómicas descritas por la OMS, los cuales forman parte del fenotipo maligno ya sea como mutaciones iniciales o conductoras en el desarrollo leucemógeno.

1.5 Mutaciones en el gen NPM1 en casos de leucemia mieloide aguda

NPM1 (Nucleofosmina 1), anteriormente conocida como B23 o numatrina es una proteína nucleolar abundante en el núcleo de células en proliferación. NPM1 en el genoma humano está localizada en el 5q35, compuesta por 12 exones que codifican para dos isoformas; NPM1.1 que corresponde a la proteína de tamaño completo con 224 aminoácidos como se muestra en la figura 3 (Choi et al 2008). El gen NPM1 en el cromosoma 5q35.1 codifica una molécula chaperona, transportando moléculas desde el núcleo al citoplasma; Además, desempeña muchos otros roles, incluidos Biogénesis del ribosoma, duplicación y regulación del centrosoma. de la vía supresora de tumores ARF-TP53 (Noguera *et al.*, 2005 Haferlach *et al.*, 2009). NPM1 se sobre expresa con frecuencia en múltiples neoplasias, incluidos cánceres de estómago, colon, ovario, vejiga y próstata (Grisendi *et al.*, 2006). En el año 2005 Falini et al. descubrieron que las mutaciones de NPM1 son relativamente frecuentes en la LMA (Falini *et al.*, 2005). Estas mutaciones se encuentran casi exclusivamente en el exón 12, y hasta la fecha solo se han identificado en neoplasias mieloides, pero no en ningún otro tumor. A menudo consisten en inserciones o duplicaciones de 4 pb entre los nucleótidos 960 y 961. Causan el reemplazo de los últimos siete aminoácidos (WQWRKSL) con 11 residuos diferentes. Las mutaciones de tipo A, detectadas en el 80% de los casos, implican la duplicación de "TCTG" (nucleótidos 956 a 959), lo que crea una inserción en la posición 960. Los tipos B y D son el segundo y el tercero que ocurren con mayor frecuencia, seguidos de algunas otras mutaciones raras. Todas estas mutaciones afectan a Trp-289 y Trp-290 donde reside NoLS, lo que conduce a una localización citoplásmica de la proteína. El NPM1 citoplásmico (NPM1c) solo se detecta en la LMA con el gen mutado en NPM1 (NPM1c), y no hay mutaciones de NPM1 con NPM1 en el nucleolo. Las mutaciones de NPM1 son exclusivamente heterocigotas, lo que implica que NPM1c es capaz de formar un dímero con NPM1wt, reclutarlo en el citoplasma y perturbar su función normal (Grisendi et al., 2006). Alrededor del 15% de LMA con NPM1 mutado muestran aberraciones cromosómicas que incluyen +8 y del (9q) (Noguera et al 2005). La LMA con NPM1 mutado tiene una predominancia en mujeres y es el marcador que se encuentra en más del 50% de los casos con cariotipo normal. Estas mutaciones que afectan a este gen son determinadas mediante PCR, sin embargo, en algunos casos se emplea la inmunohistoquímica y se detecta en el núcleo. Los casos con positivos para NPM1 son clasificados con pronóstico favorable sin embargo hasta el 40% de los casos frecuentemente se asocian mutaciones en FLT3 y reguladores de la metilación del DNA (DNMT3A e IDH1/2). La presencia de estas mutaciones parece anular el efecto y por eso se han de identificar estas mutaciones. (Ley *et al.*, 2013). En adultos, morfológicamente estos casos muestran diferenciación monocítica, entre los casos que no presentan esta morfología, se encuentran los que presentan invaginaciones nucleares (en ingles conocido como cup-like)

A NPM1 proteína



B NPM1 Mutaciones

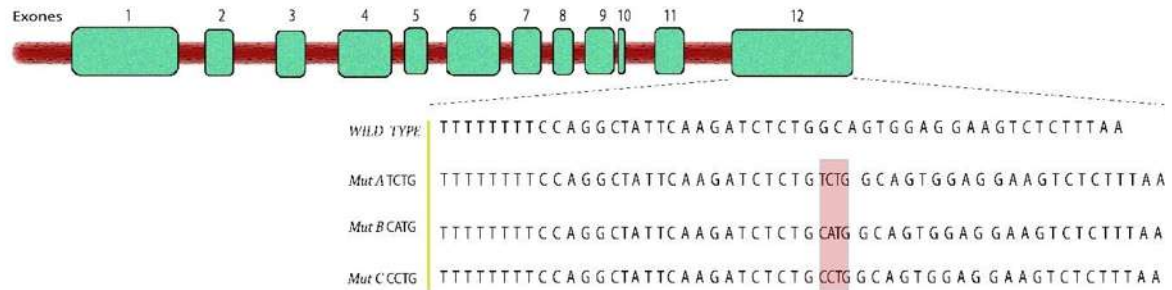


Figura 3. Localización de las mutaciones más frecuentes en NPM1. **A.** Se muestran los 4 grandes dominios núcleo, ácido, básico y aromático. El dominio núcleo contiene dos motivos de señales de exportación nuclear (NES). La región central contiene dos regiones ácidas que abarcan una señal de localización nuclear bipartita (NLS). El NLS también se encuentra en el dominio C-terminal, junto con una región aromática en el extremo, formando la señal de localización nucleolar (NoLS). **B.** Todas las mutaciones de NPM1 en los casos de LMA (rojo) ocurren en el exón 12 y estas son resultado de una inserción neta de cuatro pares de bases. Las tres mutaciones más comunes (tipos A, B y C) se contabilizan en el 90% de los casos.

1.6 Mutaciones en el gen DNMT3A en leucemia mieloide aguda.

Las mutaciones en DNMT3A fueron descritas en 2010 cuando una serie de mutaciones de tipo Missense (Mutaciones de sentido erróneo), Frameshift (Mutaciones con desplazamiento del marco de lectura), Nonsense (Mutaciones sin sentido) y Splice-site (Mutaciones en el sitio de empalme) que afectaban DNMT3A fueron identificadas en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) (Figura 4). La secuenciación de exoma en muestras de LMA primaria ha identificado mutaciones somáticas en DNMT3A en más de un 30% de los casos de LMA-CN (Ley, *et al.*, 2010). Independientemente del número de pacientes, la mayoría de mutaciones en DNMT3A han sido encontradas en el dominio Mtase (Dominio metil transferasa), con una vasta cantidad de mutaciones de tipo Missense en el codón R882 (65% de todas las mutaciones en DNMT3A), más frecuentemente la mutación R882H en un residuo de arginina (Arg882) por una histidina (Ley *et al.*, 2010, Roller *et al.*, 2013). Mecanicamente, la homo-tetramerización de DNMT3A es requerida para ejercer sus propiedades catalíticas (Holz-Schietinger *et al.*, 2011) en base a esto Russler-Germain *et al* y demás autores reportaron que la mutación DNMT3^{R882} muestra un efecto dominante-negativo previniendo la formación de homo-tetrámeros activos por la interacción con DNMT3^{WT} y la subsecuente formación de heterodímeros, para lo cual se encontró una disminución al 29% (tipo nativo) de la actividad catalítica (Russler-Germain *et al.*, 2014). Esto explicaría la dramática reducción de la actividad metiltransferasa de DNMT3A, la cual se observa como una extendida hipometilación del DNA en CpG específicos de pacientes con mutación DNMT3^{R882}. En contraste la hipermetilación focal, la cual también se observa en muestras de DNMT3A mutante, no pueden ser explicadas por este modelo (Ley *et al.*, 2010, Russler-Germain *et al.*, 2014). Por su parte Emperle, *et al* 2018 reportaron un resultado que no concuerda con Russler-Germain *et al*, 2014 ya que la actividad catalítica no disminuye al formar tetrámeros de DNMT3^{R882} con DNMT3^{WT} sin embargo hay una gran cantidad de reportes de que la mutación DNMT3^{R882} resulta en cambios en la metilación del DNA proponiendo que el comportamiento negativo de las mutaciones en DNMT3A podría ser explicado por otros mecanismos no relacionados con la directa inhibición de las subunidades Wild-Type en heterocomplejos (Emperle *et al.*, 2018). A través de la investigación de células sanguíneas en pacientes con el síndrome de Tatton-Brown-Rahman que portan la mutación DNMT3^{R882} de manera constitutiva, se demostró que la mayoría de cambios fueron eventos de hipometilación. Este estudio sugiere que la hipermetilación observada en LMA con DNMT3^{R882} es un evento secundario (Spencer *et al.*, 2017), incluso la observación de algunas de lesiones como TET2 y DNMT3A en sangre de individuos hematológicamente normales apoyan la teoría de que estas mutaciones son iniciadoras (Laurie *et al.*, 2012).

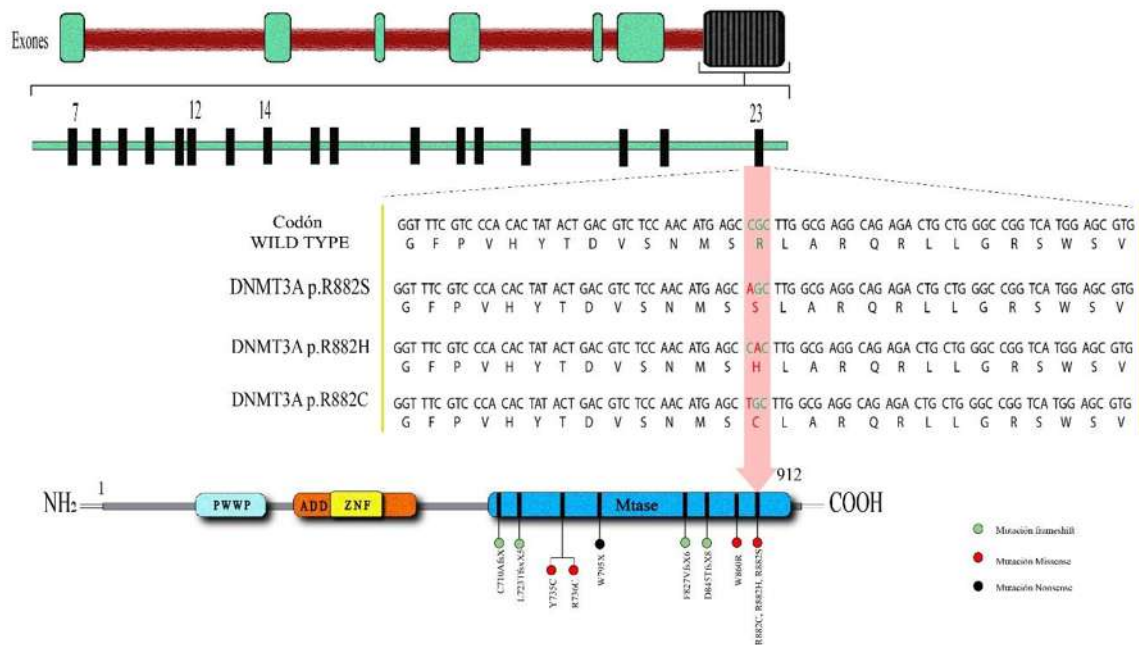


Figura 4. Localización de las mutaciones más frecuentes en DNMT3A. Se muestran los 23 exones del gen y las mutaciones mas frecuentes asociadas a leucemia mieloide aguda dentro del exon 23, el cambio de aminoacido en el codon CGC que codifica para arginina de la posición 882 (R882) por serina, histidina y cisteina.

1.7 Mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 en leucemia mieloide aguda

En 2009, la secuenciación completa del genoma en un paciente con leucemia mieloide aguda identifico la mutación IDH1^{R132} (Mardis, *et al.*, 2009). Análisis subsecuentes en una muestra de pacientes con LMA confirmaron la presencia de mutaciones en IDH1 y también se identificaron mutaciones en IDH2 en aproximadamente 20% de pacientes en LMA-CN (Mardis, *et al.*, 2009). Las mutaciones en IDH1 están presentes hasta en 7-14% de los pacientes con LMA (Platt, *et al.*, 2015). Los pacientes con mutaciones IDH1/2 son candidatos para terapias dirigidas como los inhibidores de IDH1^{mut} (ivosidenib) o de IDH2^{mut} (enasidenib), han mostrado resultados prometedores en pacientes con LMA o síndrome mielodisplásico. Se ha demostrado que estas moléculas inducen la diferenciación de células leucémicas primarias *in vitro* (Chaturvedi, *et al.*, 2013) e *in vivo* para promover respuestas clínicas. La LMA y una variedad de neoplasias muestran recurrentes mutaciones de tipo missense en IDH1 e IDH2, lo que provoca que IDH1^{mut} e IDH2^{mut} sinteticen 2-hidroxioglutarato (2-HG) en vez de α KG (Losman, *et al.*, 2013). El Oncometabolito 2-HG es

un inhibidor competitivo del α KG lo cual produce una inhibición de las proteínas dioxigenasas, incluida la familia TET. En LMA se sugiere que las mutaciones en TET2 e IDH1/2 son mutuamente excluyentes, por lo que las dos mutaciones podrían actuar en la misma vía (Figuerola, *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Normalmente ambas proteínas, IDH1 citosólica e IDH2 mitocondrial existen como homodímeros dentro de su respectivo compartimento celular y las proteínas mutadas retienen la habilidad de unirse con respectiva compañera wild-type. Todos los reportes de las mutaciones de IDH han sido de tipo heterocigoto, con las células cancerígenas conservando una copia Wild-type. Anteriormente, no se había reportado ningún caso en que el mismo paciente tuviera las dos mutaciones, hasta que Paschka *et al* 2013 y Abbas *et al* 2012. reportaron casos de LMA con mutaciones en ambos genes. En LMA, las mutaciones en IDH1/2 resultan en el cambio de aminoácido, ocurriendo primeramente en el residuo R132 en IDH1 y en R140 o en R172 en IDH2 (Chou, *et al.*, 2011) (Figuras 5 y 6). Algunos autores apoyan la noción de que las mutaciones R140 o en R172 en IDH2 pueden ser mutuamente excluyentes y han reforzado la idea de que la mutación del codón 140 IDH2 y el codón 172, tienen consecuencias fisiopatológicas distintas (Marcucci, *et al.*, 2010) (Patel, *et al.*, 2017). El bloqueo del α -KG y la presencia del inhibidor competitivo 2-HG en células que expresan IDH1^{mut} e IDH2^{mut} atenúan la actividad de TET2. Se ha demostrado que la pérdida de la función de TET2 e IDH1^{mut} e IDH2^{mut} están asociadas con defectos epigenéticos similares y la expresión de las proteínas IDH1^{mut} e IDH2^{mut} produce una actividad ineficiente de la función catalítica de TET2 en las células. Adicionalmente la expresión de las proteínas IDH1^{mut} e IDH2^{mut} o TET2^{mut} perjudica la diferenciación mieloide e incrementa la expresión de marcadores de las células madre progenitoras, sugiriendo que el papel de esas mutaciones en la LMA es bloqueador. El codón R132 en IDH1 y el residuo R172 en IDH2 son homólogos. (Figuerola, *et al.*, 2010).

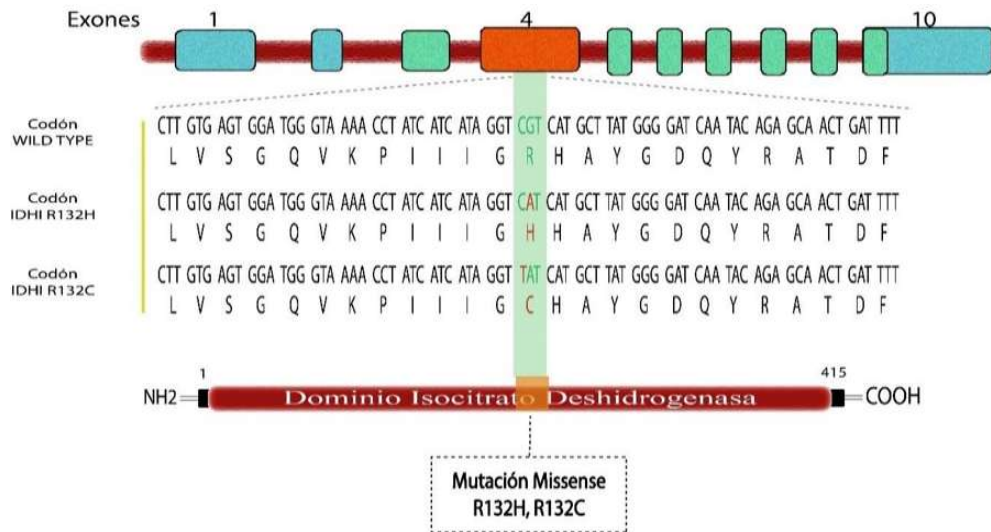


Figura 5. Localización de las mutaciones más frecuentes en IDH1. Se muestran los 10 exones del gen y las mutaciones más frecuentes asociadas a leucemia mieloide aguda dentro del exón 4, el cambio de aminoácido (Dentro de la banda verde) en el codón 132 CGT (cambio de arginina por histidina o cisteína).

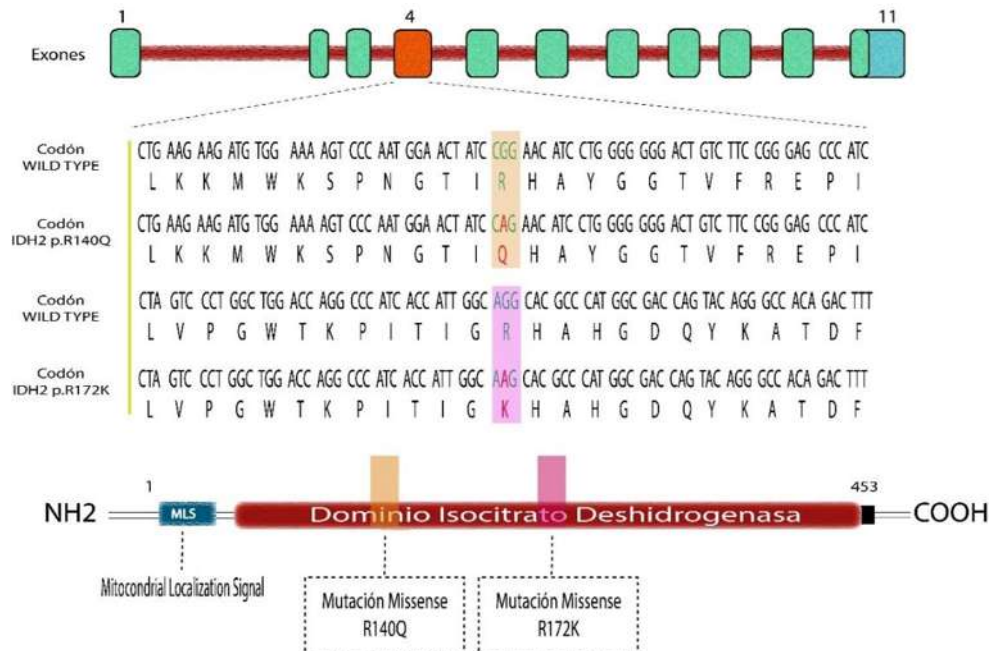


Figura 6. Localización de las mutaciones más frecuentes en IDH2. Se muestran los 11 exones del gen y las mutaciones más frecuentes asociadas a leucemia mieloide aguda dentro del exón 4, el cambio de aminoácido en los codones CCG donde cambia el aminoácido arginina por glutamina y AGG donde cambia el aminoácido arginina por lisina marcados por los colores naranja y rosa respectivamente.

1.8 Tratamiento convencional y específico con inhibidores de NPM1, IDH y DNMT3A mutante en leucemia mieloide aguda

Hace diez años, el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) recién diagnosticada era prácticamente invariable. Los pacientes recibían daunorrubicina o idarrubicina durante 3 días y citarabina a una dosis de 100 mg / m² al día durante 7 días como infusión continua, un régimen comúnmente conocido como “3 + 7”. Afortunadamente, el avance de tecnologías moleculares sofisticadas durante los últimos 25 años ha proporcionado conocimientos fundamentales sobre la patogénesis y la fisiopatología de la LMA. Esta caracterización molecular continúa ampliando nuestra comprensión de la biología de la LMA, los patrones mutacionales que determinan la heterogeneidad de la enfermedad en el momento del diagnóstico y la recaída, así como los múltiples factores que contribuyen a la falta de respuesta al tratamiento. Además, la clasificación mutacional descriptiva ha proporcionado una plantilla para el desarrollo de estrategias para apuntar a moléculas y vías clave de manera selectiva, lo que lleva al desarrollo de múltiples terapias dirigidas para el tratamiento de la LMA. Quizás debido al tiempo necesario para incorporar una mejor comprensión de los fundamentos moleculares de la enfermedad, las opciones de tratamiento para la LMA han sido limitadas durante las últimas cinco décadas. Una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes al efecto oncogénico de NPM1 ha dado lugar a múltiples estrategias terapéuticas innovadoras y prometedoras, por ejemplo, la combinación de ácido todo-trans-retinoico (ATRA) y trióxido de arsénico (ATO), un tratamiento curativo para la leucemia promielocítica aguda, conduce a la degradación de NPM1, induciendo apoptosis y diferenciación celular en células mutadas en NPM1 (Martelli *et al.*, 2015). También se ha descrito que los pacientes adultos en buen estado físico menores a 60 años con NPM1 mutado se tratan con quimioterapia intensiva, ya que estas células generalmente expresan niveles altos de CD33 que se puede tratar con gemtuzumab ozogamicina (Castaigne *et al.*, 2019). Además, existen numerosas terapias dirigidas y o específicas de mutaciones presentes en las clonas leucémicas; por ejemplo, la midostaurina es el único inhibidor de FLT3 que, hasta la fecha, ha demostrado un beneficio de supervivencia general en combinación con quimioterapia de inducción (Mandrekar *et al.*, 2017). Sin embargo, en años recientes IDH mutante se ha convertido en un objetivo viable en el tratamiento de la LMA. Tales mutaciones ocurren en blastos de aproximadamente el 20% de los pacientes con LMA [IDH1 (8%) e IDH2 (12%)]. Los agentes orales ivosidenib y enasidenib, inhibidores de IDH1 e IDH2 mutantes, respectivamente, disminuyen el 2-hidroxiglutarato celular en más del 90%, reduciendo así la hipermetilación de histonas y restableciendo la diferenciación mieloide (Stein *et al.*, 2015). En un estudio de fase I / II, los pacientes con LMA refractaria / recidivante mutada en IDH2 fueron tratados con 100 mg diarios de enasidenib, lo que resultó en una tasa de respuesta general del 40,3% con una mediana de supervivencia promedio de 9.3 meses; el 19,3% que logró una remisión completa tuvo una supervivencia promedio de 19.7 meses. De

manera similar, el estudio de fase I / II de ivosidenib en LMA con IDH1 mostró una mejoría considerable en cuanto a la supervivencia promedio (Winer *et al.*, 2019).

1.9 Pronostico de la leucemia mieloide aguda

A pesar de que un 70% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) consiguen morfológicamente una completa remisión (blastos en medula ósea <5%, ausencia de blastos con bastones de Auer, ausencia de enfermedad extramedular, conteo absoluto de neutrófilos $>1.0 \times 10^9/L$ (1000/uL), conteo plaquetario $>100 \times 10^9/L$ (100,000/uL), independencia de transfusión de células rojas, Dohner *et al.*, 2009) con una intensiva inducción de quimioterapia (siglas en ingles IIC), aproximadamente 50% de esos pacientes experimentaran una reincidencia (Walter *et al.*, 2015). Para establecer y aconsejar a los pacientes acerca del pronóstico de LMA, se debe tener en cuenta una gama creciente y bastante desconcertante de variables clínicas y biológicas por ejemplo la edad y el estado del paciente, la carga tumoral, LMA secundaria entre otros. En el caso de los resultados de laboratorio como el análisis citogenético y los marcadores moleculares, el conteo total de leucocitos y el conteo total de células sanguíneas que tienen relevancia en el pronóstico incluso los niveles séricos de ácido úrico y de lactato deshidrogenasa podrían tener en pacientes con LMA (Yamauchi *et al.*, 2013; Ferrara *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2011). El cariotipo de los blastos leucémicos determinado por el análisis de bandeo cromosómico es aceptado como el más importante parámetro de pronóstico de la LMA. El subconjunto de entidades citogenéticas favorables incluye los casos con PML-RARA, los pacientes con t(8;21) y pacientes con inv(16) (las cuales son llamadas leucemias CBF por sus siglas en inglés Core Binding Factor) que están asociadas con un pronóstico favorable. Del otro lado, las alteraciones con cariotipos complejos 5/5q, 7/7q, 17/abn17p, inv (3) (q21q26) / t (3; 3) (q21; q26) también son asociados con un pronóstico desfavorable y los pacientes con LMA-CN que muestran una alta heterogeneidad genética, son clasificados como riesgo intermedio (Grimwade *et al.*, 2010). Durante la pasada década, se demostró que LMA-CN incluía una gran cantidad de anormalidades moleculares con diferentes comportamientos de riesgo (Dohner, *et al.*, 2017). El impacto pronóstico de muchos marcadores depende del contexto y el efecto de una anomalía dada por la presencia o ausencia de otro (Papaemmanuil, *et al.*, 2016), además, el uso de modernas tecnologías tales como WGS o WES en una variedad de genes como IDH1, IDH2, DNMT3A, TET2 fueron descritos en pacientes con LMA (Grossmann *et al.*, 2011; Ley *et al.*, 2010). Adicionalmente a esto se ha desarrollado modelos de clasificación pronóstica combinando los hallazgos citogenético y los biomarcadores moleculares genéticos (Dohner *et al.*, 2010), por ejemplo las mutaciones en NPM1 que son de pronóstico favorable en la ausencia de mutaciones en FLT3-ITD (Verhaak *et al.*, 2005), las mutaciones en TP53 que son asociadas con los cariotipos complejos, cariotipos monosomales y específicas aneuploidías cromosómicas (ej, 25/5q2, 27/7q2), que predicen un muy desfavorable resultado (Haferlach *et al.*, 2008; Bowen, *et al.*, 2009), sin embargo

ambos tipos de LMA-CBF están asociadas con mutaciones en genes que codifican para proteínas señalizadores (NRAS, KIT, NF1, FLT3, KRAS), en LMA con t(8;21), la presencia de mutaciones en KIT, especialmente en niveles altos de KIT mutado, aparenta estar asociada con un pronóstico desfavorable (Paschka *et al.*, 2013). En el European Leukemia Net “genetic risk stratification” (Tabla 2), la intención original de las categorías genéticas era estandarizar el informe de anormalidades genéticas particularmente para correlaciones con características clínicas y resultados. La distinción entre las categorías intermedia I e intermedia II se basaron las características genéticas, más que en la estratificación pronóstica. más largo en el grupo intermedio I que el grupo intermedio II, los 2 grupos estaban pronosticados indistinguible en pacientes de edad avanzada, que constituyen la mayoría de casos de LMA. Ante estos hallazgos, el panel decidió simplificar el sistema ELN mediante el uso de una clasificación de 3 grupos (favorable, intermedio, adverso) (Dohner *et al.*, 2017).

Tabla 2. Clasificación del riesgo por anormalidades genéticas de la European Leukemia Net 2017 en casos de leucemia mieloide aguda

Categoría de Riesgo	Anormalidad genética
Favorable	Favorable t(8;21) (q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv (16) (p13.1;q22) o t(16;16) (p13.1;q22); CBFB-MYH11 NPM1 mutado sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD ^{low} CEBPA Bialelico mutado
Intermedio	NPM1 mutado y FLT3-ITD ^{high} Wild-type NPM1 sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD ^{low} (sin lesiones genéticas de riesgo desfavorable) t(9;11) (p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorables o desfavorables
Desfavorable	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A reordenamiento t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11) -5 o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo ^a , cariotipo monosomal ^b Wild-type NPM1 y FLT3-ITD ^{high} RUNX1 mutado* ASXL1 mutado* TP53 mutado

Low: Baja relación alélica (<0.5), High: Alta relación alélica (>0.5)

*: Estos marcadores no deben usarse como marcador de pronóstico adverso si coocurren con subtipos de LMA de riesgo favorable.

A: 3 o más anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de 1 de las translocaciones o inversiones recurrentes designadas por la OMS, es decir, t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); LMA con BCR-ABL1

B: Definido por la presencia de 1 monosomía única (excluida la pérdida de X o Y) en asociación con al menos 1 monosomía adicional o anormalidad estructural.

Tomado de Dohner, *et al.*, 2017

1.10 Valor pronóstico de las mutaciones en NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2 en los casos de leucemia mieloide aguda

Según las recomendaciones de la European LeukemiaNet (ELN) de 2017, 88 mutaciones de NPM1 transmiten un pronóstico relativamente favorable solo si FLT3-ITD está ausente o muestra una relación alélica baja (Tabla 2). El impacto favorable del genotipo NPM1-mutado / FLT3-ITD– parece ser menos evidente en los pacientes de edad avanzada, especialmente en los mayores de 65 años (Ostronoff *et al.*, 2015). En general, las anomalías citogenéticas de riesgo adverso confieren un pronóstico desfavorable a los pacientes con NPM1 favorable. Sin embargo, estos casos deben clasificarse como AML-MRC, de acuerdo con la clasificación de tumores hematopoyéticos de la OMS de 2017. La información de estudios clínicos realizados sugiere que las mutaciones de DNMT3A^{R882} están estrechamente relacionados con una desfavorable supervivencia promedio en pacientes con leucemia mieloide aguda. Otros estudios sugieren que la importancia de DNMT3A^{No-R882} en el pronóstico es similar a los pacientes con DNMT3A^{R882} (Ley *et al.*, 2011; Thol, *et al.*, 2011). Durante la última década se ha asociado la mutación DNMT3A^{R882} como un predictor independiente de pronóstico desfavorable y de resistencia a la inducción de quimioterapia convencional (Yuan *et al.*, 2019), en concordancia con otros estudios que concluyen que las mutaciones en DNMT3A tienen una supervivencia promedio peor sin importar la edad, anormalidades citogenéticas o FLT3-ITD mutado (Ley *et al.*, 2010; Yan, *et al.*, 2011). Como ejemplo, la combinación de las mutaciones en NPM1, FLT-ITD y DNMT3A, que fue recientemente reportado, confiere un riesgo mucho mayor en la reincidencia que los casos de LMA con NPM1 y FLT3-ITD sin la mutación en DNMT3A (Papaemmanuil *et al.*, 2016). El valor pronóstico de las mutaciones IDH1 e IDH2 sigue siendo una cuestión de debate. La relevancia pronóstica y clínica que tienen estas mutaciones en la LMA, ha tenido resultados inconclusos (Metzeler *et al.*, 2016; Papaemmanuil *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017; Dinardo *et al.*, 2015). Probablemente debido a la cantidad de factores y diferencias en las poblaciones de pacientes, metodología de estudio, agrupamiento de las mutaciones para el análisis del pronóstico la influencia de anormalidades genéticas adicionales. En un meta análisis reciente de reportes de pacientes con mutaciones en IDH1, 12747 pacientes fueron asociados con una peor supervivencia promedio. Sin embargo, los pacientes con mutaciones en IDH2 fueron asociados con una favorable supervivencia promedio (Xu *et al.*, 2017). El efecto del pronóstico de las mutaciones IDH1^{R132} y IDH2^{R140} parece estar influenciado por el contexto genético, pacientes con NPM1 – IDH1^{R132} – DNMT3A, así como los pacientes con NPM1 – IDH2^{R140} tienen en promedio resultados favorable, pero aquellos con la mutación IDH1^{R140} tienen un pronóstico significativamente peor (Papaemmanuil, *et al.*, 2016). Las mutaciones de IDH1 e IDH2 acompañadas con FLT3^{mut} no tienen un impacto significativo en el OS de los pacientes (Boddu *et al.*, 2017).

1.11 El papel de las herramientas diagnósticas moleculares en la leucemia mieloide aguda

Como ya se comentó anteriormente el cariotipo convencional es la piedra angular de la estratificación del riesgo en la LMA, lo que da como resultado grupos de pronóstico de riesgo favorable, desfavorable e intermedio. Los pacientes en el grupo de riesgo favorable por lo general responden bien a la consolidación basada en quimioterapia. Por el contrario, los pacientes con una citogenética desfavorable a menudo requieren un alotrasplante de células madre para mejorar el resultado y la supervivencia. Los hallazgos citogenéticos de riesgo intermedio se encuentran en aproximadamente el 50 % de los casos de LMA, y la mayoría tiene un cariotipo normal. El sistema de salud actual enfatiza la eficiencia y el valor. Dado que las pruebas genéticas en la LMA son esenciales, pero a menudo costosas, el desafío para los patólogos, hematólogos y genetistas es garantizar que solo se realicen las pruebas adecuadas y que sean informativas, rentables y clínicamente relevantes sin ser redundantes (Rong *et al* 2015). La reacción en cadena de la polimerasa alelo específico (ASPCR) es una aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de muy bajo costo que permite la detección directa de cualquier mutación puntual en el ADN humano mediante el análisis de los productos de la PCR en un gel de agarosa o poliacrilamida teñido con bromuro de etidio. ASPCR funciona porque un oligonucleótido que forma un desajuste 3' con la plantilla de ADN será refractario a la extensión del cebador por la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. Por lo tanto, los cebadores de oligonucleótidos específicos para todos los alelos conocidos pueden sintetizarse y usarse para detectar los alelos en ADN de genotipo desconocido. ASPCR ya se ha utilizado en técnicas de diagnóstico basadas en ADN que implican el diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas (Ugozzoli *et al* 1991). Actualmente en el mercado existen numerosas herramientas que permiten mejorar la determinación de una mutación; por ejemplo, las secuencias de doble cadena gBlocks. Los fragmentos de genes gBlocks Gene Fragments (Integrated DNA Technologies) son fragmentos de ADN de doble hebra de 125 a 3000 pb de longitud. Son el estándar de la industria para fragmentos de genes de doble hebra, diseñados para una construcción o modificación de genes asequible y fácil, aplicaciones como la investigación de anticuerpos y la edición del genoma mediada por CRISPR, estándares de PCR y qPCR por mencionar algunos ejemplos. Cada fragmento de gen gBlocks pasa por un proceso de control de calidad, que incluye la verificación del tamaño por electroforesis capilar y la identificación de secuencia por espectrometría de masas. Esta rigurosa prueba asegura que la mayoría de las colonias recombinantes obtenidas de la clonación de cada fragmento génico gBlocks contendrán el inserto deseado.

2. JUSTIFICACIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo más común de leucemia aguda en adultos con una tasa de mortalidad del 75% a los 5 años, caracterizada por ser una enfermedad heterogénea genéticamente con recurrentes anormalidades cromosómicas y mutaciones que proveen información clínico patológica y son importantes marcadores de diagnóstico y pronóstico. El diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de la LMA ha cambiado en los últimos 15 años de una enfermedad definida, clasificada y organizada en función de las características histológicas únicamente a una enfermedad clasificada en gran medida según las características genéticas, genómicas y moleculares (de ahí la elaboración de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud). El análisis citogenético de la LMA se ha vuelto esencial para el diagnóstico, la clasificación, la estratificación del pronóstico y la orientación del tratamiento de la enfermedad; sin embargo, cuando una muestra de un paciente con diagnóstico presuntivo de LMA no tiene aberraciones cromosómicas el análisis genético molecular de los marcadores CEBPA, NPM1 y FLT3 es el procedimiento estándar a seguir porque estos también aportan información clínica y terapéutica. Particularmente NPM1 es el marcador más frecuentemente encontrado en los casos con cariotipo normal, en donde más del 50% de estos casos tienen mutaciones, estas mutaciones son fácilmente detectables mediante PCR alelo específico, ya que el 99% de las mutaciones corresponde inserciones de 4 bp. Históricamente es bien sabido que los pacientes con NPM1 mutado y sin mutaciones en FLT3, son de buen pronóstico, ya que responden mejor al tratamiento convencional y tienen una supervivencia promedio a largo plazo. Recientemente se ha descrito que los casos de LMA NPM1 positivos coexisten en gran porcentaje con mutaciones en los genes reguladores de la metilación del DNA (DNMT3A, IDH1, IDH2 y TET2) los cuales han sido asociados con el curso de la enfermedad, respuesta al tratamiento y el pronóstico de los pacientes. En particular DNMT3A, IDH1, IDH2 se caracterizan por tener mutaciones puntuales de un solo nucleótido en más del 70% de los casos, lo característico de estas mutaciones es que existen inhibidores de IDH1 e IDH2 o de DNMT3A con aprobación regulatoria. De esta forma, en este trabajo se analizará el desarrollo de un ensayo basado en técnicas de biología molecular que permita detectar de manera segura y con una buena sensibilidad las mutaciones encontradas con mayor frecuencia los genes NPM1, DNMT3A R882H en el exón 23, R132H en el exón 4 del gen IDH1, y la mutación R140Q en el exón 4 del gen IDH2 en casos de LMA. La información generada se pretende impacte en la importancia de los análisis por biología molecular de la presencia de mutaciones en estos genes, y que su uso en el pronóstico y diagnóstico de estas enfermedades repercuta en el diseño de tratamientos más efectivos y específicos mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

3. HIPÓTESIS

La identificación de las mutaciones de tipo A, B, C y D en NPM1, R882H en DNMT3A, R132H en IDH1, así como R140Q y R172K en IDH2 se puede llevar a cabo a través de una sola prueba basada en la metodología de PCR alelo específica a partir de muestras con diagnóstico de leucemia mieloide aguda

4. OBJETIVO GENERAL

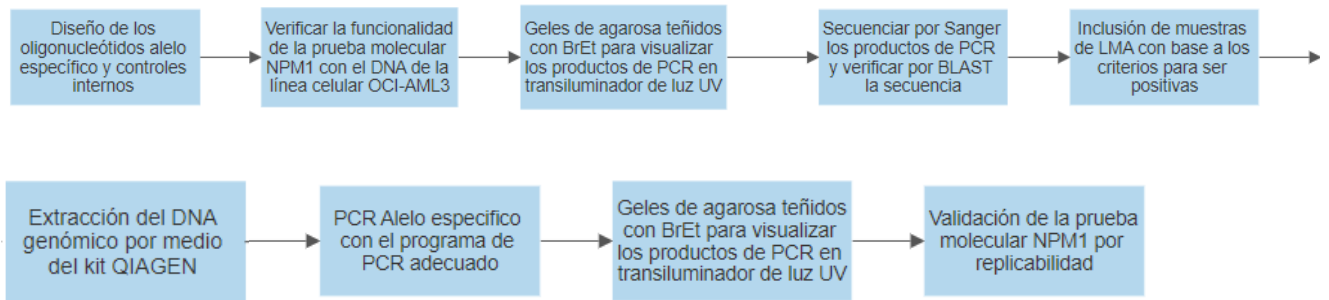
Desarrollar una prueba molecular basadas en PCR alelo específico que permita la identificación de las mutaciones predominantes en los genes NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2 en muestras de leucemia mieloide aguda.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

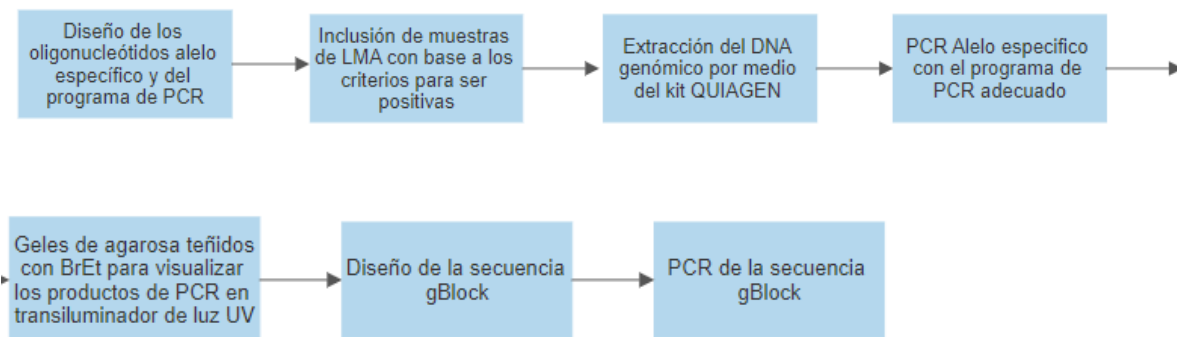
1. Validar la prueba molecular para la detección de las mutaciones en el gen NPM1, apegándose a los criterios establecidos por la Entidad Mexicana de Acreditación para pruebas cualitativas .
2. Ensayar las pruebas moleculares en una población de muestras seleccionadas con las características de ser positivas.
3. Diseñar y evaluar una secuencia de DNA doble cadena (Gblock) para validar la funcionalidad de la prueba molecular DNMT3A-IDH1/2

6. ESTRATEGIA

NPM1



DNMT3A-IDH



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Tipo y clasificación del estudio

Proyecto de investigación original de ciencia básica, en el que se plantea un estudio descriptivo, observacional, analítico, prospectivo y transversal.

7.2 Criterios de inclusión

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes de pacientes con diagnóstico de LMA sin tratamiento previo.

7.3 Criterios de exclusión

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes de pacientes con diagnóstico de un leucemia mieloide aguda, con cariotipo anormal o con tratamiento quimioterapéutico o radiológico previo y muestras sin el consentimiento del paciente.

7.4 Criterios de eliminación

Muestras en condiciones inadecuadas para el procesamiento como presencia de coágulos o poca cantidad de la misma (menos de 3mL) y con un tiempo prolongado desde la toma hasta la extracción (máximo una semana).

7.5 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos o Primers a partir de metodologías reportadas en la bibliográfica para la detección de las mutaciones más frecuentes presentes en los genes a estudiar y con ayuda de las secuencias de referencia de los mismos que se encuentran en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, se analizaron los oligonucleótidos diseñados con ayuda del programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). La síntesis se solicitó a la compañía ELIM Biopharm.

7.6 Extracción de DNA

Se realizó la lisis celular mediante el uso de SDS que fragmenta la membrana celular, la proteasa K que rompe la membrana nuclear y una RNasa para eliminar RNA contaminante. Una vez liberado el DNA se une a una columna de sílica por medio de centrifugación y se realizan varios lavados para eliminar los restos celulares proteicos con tiocianato de guanidina y azida de sodio. Finalmente, se eluyó el DNA en agua libre de nucleasas para recuperarlo por centrifugación..

7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa alelo específica

La reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR) es una técnica basada en primers específicos del alelo de interés, que se puede utilizar para analizar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de manera eficaz, incluidos los polimorfismos de transición, transversión e inserción/delección. Es aprovechada en el estudio de la investigación de enfermedades, diagnóstico molecular y evidencia biológica forense. En este método utiliza la enzima HotStartTaq polimerasa (5U/μL) para multiplicar un templado de DNA o cDNA proveniente de la muestra a analizar y detectar mediante el uso de primers específicos correspondientes a las diferentes mutaciones seleccionadas. La mezcla se coloca a 94°C durante 10 minutos para activar la enzima y posteriormente de 25 a 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos para separar las cadenas de DNA, de 50 a 65°C durante 20 a 40 segundos que permite el alineamiento de los primers o iniciadores y la enzima, y a 72°C para que se lleve a cabo la polimerización del DNA. Finalmente se realiza una amplificación final a 72°C durante 7 - 10 minutos para agotar la actividad de la polimerasa.

7.8 Diseño del Gblock

7.8.1 Secuencia diseñada que contiene los amplicones de interés:

CTCTCTGGCCCGCTCAGCCACCTACTCATGGGCCGCGATACTGACGTCTCCAACATGAGCCAGTCCCGAGTGTATAGCGTAGGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCATCCCGGATACTTCATGCAGACTATGTCTCGTATAGGCACTTGCGCCGGGTATCTTATAGCGAAAAGTCCCAATGGAAGTATCCAGAACATCCTGGGAGGGTATGCGACACCTTTTCGCCGGGAGCCCATCATTTGCAAAAACATCCCACTAGTCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACATTGGCAAGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGGGTGGAGAGGGGATCCCACTGACTTTTCAGAGGGGTTTTCTGTGCTCCTCGCCTAGCCATCCTCTCTCTGCGTACAAGGCCACAGACTTTGTGGCAGACCGGGCCGGCACTTTCAAAATGGTCTTCAAGGAAATATTATGCAAACAGATTTACATATTAAATACTAGCTGTCCCTTTCTTCTAGTCTCTTCTTATCCTGGCATAAACCCCAAAGGGGTTTTCAAGGACTCCGAGGACTGTCCCCAAAGATCTGCTGGGTAGCATAGTTGTTATTGAAAAAAAATCTGCTTGGCTGCACAATAGGATCCCCTTACATCTATTTGGAAAGATGAGACTGCGACCTTCAGCTCAGTGACAATGCGTCGTCATACG

7.8.2 Secuencias de unión de los oligonucleótidos y tamaño de los fragmentos

Gen	Dir	Secuencia	FragGENOM	FragGBLOCK
DNMT3A R882H	F	ATACTGACGTCTCCAACATGAACCA <u>A</u>	443 bp	327 bp
	R	ACAGAAAACCCCTCTGAAAAG		
IDH2 R140Q R172K	F	GAAAAGTCCCAATGGAAGTGTCCA <u>A</u>	277 bp	276 bp
	F	CAAGCCCATCACCATTGCCA <u>A</u>	179 bp	175 bp
	R	TGAAGACCATTTTGAAAGTGCCGGC		
IDH1 R132Q	F	GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATCA <u>A</u>	409 bp	558 bp
	R	TGTAAGGGGATCCTATTGTGCAGCC		

7.9 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5 – 2 % en un volumen de 40 mL, con un voltaje de entre 100-110 voltios y por un tiempo aproximado de 40-60 minutos. La visualización se realizó mediante tinción con solución de bromuro de etidio al 1:100 por un tiempo aproximado de 7- 10 minutos y se visualiza con un trasluminador UV.

7.10 Purificación de productos de PCR

Se utilizó el kit QIAquick PCR Purification kit (50) (QIAGEN) que se basa en un fundamento similar al de extracción de DNA.

8 RESULTADOS

8.1 Diseño de los oligonucleótidos de NPM1, DNMT3A, IDH1 e IDH2.

El análisis de mutaciones conocidas permitió diseñar oligonucleótidos alelo específico (con un cambio de una o más bases, correspondiente a la mutación), para que únicamente se unan, y consecuentemente, sean amplificados aquellos alelos que presenten una determinada mutación en su secuencia. Así, en la propia reacción de PCR, se amplificaron los alelos mutados. Los oligonucleótidos IDH1 R132Q F, IDH2 R140Q F, IDH2 R172K F, DNMT3A R882H son alelos específicos (tabla 5), las bases resaltadas en color rojo y subrayadas se unen específicamente a las mutaciones, pero no a las secuencias nativas. Mientras que las bases rojas no subrayadas son cambios de bases respecto a la secuencia nativa, que se hacen de forma intencional, con la finalidad de aumentar más la especificidad de unión de los oligonucleótidos a las regiones mutadas (mismatch). Además de estos, se generan otros oligonucleótidos que amplifiquen una región cercana a la mutación, los cuales funcionan como controles internos de reacción (C/I). Los oligonucleótidos utilizados para la detección de las mutaciones en NPM1 se tomaron de Azari-Yam et al 2016. En este caso los

oligonucleótidos alelo específico son reversos y están diseñados para detectar las variantes más comunes. En el caso del oligonucleótido NPM1, detecta al menos 3 variantes (entre ellas TCTG que es la variante encontrada en más del 80% de los casos), el oligonucleótido NPM2, detecta la segunda mutación más frecuente CTTG. De igual manera se diseñaron oligonucleótidos que amplifiquen una región cercana a la mutación que funcionara como control interno de reacción.

Tabla 5: Características de los oligonucleótidos utilizados en el estudio

Oligonucleótido alelo específico			
Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Número de bases	Tm
IDH1 R132Q F	GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATCA	29	56.0 °C
IDH2 R140Q F	GAAAAGTCCCAATGGAAGTGTCCA	24	56.1 °C
IDH2 R172K F	CAAGCCCATCACCATTGCCA	22	58.7 °C
DNMT3A R882H F	ATACTGACGTCTCCAACATGAACCA	24	57.9 °C
NPM1	TTCTTAAAGAGACTTCCTCCACTGCCATAC	30	59.4 °C
NPM2	TTCTTAAAGAGACTTCCTCCACTGCCAAGC	30	61.5 °C
Control interno			
Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Número de bases	Tm
IDH1 CTRL F	AGAGAATCGTGATGCCACCAACGAC	26	61.0 °C
IDH1 CTRL R	TGTAAGGGGATCCTATTGTGCAGCC	25	60.6 °C
IDH2 CTRL F	CAGAGCCCACACATTTGCACTCTA	24	59.2 °C
IDH2 CTRL R	TGAAGACCATTTTGAAAGTGCCGGC	25	60.3 °C
DNMT3A CTRL F	TCCTGCTGTGTGGTTAGACG	20	56.9 °C
DNMT3A CTRL R	ACAGAAAACCCCTCTGAAAAG	21	52.8 °C
NPMNR	GAAGTTGGAAGTAACATTGGCCATATGG	28	58 °C
NPEX12	CAGAGAGAATATTGAAGGGGAGG	23	54.4 °C

8.2 Diseño del programa de PCR

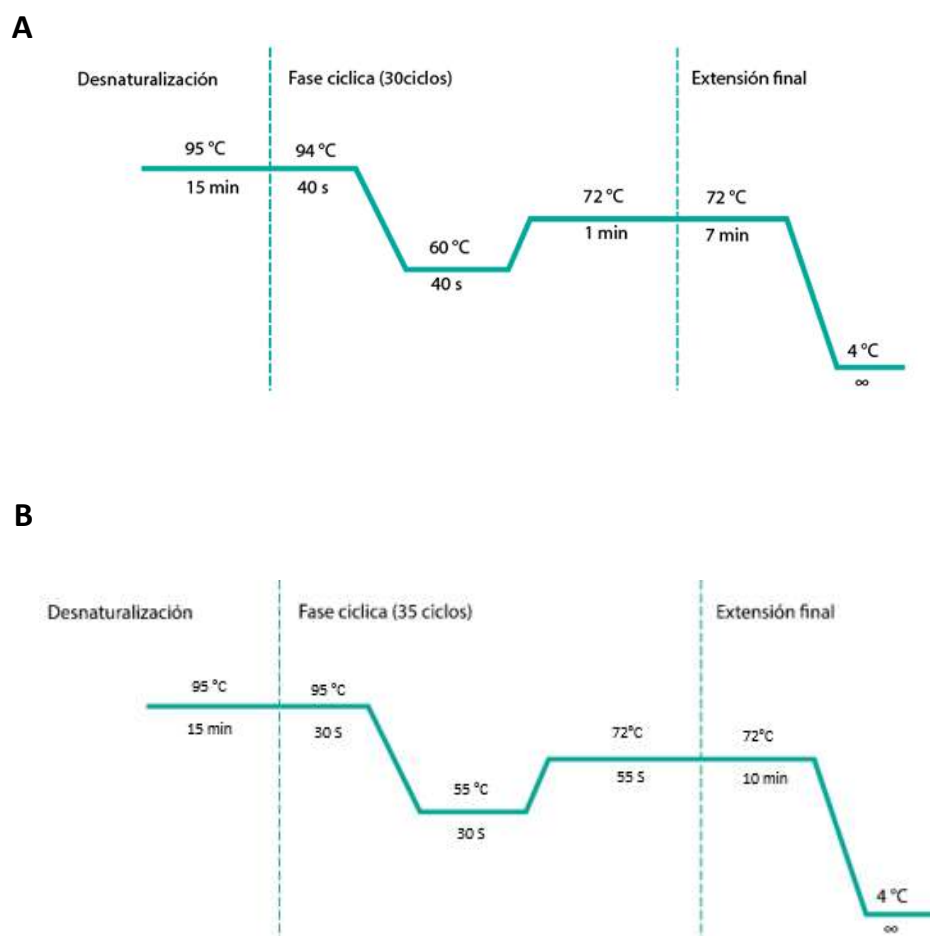


Figura 7. Programa de PCR para la amplificación de los genes IDH1/2, DNMT3 y NPM1. Cada uno de los programas de amplificación mediante PCR para IDH1 e IDH2, DNMT3A (A) y NPM1 (B), consiste de 5 etapas, desnaturalización inicial (I); segunda etapa de desnaturalización (II); alineamiento(III); polimerización (IV) y extensión final (IV).

8.3 Análisis de la funcionalidad de los oligonucleótidos

Con base en los programas de PCR diseñados para cada juego de oligonucleótidos, se llevó a cabo la reacción de amplificación de regiones donde se encuentran las mutaciones en los genes NPM1 (exón 12), IDH1 (exón 4) IDH2 (exón 4) y DNMT3A (exón 23). Las reacciones de PCR se realizaron con la combinación de los oligonucleótidos directo, reverso y alelo-específico en una misma mezcla de reacción, para todos los casos. En la figura 7A, se observa que para el ensayo de DNMT3A, la banda de amplificación dentro del exón 23 está en 546 pb. De forma similar para el ensayo de IDH1 (figura 7B), la banda de amplificación del exón 4 está en 790 pb y 448 pb en IDH2 (figura 7C). Por último, en el caso de NPM1 que amplificó la región del exón 12 generando una banda de 790 pb (figura 7D). De esta manera se descartó que amplificaran productos al tamaño esperado de las mutaciones en la mezcla de reacción.

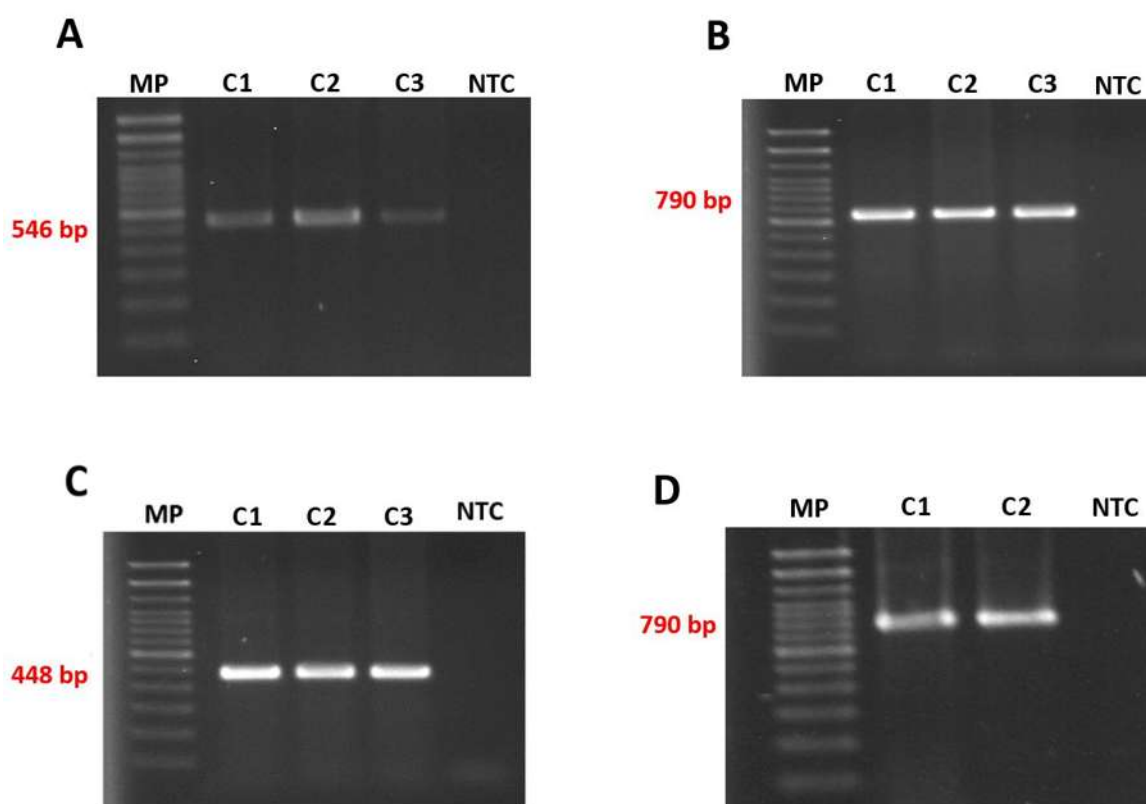


Figura 8. Prueba de la funcionalidad de los oligonucleótidos para DNMT3A, IDH1, IDH2 y NPM1. Las reacciones de PCR se realizaron con la combinación de todos los primers en la mezcla de reacción, incluidos aquellos que son alelo-específicos y controles internos. Los productos se cargaron en un gel de agarosa al 1.5 % de concentración, en el siguiente orden: marcador de peso molecular (MP), tres controles negativos (C1, C2 y C3), que corresponden a sujetos sanos sin ningún tipo de mutación y por último un control NTC (*Non Template Control*). Las bandas de amplificación de los C/I de DNMT3A, IDH1, IDH2 y NPM1 son de 546, 790, 448 y 790 pb respectivamente.

8.4 Análisis por secuenciación de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos de los controles internos de NPM1, DNMT3A e IDH1/2.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas por el método de secuenciación de Sanger de los productos de PCR de los controles internos se procedió a analizarlas con las bases de datos del National Center of Biotechnology (NCBI) con el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) el cual encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística. El análisis arroja una variedad de información de datos estadísticos como el *score bits* o *expected*, en este caso solo se desea evaluar el dato *identities* que se define como identidad el grado en el que dos secuencias (de nucleótidos o de aminoácidos) tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en una alineación, a menudo expresada como porcentaje.

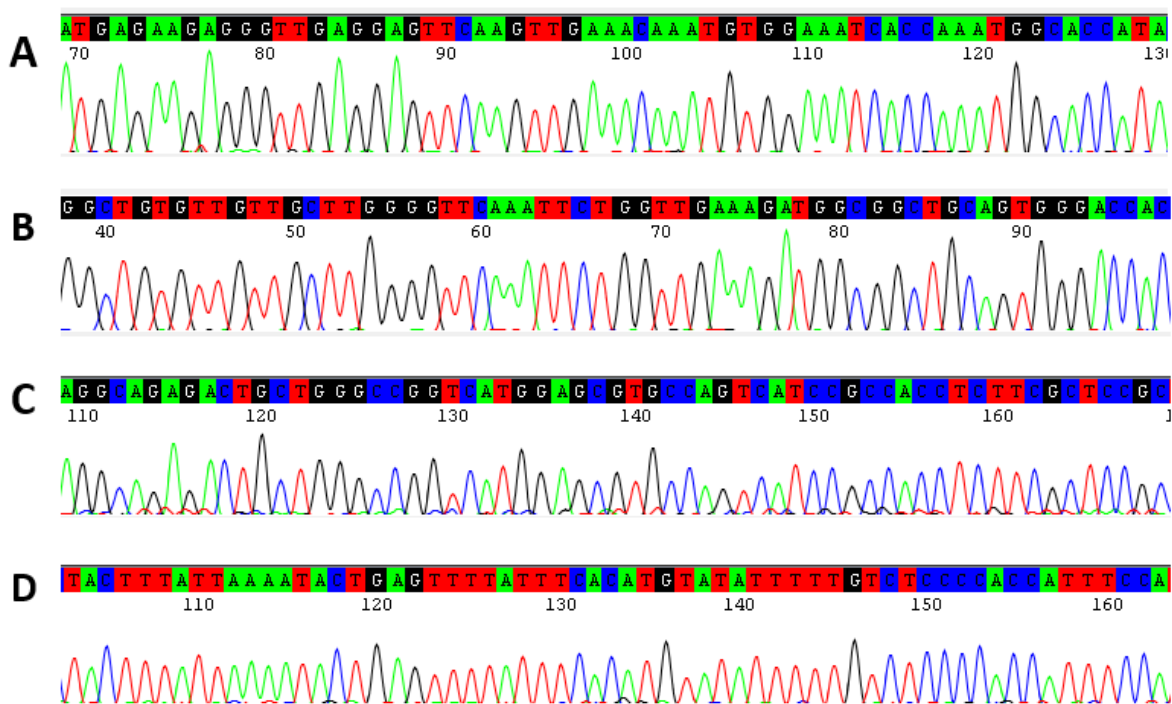


Figura 9. Análisis de las secuencias obtenidas de la secuenciación con el software BLAST. La similitud de las secuencias corresponde al 99% (contiene la mutación missense) y 100% de cada una de las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger de los productos de PCR de los genes NPM1 (A), DNMT3A (B), IDH2 (C) e IDH1 (D).

8.5 Características de las muestras seleccionadas para buscar las mutaciones en NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2

La selección de las muestras a ensayar se realizó apegándonos a los criterios establecidos para los pacientes de LMA portadores de mutaciones en NPM1, los cuales se encuentran en la última revisión de la clasificación de la LMA elaborado por la Organización Mundial de la Salud del 2016. Como ya se comentó anteriormente lo más característico de estos pacientes es el cariotipo normal. Se tamizaron 10 muestras como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: Muestras seleccionadas para el análisis de las mutaciones

Clave muestra	Clave usada	Presunto diagnóstico	Estudios adicionales
08113BM-21	M1	LMA	CN, mielomonoblástica
07214BM-21	M2	LMA	CN
07190BM-21	M3	LMA	CN
02006BLO-21	M4	LMA	BCR-ABL1-, JAK2-, CN
12157/156BLO-20	M5	LMA	CN
H9BM-1218	M6	LMA	t(8;21), CN, LMA M6-M5
B10BM-0819	M7	LMA	CN

8.6 Análisis de las mutaciones en NPM1

Las muestras fueron ensayadas para la identificación de las mutaciones tipo A y B de NPM1. El análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación reveló una banda de 790 pb que corresponde a la amplificación dentro del exón 12 nativo de NPM1 (figura 8). De las muestras M1, M2, M3 y M4 ensayadas, solo las muestras M1 (figura 8B) y M3 (figura 8C) resultaron positivas para las mutaciones en NPM1, que en el gel aparece como una banda adicional de 347 pb. Es importante señalar que para esta determinación se utilizó como control positivo DNA genómico de la línea celular OCI-AML3, la cual tiene la mutación tipo A (figura 8A).

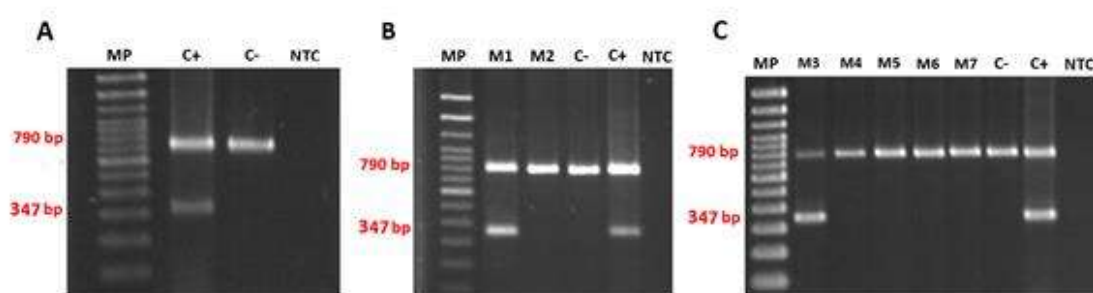


Figura 10. Análisis electroforético de las mutaciones en NPM1. (A) Análisis del material genético de la línea celular, empleando los oligonucleótidos para la determinación de las mutaciones en NPM1 y los controles internos (B,C) Análisis de las muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 (B y C). El control interno de reacción amplifica a 790 bp, mientras que las mutaciones a 347 bp (siendo positivas la M1 y M3). En cada reacción se emplea DNA genómico de una persona sana como control negativo (C-) y un NTC.

8.6.1 Validación

El proceso de validación de la prueba molecular basada en PCR alelo específico para determinar las mutaciones más frecuentes en el gen NPM1 se llevó a cabo con base a la replicabilidad del ensayo en 5 días distintos, obteniéndose un buen resultado en todos y cada uno de los ensayos. Se utilizó de base la muestra M1 (en el gel marcada como muestra positiva M+). Los resultados que se obtuvieron demostraron la repetibilidad y reproducibilidad (precisión y veracidad) de la prueba ya que en todos los casos los resultados de las muestras corresponden a su origen.

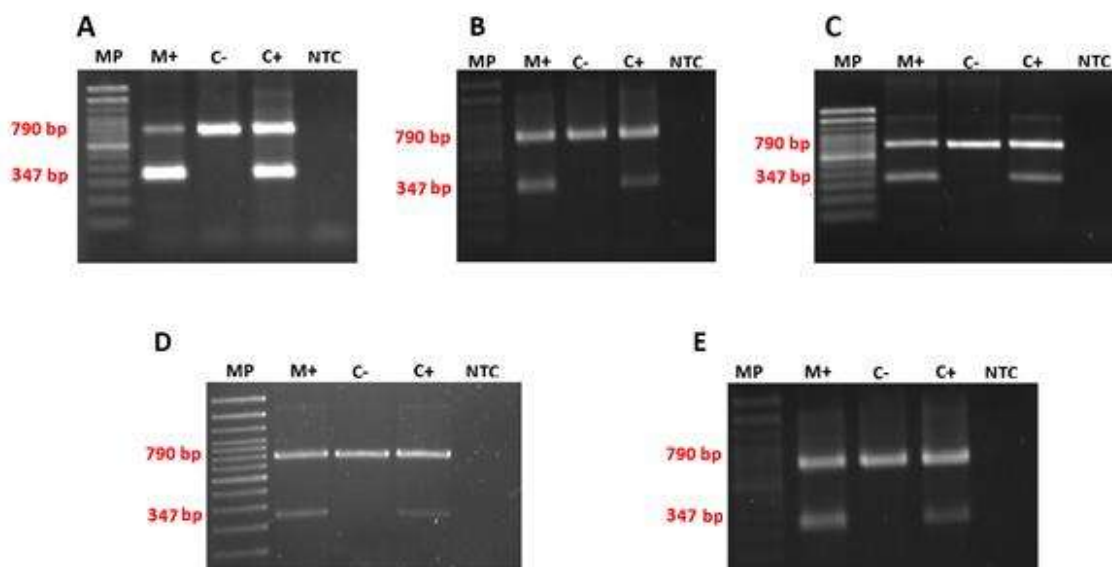


Figura 11. Análisis electroforético de los 5 ensayos realizados para determinar las mutaciones en NPM1. En todos los casos (A, B, C, D y E) se replicó el ensayo con la muestra M1 positiva (M+), un control negativo (C-) y el material genético de la línea celular (C+), empleando los oligonucleótidos para la determinación de las mutaciones (347 bp) en NPM1 y los controles internos (790 bp).

8.7 Análisis de la mutación en R882H en DNMT3A

Las muestras fueron ensayadas para la identificación de la mutación R882H en el exón 12. El análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación reveló una banda de 546 pb que corresponde a la amplificación dentro del exón 23 nativo de DNMT3A (figura 9) en otras palabras, el control interno de reacción. De todas las muestras ensayadas solo la muestra M5 resulto positiva, que, en el gel aparece como una banda adicional de 445 pb. La secuenciación del producto de PCR de la muestra M1 se llevó a cabo mediante el método de Sanger, una vez que este fue purificado (figura 12).

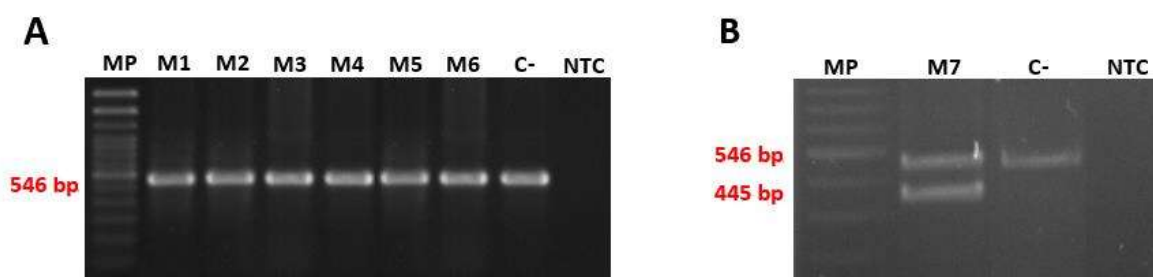


Figura 12. Análisis electroforético de las mutaciones en DNMT3A de las muestras M1-M7. El control interno de reacción amplifica a 546 pb mientras que la mutación R882H amplifica a 445 pb. En cada reacción se emplea DNA genómico de una persona sana como control negativo (C-) y un NTC.

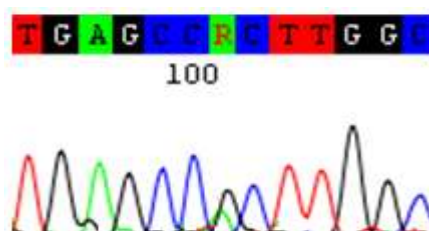


Figura 13. Análisis por secuenciación de la muestra M7 positiva para DNMT3A R882H. En el electroferograma se muestra la secuencia correspondiente a la mutación en el codón CGC por CAC. Donde se cambia una guanina (señal negra) por una adenina (señal verde). En este caso la señal fue débil y el software marca como una R (Purina (adenina o guanina)).

8.8 Análisis de la mutación R140Q en IDH2

Las muestras fueron ensayadas para la identificación de las mutaciones R140Q y R172K en el exón 4. El análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación reveló una banda de 448 pb que corresponde a la amplificación dentro del exón 4 nativo de IDH2 (figura 10) en otras palabras, el control interno de reacción. De todas las muestras ensayadas solo la muestra M1 (también positiva par NPM1) resulto positiva para la mutación R140Q, que, en el gel aparece como una banda adicional de 277 pb. No se encontró la mutación R172K en ninguna de las muestras ensayadas. La secuenciación del producto de PCR de la muestra M1 se llevó a cabo mediante el método de Sanger, una vez que este fue purificado (figura 14). Las mutaciones R172K en el gen IDH2 y de la mutación R132Q en el gen IDH1 no se encontraron en ninguna de las 7 muestras analizadas. Sin embargo, si se realizó la secuenciación de los productos de PCR obtenidos con los controles internos (figura 15)

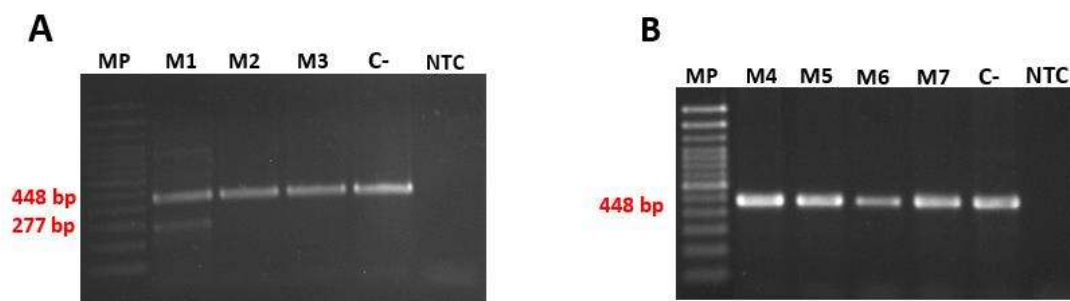


Figura 14. Análisis electroforético de las mutaciones en IDH2 de las muestras M1-M7. El amplificado dentro del exón 4 corresponde a la banda de 448 pb. La muestra M1 resulto positiva para la mutación R140Q que es la banda adicional que está a 277 pb. En cada reacción se emplea DNA genómico de una persona sana como control negativo (C-) y un NTC.

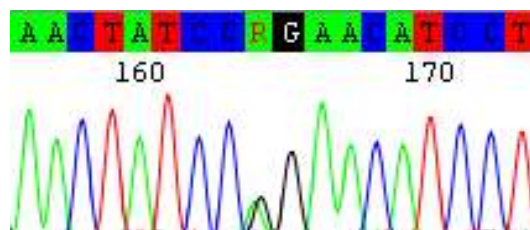


Figura 15. Análisis por secuenciación de la muestra M1 positiva para IDH2 R140Q. En el electroferograma se muestra la secuencia correspondiente a la mutación en el codón CGG por CAG. Donde se cambia una guanina (señal negra) por una adenina (señal verde). En este caso la señal fue débil y el software marca como una R (Purina (adenina o guanina)).

8.9 PCR del Gblock

Una vez reconstituido y diluido como específica el fabricante, se procedió a evaluar su funcionalidad en la reacción de PCR. Cada ensayo se realizó con toda la mezcla de oligonucleótidos, de tal manera que en el control negativo (C-) amplifica el control interno de reacción para cada determinación. En el caso de la determinación de IDH2 R140Q se hizo apoyo de las muestras que resultaron positivas en cada una de las determinaciones, resultando los amplicones esperados en el gBlock de 327 bp para DNMT3A (figura 15 A) y de 276 para IDH2 R140Q (figura 15 B). En el caso de IDH2 R172K se observó el amplicón esperado a 175 bp (figura 15 C) y para IDH1 de 558 bp (figura 15 D).

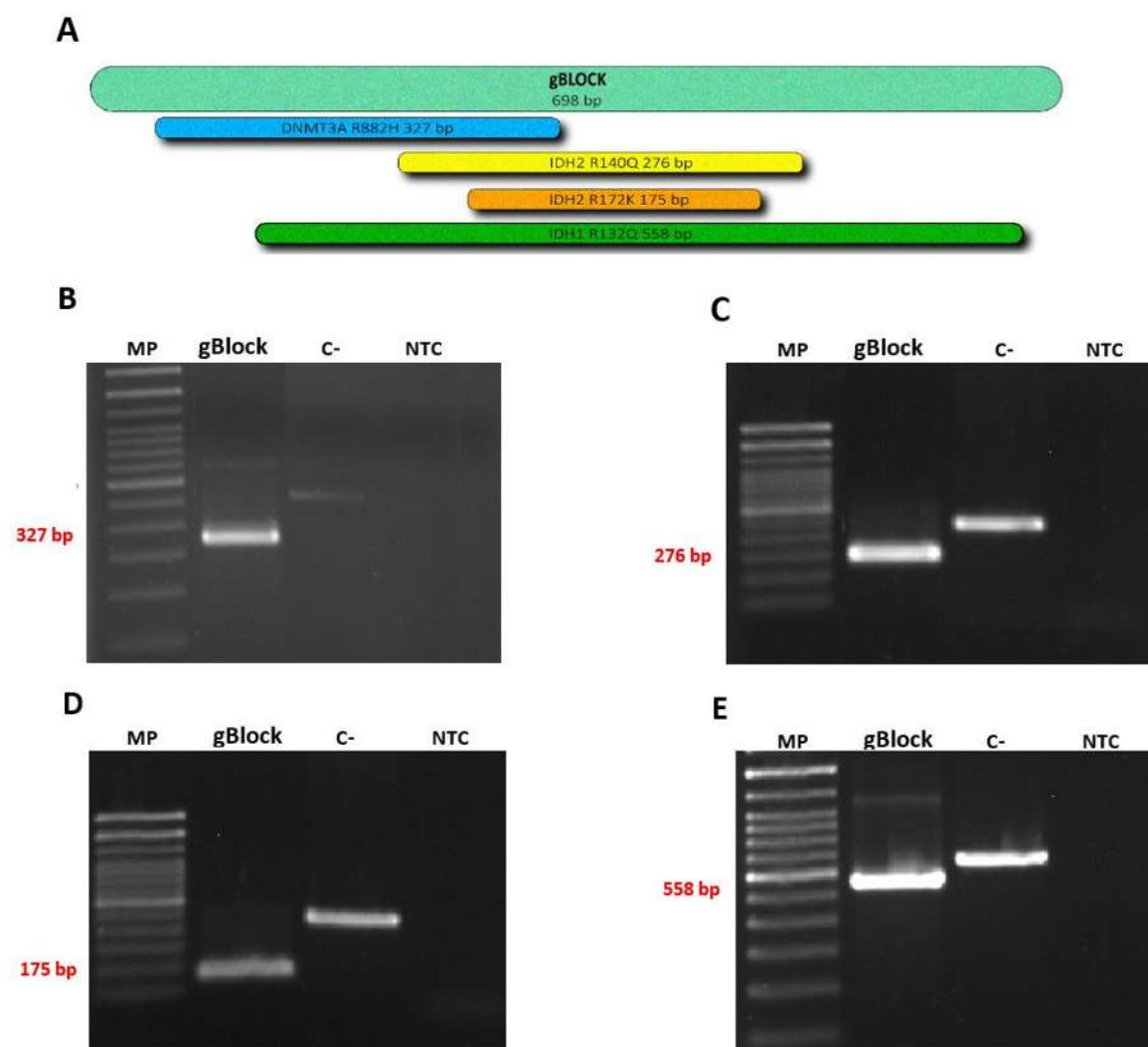


Figura 16. Diseño del gBlock y Análisis electroforético de las mutaciones en R882H en DNMT3A, R132Q en IDH1 e IDH2 R140Q y R172K en el fragmento de DNA gBlock. (B) Mutación R882H en DNMT3A. (C) Mutación R140Q en IDH2. (D) Mutación R172K en IDH2. (E) Mutación R132Q en IDH1. En cada reacción se emplea DNA genómico de una persona sana como control negativo (C-) y un NTC.

9 DISCUSIÓN GENERAL

Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Clasificación Europea de la leucemia mieloide aguda (ELN) han incorporado nuevas entidades citogenéticas y moleculares como componentes esenciales de la estratificación del riesgo y toma de decisiones terapéuticas en el manejo clínico de pacientes con LMA. Entre estas alteraciones genéticas, los marcadores genéticos pronósticos potenciales son NPM1, FLT3 y gen CEBPA. Las mutaciones en los genes NPM1 y FLT3 representan los indicadores de diagnóstico y pronóstico más importantes en pacientes con leucemia mieloide aguda con cariotipo normal. Interesantemente se ha encontrado que el 95% de todas las mutaciones de NPM1 detectadas tienen inserciones de 4 bases (4 más frecuentes conocidas como A, B, C y D) (Arber *et al.*, 2016). Esta prueba molecular basada en PCR alelo específica permitió detectar la mutación que con mayor frecuencia es detectada en este gen NPM1 (mutación TCTG), la cual se logró estandarizar con el uso de material genómico de la línea celular OCI-AML3 y posteriormente validarse apegándose a los criterios establecidos por la Entidad Mexicana de Acreditación para pruebas cualitativas, en la cual, la reproducibilidad y repetibilidad son los parámetros más representativos. Aunado a esto se pudo identificar 2 muestras positivas a las mutaciones detectadas por esta prueba, estas muestras pues, se seleccionaron apegándose a los criterios establecidos por la OMS de cariotipo normal y más del 20% de blastos en médula ósea o sangre periférica. Desafortunadamente la secuenciación de los productos de PCR obtenidos de estas muestras positivas fue incapaz de reconocer específicamente la región de la mutación debido al deterioro del producto de PCR, sin embargo, fue posible identificar que la región es específica del exón 12 de NPM1 con ayuda del software BLAST. Interesantemente algún porcentaje de casos de NPM1 + se caracteriza por tener morfología de linaje de monocitos, información que teníamos de una de las muestras que resultó positiva. Con respecto a la prueba molecular para determinar las mutaciones más frecuentes en los genes DNMT3A, IDH1 e IDH2, la cual afortunadamente se logró establecer un programa de PCR para la determinación simultánea de todas las mutaciones, también permitió identificar muestras positivas. Estas 7 muestras seleccionadas fueron sometidas al análisis de las mutaciones más frecuentes en los genes DNMT3A, IDH1 e IDH2, de las cuales se encontró una muestra positiva a DNMT3A y otra a IDH2 (misma que resultó positiva a NPM1), posteriormente se identificaron por secuenciación de sanger. Aunado a esto se decidió por diseñar y sintetizar una secuencia de doble cadena de DNA la cual simulara la secuencia de unión de los oligonucleótidos alelo específico, anteriormente se encontró ninguna publicación de estas secuencias para su uso en PCR de punto final, sin embargo, a la hora de usarla como templado, obtuvimos los amplicones correspondientes al diseño para la prueba de DNMT3A, IDH1 e IDH2. Esto nos permitió validar la prueba molecular para IDH1, de la cual no habíamos encontrado ninguna muestra positiva. Esta prueba molecular de mayormente accesible indudablemente ayudará a orientar a la

comunidad médica en el diagnóstico preciso de casos de LMA, lo cual finalmente mejorará la supervivencia promedio de los pacientes.

10 CONCLUSIONES

La prueba molecular basada en PCR punto final alelo específico permite la detección de las mutaciones más frecuentes en los genes NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2 de forma inequívoca en dos ensayos distintos, NPM1, DNMT3A-IDH1/2.

Mediante el uso del DNA genómico de la línea celular OCI-AML3, la secuenciación, la repetibilidad, reproducibilidad y el fragmento gBlock, se validaron las pruebas moleculares cumpliendo con los requerimientos establecidos por la Entidad Mexicana de Acreditación para determinaciones cualitativas.

Con esta prueba molecular y apegándose a los criterios expuestos en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (cariotipo normal, edad avanzada, linaje mieloide) para los casos de leucemia mieloide aguda, es posible identificar muestras positivas a NPM1, IDH1 y DNMT3A.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* ;127(20):2391-405.
2. Bacher, U., Schnittger, S., and Haferlach, T. (2010). Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 22, 646–655; Stirewalt, D.L., and Radich, J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 650–665
3. Bird A. (2002); DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 16(1):6-21.
4. Boddu P, Takahashi K, Pemmaraju N, Daver N, Benton CB, Pierce S, Konopleva M, Ravandi F, Cortes J, Kantarjian H, DiNardo CD. (2017); Influence of IDH on FLT3-ITD status in newly diagnosed AML. *Leukemia* 31(11):2526-9.
5. Bullinger L, Krönke J, Schön C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Carió A, Senger C, Schlenk RF, Downing JR, Holzmann K, Döhner K, Döhner H. (2010); Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* 24(2):438-49.
6. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, Maupas J, Gentilhomme O, Ehrlam A, Fiere D. (1989); Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *British journal of haematology* 72(2):161-6.
7. Catlin SN, Busque L, Gale RE, Gutter P, Abkowitz JL. (2011); The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 117(17):4460-6.
8. Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N, Sharma A, Yun H, Görlich K, Wichmann M, Schwarzer A, Preller M, Thol F, Meyer J, Haemmerle R, Struys EA, Jansen EE, Modlich U, Li Z, Sly LM, Geffers R, Lindner R, Manstein DJ, Lehmann U, Krauter J, Ganser A, Heuser M. (2013); Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* 122(16):2877-87.
9. Chen T, Li E. (2004); Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current topics in developmental biology.* 60:55-89.
10. Cheng X, Blumenthal RM. (2008). Mammalian DNA methyltransferases: a structural Perspective. *Structure.* 16(3):341-50;

11. Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, Lee MC, Ko BS, Tang JL, Yao M, Tsay W, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Chang YC, Kuo YY, Kuo KT, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. (2011); TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 118(14):3803-10.
12. Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Chang YC, Kuo KT, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. (2011); The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 25(2):246-53.
13. Deschler B, Lübbert M. (2006); Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107(9):2099-107.
14. Dinardo CD, Ravandi F, Agresta S I (2015); Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am. J. Hematol.* 90(8), 732–736
15. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T 2017 Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*;129(4):424-47.
16. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. (2010); Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115(3):453-74.
17. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. (2015); Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 373(12):1136-52.
18. Eckardt, N. (2006). Genetic and Epigenetic Regulation of Embryogenesis. *The Plant Cell*, 18(4), pp.781-784.
19. Egger, G. et al. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457–463.
20. Emperle M, Dukatz M, Kunert S, Holzer K, Rajavelu A, Jurkowska RZ, Jeltsch A. (2018); The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes. *Scientific reports* 8(1):13242.
21. Ferrara F, Mirto S. (1996); Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. *Br J Haematol.* 92:627–631.
22. Ferrara F, Schiffer CA. (2013); Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet (London, England)* 381(9865):484-95.

23. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A. (2010); Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 18(6):553-67.
24. Figueroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P.J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L. and Campagne, F. (2010). DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 17, 13-27.
25. Gaidzik V, Döhner K. (2008); Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Seminars in oncology* 35(4):346-55.
26. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK.(2010); Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116(3):354-65.
27. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W, Spanhol-Rosseto A, Klein HU, Dugas M, Schindela S, Trifonov V, Schnittger S, Haferlach C, Bassan R, Wells VA, Spinelli O, Chan J, Rossi R, Baldoni S, De Carolis L, Goetze K, Serve H, Peceny R, Kreuzer KA, Oruzio D, Specchia G, Di Raimondo F, Fabbiano F, Sborgia M, Liso A, Farinelli L, Rambaldi A, Pasqualucci L, Rabadan R, Haferlach T, Falini B. (2011); Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood* 118(23):6153-63.
28. Grove CS, Vassiliou GS. (2014); Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer. *Disease models & mechanisms* 7(8):941-51.
29. Gutiérrez-Aguirre CH, González-Leal XJ, Herrera-Pérez F del C, Zacarías-Reyes BC, Herrera-Rojas MÁ, Gómez-Almaguer D (2014); Trasplante autólogo de células hematopoyéticas en leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol*;15(3):87-94.
30. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. (2008); Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*;22(8):1539-1541.
31. Hamidi T, Singh AK, Chen T. (2015). Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*;7:247–65.
32. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. (1999); World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of*

- clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 17(12):3835-49.
33. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al, Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun* 2016; 7:12475.
 34. Holliday, R., and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226–232.
 35. Holz-Schietinger C, Matje DM, Harrison MF, Reich NO. (2011); Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of de novo DNA methylation. *The Journal of biological chemistry* 286(48):41479-88.
 36. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al, Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl.J. Med* 2014;371(26):2488-98.
 37. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al, Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine* 2014;371(26):2488-98. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al, Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal
 38. Jones PA (2012); Functions of DNA methylation islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13:484–492.
 39. Klose R.J., Bird A.P. (2006); Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*; 31:89 –97.
 40. Laurie, CC, Laurie, CA, Rice, K, Doheny, KF, Zelnick, LR, McHugh, CP, & Weir, BS. (2012); Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nature genetics* 44(6):642-50.
 41. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, et al. (2010); DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 363(25):2424-33.
 42. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, et al (2013); Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 368(22):2059-74.
 43. Losman JA, Kaelin Jr WG. (2013); What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev*; 27:836–52.
 44. Mandrekar SJ, Sanford BL, (2017) Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med* 7; 377: 454–464.)

45. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. (2012); Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(7):742-50.
46. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, et al. (2009); Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine* 361(11):1058-66.
47. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, et al (2016); Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 128(5):686-98.
48. Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. (2013); Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Applied health economics and health policy* 11(3):275-86.
49. Morrison SJ, Scadden DT. (2014); The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*; 505: 327–334.
50. Ohgami RS, Ma L, Merker JD, Gotlib JR, Schrijver I, Zehnder JL, Arber DA. (2015); Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 28(5):706-714.
51. Ohno R, Nakayama M, Naruse C, Okashita N, Takano O, Tachibana M, Asano M, Saitou M, Seki Y. (2013); A replication-dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells. *Development (Cambridge, England)* 140(14):2892-903.
52. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, et al (2016); Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 374(23):2209-21.
53. Pastor WA, Aravind L, Rao A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 341–56.
54. Patel JL, Schumacher JA, Frizzell K, Sorrells S, Shen W, Clayton A, Jattani R, Kelley TW. (2017); Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia research* 56:7-12.

55. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, et al. (2012); Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 366(12):1079-89.
56. Pendleton M, Lindsey RH, Felix CA, Grimwade D, Osheroff N. (2014); Topoisomerase II and leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1310:98-110.
57. Pina, C. and Enver, T. (2007). Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene* 26, 6750-6765
58. Platt MY, Fathi AT, Borger DR, Brunner AM, Hasserjian RP, Balaj L, Lum A, Yip S, Dias-Santagata D, Zheng Z, Le LP, Graubert TA, Iafrate AJ, Nardi V. (2015); Detection of Dual IDH1 and IDH2 Mutations by Targeted Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 17(6):661-8.
59. Roller A, Grossmann V, Bacher U, Poetzinger F, Weissmann S, Nadarajah N, Boeck L, Kern W, Haerlach C, Schnittger S, Haerlach T, Kohlmann A (2013); Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies. *Leukemia*; 27(7):1573-8.
60. Rowley JD. (1973); Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de genetique* 16(2):109-12.
61. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, Meyer MR, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Wilson RK, Ley TJ. (2014); The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer cell* 25(4):442-54.
62. Shah A, Andersson TM, Rachet B, Bjorkholm M, Lambert PC. (2013); Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*; 162: 509 –516.
63. Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang QR, Yan XJ, Gu ZH, Wang YY, Chen B, Jiang CL, Yan H, Chen FF, Chen HM, Chen Z, Jin J, Chen SJ. (2011); Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 118(20):5593-603.
64. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. (2011); Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev*; 25(1):39-5.
65. Spencer DH, Russler-Germain DA, Ketkar S, Helton NM, Lamprecht TL, Fulton RS, Fronick CC, O'Laughlin M, Heath SE, Shinawi M, Westervelt P, Payton JE, Wartman LD, Welch JS, Wilson RK, Walter MJ, Link DC, DiPersio JF, Ley TJ. (2017); CpG

- Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. *Cell* 168(5):801-816.e13.
66. Stein EM. IDH2 inhibition in AML: finally progress? (2015) *Best Pract Res Clin Haematol* 2015; 28: 112–115
 67. Suela, J., Alvarez, S., and Cigudosa, J.C. (2007). DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet. Genome Res.* 118, 304–309.
 68. Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M. (2011); Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(21):2889-96.
 69. Thomas D. and Majeti R. (2017) Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 129:1577-1585.
 70. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. (2009); The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114(5):937-51.
 71. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. (2005); Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106(12):3747-54.
 72. Walter, M.J., Payton, J.E., Ries, R.E., Shannon, W.D., Deshmukh, H., Zhao, Y., Baty, J., Heath, S., Westervelt, P., Watson, M.A., et al. (2009). Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12950–12955.
 73. Winer ES, Stone RM (2019) Novel therapy in Acute myeloid leukemia (AML): moving toward targeted approaches. *Ther Adv Hematol*;10:2040620719860645.
 74. Wolach, O, Stone, R.M. (2015); How I treat mixed-phenotype acute leukemia. *Blood*, 125, 2477–2485.
 75. Xu Q, Li Y, Lv N, Jing Y, Xu Y, Li Y, Li W, Yao Z, Chen X, Huang S, Wang L, Li Y, Yu L. (2017); Correlation Between Isocitrate Dehydrogenase Gene Aberrations and Prognosis of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23(15):4511-22.

76. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y. (2011); Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* 19(1):17-30.
77. Yamauchi T, Negoro E, Lee S, Takai M, Matsuda Y, Takagi K, Kishi S, Tai K, Hosono N, Tasaki T, Ikegaya S, Inai K, Yoshida A, Urasaki Y, Iwasaki H, Ueda T. (2013); A high serum uric acid level is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Anticancer research* 33(9):3947-51.
78. Yuan XQ, Chen P, Du YX, Zhu KW, Zhang DY, Yan H, Liu H, Liu YL, Cao S, Zhou G, Zeng H, Chen SP, Zhao XL, Yang J, Zeng WJ, Chen XP. (2019); Influence of DNMT3A R882 mutations on AML prognosis determined by the allele ratio in Chinese patients. *Journal of translational medicine* 17(1):220.
79. Yuan XQ, Peng L, Zeng WJ, Jiang BY, Li GC, Chen XP. (2016); DNMT3A R882 Mutations Predict a Poor Prognosis in AML: A Meta-Analysis From 4474 Patients. *Medicine* 95(18):e3519.
80. Choi JW, Lee SB, Kim CK, Lee KH, Cho SW, Ahn JY. Lysine 263 residue of NPM/B23 is essential for regulating ATP binding and B23 stability. *FEBS Lett.* 2008;582(7):1073–80.)
81. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19:1479-1482.
82. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114:3024- 3032.
83. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368:2059- 2074.
84. Castaigne S, Pautas C, Terré C, et al; Acute Leukemia French Association. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2012;379(9825):1508-1516.
85. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Pierangeli S, Mulas F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood* 2015;125(22):3455-65.
86. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul; 6(7):493-505.

87. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF, GIMEMA Acute Leukemia Working Party. N Engl J Med. 2005 Jan 20; 352(3):254-66.
88. Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in the absence of FLT3-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. J Clin Oncol. 2015;33(10):1157-1164.