



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**EFFECTO DE LA MUTACIÓN EN DNMT3A Y TET2 EN EL ESTADO  
DE METILACIÓN DE PROMOTORES GÉNICOS DE PACIENTES  
CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

**Tesis que presenta**

**M. en C. JUAN ALBERTO PONCIANO GOMEZ**

**Para obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias**

**En la Especialidad de  
Genética y Biología Molecular**

**Director de la Tesis: Dr. J. Efraín Garrido Guerrero**

**México, D.F.**

**Noviembre 2017**



## **Oración por el futuro**

*“Ojalá nuestra tecnología nunca deje atrás nuestra filosofía”*

*“Ojalá nuestro poder nunca supere nuestra compasión”*

*“Y que el motor del cambio no sea el miedo, sino el amor”*

*Dan Brown, El origen.*



Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. José Efraín Garrido Guerrero y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante fondos del proyecto 256514.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico brindado mediante la beca **234020**.

# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. LEUCEMIA	3
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS	4
1.3. MORFOLOGÍA	6
1.4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	7
1.5. CLASIFICACIÓN DE LA LMA	8
1.6. CITOGENÉTICA	11
1.7. ANORMALIDADES MOLECULARES	12
1.8. PRONÓSTICO Y ESTRATIFICACIÓN POR RIESGO	13
1.9. EPIGENÉTICA	15
1.10. METILACIÓN DEL DNA	17
1.10.1. DNMTs	18
1.10.2. TET	21
1.11. DNMT Y TET EN NEOPLASIAS	25
1.11.1. DNMT3A	25
1.11.2. TET2	26
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL	29
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
<b>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>30</b>
<b>5. CRITERIOS DE INCLUSION</b>	<b>31</b>
<b>6. METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
6.1. MUESTRAS DE TEJIDO HUMANO	32
6.2. DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS MÁS COMUNES	32
6.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y RT-qPCR	33
6.4. EXTRACCIÓN DE DNA Y EVALUACIÓN DE LA METILACIÓN E HIDROXIMETILACION GLOBAL	34
6.5. PCR Y SECUENCIACIÓN DE TET2 Y DNMT3A	35
6.6. METILACIÓN DE DNA GEN ESPECIFICA	35
6.7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA METILACIÓN DIFERENCIAL DE DNA	37
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	37
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
7.1. DESARROLLO DE UN KIT PARA DIAGNÓSTICO MÚLTIPLE DE TRANSLOCACIONES POR PCR.	38
7.2. LA EXPRESIÓN DE DNMT3A Y TET2 EN PACIENTES CON LMA ES ALTAMENTE VARIABLE	39
7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DNMT3A Y TET2 EN PACIENTES CON LMA	40
7.4. INCIDENCIA DE MUTACIONES EN DNMT3A Y TET2 EN PACIENTES CON LMA	42

<b>7.5. LOS PACIENTES CON MUTACIONES EN DNMT3A Y TET2 REPRESENTAN LOS VALORES MÁS ALTERADOS DE 5MC Y 5HMC</b>	<b>43</b>
<b>7.6. LOS PACIENTES CON MUTACIONES EN DNMT3A Y TET2 PRESENTAN LAS CONCENTRACIONES DE MRNA MÁS EXTREMAS.</b>	<b>44</b>
<b>7.7. LAS MUTACIONES EN DNMT3A Y TET2 PUEDEN EXPLICAR LA VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE 5MC Y 5HMC EN PACIENTES CON LMA</b>	<b>44</b>
<b>7.8. LOS PACIENTES CON LMA CON MUTACIONES EN DNMT3A O TET2 PRESENTAN NIVELES ALTERADOS DEL MRNA DE TET2 Y DNMT3A</b>	<b>46</b>
<b>7.9. LOS PACIENTES CON MUTACIONES EN DNMT3A O TET2 MUESTRAN UN PATRÓN DE METILACIÓN DIFERENCIAL ESPECIFICO</b>	<b>47</b>
<b>7.10. LOS PACIENTES CON MUTACIONES EN DNMT3A O TET2 MUESTRAN UN PATRÓN DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL ESPECIFICO</b>	<b>48</b>
<b>7.11. ALGUNOS DE LOS GENES EVALUADOS PRESENTAN UNA CLARA CORRELACIÓN ENTRE METILACIÓN Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.</b>	<b>51</b>
<b>7.12. LA PRESENCIA DE MUTACIONES EN TET2 Y DNMT3A NO TIENE UN CLARO EFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON LMA</b>	<b>54</b>
<b>7.13. LA PRESENCIA DE MUTACIONES EN TET2 Y DNMT3A TIENEN UN IMPACTO EN LA SOBREVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON LMA</b>	<b>55</b>
<b><u>8. DISCUSIÓN</u></b>	<b>56</b>
<b><u>9. CONCLUSIONES</u></b>	<b>68</b>
<b><u>10. PERSPECTIVAS</u></b>	<b>70</b>
<b><u>11. LITERATURA CITADA</u></b>	<b>72</b>
<b><u>12. ÍNDICE DE TABLAS</u></b>	<b>78</b>
<b><u>13. ÍNDICE DE FIGURAS</u></b>	<b>78</b>



## DEDICATORIAS

A mis padres quienes como lo prometieron me dieron la mejor herencia que se le puede dar a un hijo, que no es oro ni grades riquezas si no amor y educación. Quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida, que me han formado y educado. A quienes la ilusión de su existencia ha sido vernos a sus hijos convertidos en personas de provecho. A quienes nunca poder pagar, aun con las riquezas más grandes del mundo. A ustedes mis seres más queridos sinceramente. Gracias.

A mis hermanos Karla, Enrique y Diana, que con su cariño me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia, por preocuparse por su hermano mayor, por compartir sus vidas, gracias por estar siempre ahí.

A mi linda esposa Myriam, gracias por tu amor, por tu comprensión, por tu apoyo, por tu sinceridad, gracias por ser como eres, pero sobre todo gracias por enseñarme a creer en mí y motivarme a hacer las cosas de la mejor manera. Te amo. “Quisalan elevas” “MYR521”

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer de la manera más sincera a mi director de Tesis el Dr. José Efraín Garrido Guerrero, gracias por su orientación, paciencia y confianza, gracias por inculcar en mi un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa.

Quiero agradecer a los miembros del jurado, Dr. Bulmaro Cisneros Vega, Dr. Javier García Mena, Dr. Adolfo Martínez Tovar y al Dr. Federico Centeno Cruz, por sus valiosas contribuciones y por el tiempo que dedicaron a este trabajo, aun a pesar de tantas actividades que los ocupan.

Gracias a mi compañero y amigo Glustein Pozo, tus consejos siempre fueron acertados „Maestro““, también gracias a todos mis compañeros de laboratorio, Alicia, Janet, Bianca y Pedro han hecho de esta una buena estancia.

Gracias a mi amigo, Santiago, por su apoyo y cariño, gracias por demostrarme que las distancias no importa cuando se tienen amigos de verdad.

Gracias a todos mis maestros, no solo a los de esta institución sino también a los que estuvieron antes, en especial al Dr. Rafael Jiménez Flores, al Dr. René Méndez Cruz, y al Dr. Elías Piedra Ibarra gracias por sembrar en mi la pasión por la investigación.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan leer estas palabras quiero darles las gracias por formar parte de mi y por todo lo que me han brindado.

## RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) se caracteriza por su alta heterogeneidad tanto biológica como clínica, lo cual representa una importante barrera para el desarrollo de una clasificación precisa y una terapia adecuada. La investigación de alteraciones citogenéticas como las translocaciones cromosómicas, mutaciones y más recientemente, alteraciones epigenéticas específicas, es fundamental para definir el origen y pronóstico. Las aberraciones epigenéticas juegan un papel central en la fisiopatología de la LMA, pero además las firmas moleculares basadas en los patrones de metilación del DNA (DNAm) pueden ser útiles para una mejor clasificación de la enfermedad. En este estudio, analizamos el impacto del estado mutacional de los genes que codifican las principales enzimas responsables de la producción de 5mC y 5hmC, DNMT3A y TET2, así como su nivel de expresión y actividad enzimática, así como su efecto en el patrón de metilación de promotores génicos particulares y de manera muy importante en la supervivencia de los pacientes.

Se estudiaron las muestras de sangre periférica de 110 pacientes con LMA *de novo* y 15 individuos control sanos. El contenido global de metilcitosina e hidroximetilcitosina, fue determinado a partir del DNA genómico de leucocitos de sangre periférica (LSP) mediante el uso de los estuches comerciales Methyl Flash TM Methylated DNA 5-mC y 5-hmC Quantification. La expresión de DNMT3A y TET2 fue evaluada mediante RT-qPCR. El DNA de LSP fue usado para amplificar mediante PCR la región del gen DNMT3A que contiene el hotspot R882A y del gen TET2 del exón 6 a 10. Los productos de la amplificación por PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger. El patrón de metilación de 18 promotores génicos particulares fueron evaluados mediante pirosecuenciación después de la conversión del DNA con bisulfito de sodio, y sus niveles de expresión transcripcional fueron evaluados por RT-qPCR.

Aquí demostramos que los pacientes con LMA manifiestan niveles alterados de 5mC y 5hmC en LSP y una expresión altamente variable de los transcritos de

DNMT3A y TET2. Encontramos una prevalencia de mutación del 2.7% para DNMT3A y del 11.8% para TET2 en la población mexicana con esta enfermedad. La presencia de mutaciones en estos genes podría tener un impacto en la tasa de supervivencia de los pacientes con LMA, ya que la supervivencia general promedio en individuos con mutaciones en DNMT3A (mDNMT3a), fue de solo 4 meses. Además, demostramos que las mutaciones pueden causar patrones irregulares de metilación del DNA y alteraciones en los niveles de expresión transcripcional en un grupo de 18 genes particulares que se sabe están involucrados en la patogénesis de la LMA.

Nuestra investigación sugiere una posible interacción entre el pronóstico de la LMA y las dos principales enzimas que gobiernan la dinámica de metilación del DNA. Además, las alteraciones de estas enzimas son responsables de afectar los patrones de metilación en promotores de genes particulares y lo que es más importante, puede influir en la supervivencia del paciente.

## ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by its high biological and clinical heterogeneity, which represents an important barrier for the development of a precise classification and accurate therapy. The search for cytogenetic alterations, such as chromosomal translocations, mutations and more recently, specific epigenetic alterations is fundamental to define its origin and prognosis. Epigenetic aberrations play a central role in the pathophysiology of AML, but besides, molecular signatures based on DNA-methylation (DNAm) patterns can be helpful for classification of the disease. In this study, we analyzed the impact of the mutational status of the genes encoding the main enzymes responsible for 5mC and 5hmC production, DNMT3A and TET2, on its expression level and enzymatic activity as well as its effect on the methylation pattern of particular gene promoters and most importantly on the survival of patients.

Peripheral blood samples from 110 AML *de novo* patients and 15 healthy control individuals were studied. Global DNA cytosine methylation and hydroxyl-methylation content, was determined from Peripheral Blood Leukocytes (PBL) genomic DNA by using the Methyl Flash™ Methylated DNA 5-mC and 5-hmC Quantification kits. DNMT3A and TET2 expression was evaluated by RT-qPCR. DNA from PBL was used to amplify by PCR the genomic regions of DNMT3A hotspot R882A and TET2 exons 6 to 10, sequencing the PCR amplified products by the Sanger method. Methylation patterns of 18 particular gene promoters were evaluated by pyrosequencing after DNA conversion with sodium bisulphite, and its transcriptional expression levels by RT-qPCR.

Here we demonstrate that AML patients manifest altered levels of 5mC and 5hmC in PBL, and a highly variable expression of DNMT3A and TET2 transcripts. We found a mutation prevalence of 2.7% for DNMT3A and 11.8% for TET2 in Mexican population with this disease. The presence of mutations in these genes could have an impact on the survival rate of the AML patients, since average overall survival in

individuals with mutation in DNMT3A (mDNMT3A), was only 4 months. Additionally, we showed that mutations may cause irregular DNA methylation patterns and transcriptional expression levels in a group of 18 particular genes known to be involved in AML pathogenesis.

Our findings suggest a possible interaction between AML prognosis and the two main enzymes that govern the dynamics of DNA methylation. Furthermore, alterations of these enzymes are responsible for affecting methylation patterns in particular gene promoters and more importantly may influence patient survival.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos la medicina ha luchado contra el cáncer, sin embargo, el conocimiento acerca de sus características biológicas, así como el tratamiento exitoso, más allá de la intervención quirúrgica temprana son en realidad producto de los avances científicos de la segunda mitad del siglo XX. Dichos descubrimientos comenzaron con la biología celular relativamente simple y con el uso de modelos animales, pero están rápidamente progresando hacia la realización de retratos genómicos altamente específicos de las enfermedades que han permitido el desarrollo de terapias más racionales.

Uno de los primeros descubrimientos sobre la biología misma del cáncer que desencadenó la generación de nuevas modalidades de diagnóstico y tratamiento fueron las observaciones de Theodor Boveri, hace más de 100 años, en las cual encontró que las células cancerosas adquieren anormalidades cromosómicas, lo que dio a entender que el motor subyacente del crecimiento tumoral no es más que el cambio genético<sup>1</sup>, el cáncer es entonces una enfermedad genética.

Posteriormente entre las décadas de 1950 y 1960, múltiples anormalidades cromosómicas fueron descritas en los cariotipos de células leucémicas y otras células cancerosas, sin embargo, su causa y significado se mantuvieron como desconocidos. Sin duda el siguiente gran avance fue la identificación de una anormalidad cromosómica asociada de manera constante con un tipo de cáncer, dicho descubrimiento corresponde a David Hungerford y Peter Nowell los cuales lograron asociar la presencia del cromosoma Philadelphia a la Leucemia mieloide crónica, cabe mencionar que el nombre de esta alteración cromosómica se debe a la ciudad donde trabajaban sus descubridores<sup>2</sup>.

Curiosamente el cromosoma Philadelphia fue considerado en un inicio como una deleción parcial del cromosoma 21, sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos de tinción cromosómica permitió que Janet Rowley lo identificara tal como

lo conocemos en la actualidad, como una translocación cromosómica recíproca entre los cromosomas 9 y 22<sup>3</sup>. Posterior al descubrimiento de la translocación se encontró que la consecuencia a nivel molecular de dicha alteración cromosómica es la generación de un gen fusionado BCR-ABL y por lo tanto de una proteína quimérica, donde la cinasa ABL1 ganaba función. Comúnmente el descubrimiento de estos conocimientos básicos no es considerado un cambio importante, sin embargo, es justamente esto lo que cambió las reglas del juego ya que esta secuencia de descubrimientos biológicos básicos culminó en la orientación terapéutica más exitosa para la leucemia mieloide crónica y de la leucemia linfoblástica aguda positivas para el cromosoma Philadelphia, esto mediante el uso de pequeñas moléculas inhibitoras específicas de la cinasa ABL<sup>4</sup>.

Aunque posteriormente los genes fusionados resultantes de translocaciones fueron descubiertos en sarcomas y muchos otros tipos de cáncer<sup>5</sup>, los primeros en ser identificados a nivel molecular fueron los presentes en cáncer de células sanguíneas: la translocación t(8;14) presente en el linfoma de Burkitt<sup>6</sup>, y la translocación t(14;18) presente en linfoma folicular<sup>7</sup>, en ambos casos la consecuencia a nivel molecular es la desregulación en la expresión de un oncogén ya que esta queda bajo el control del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, un gen de expresión constitutiva<sup>5</sup>. El descubrimiento de estos mecanismos cambió la perspectiva del cáncer como solo una enfermedad de proliferación compulsiva, pero además ofreció nuevas estrategias de diagnóstico y terapéutica.

Lo anterior es un solo un ejemplo de cómo dentro de la historia de la investigación del cáncer el estudio de las leucemias ha permitido el avance no solo en el tratamiento de dicho tipo de cáncer sino también del concepto mismo del conjunto de enfermedades que agrupamos bajo el nombre de cáncer. Es cierto también que hay elementos de serendipia en la historia de éxito de la investigación de la leucemia. Por ejemplo, la identificación temprana de las translocaciones cromosómicas y los genes de fusión en la leucemia dependió de la relativa



simplicidad de las alteraciones genéticas en este tipo de tumores líquidos, en comparación con marcada complejidad de dichas alteraciones en los carcinomas. Sin embargo, el estudio de las leucemias no solo ha aportado la detección de translocaciones como un parámetro en el diagnóstico y tratamiento de múltiples tipos de cáncer, ya que, como abordaremos más adelante, la clasificación actual de las leucemias ha aportado la detección de translocaciones mediante técnicas como la hibridación fluorescente in situ (FISH) la detección de lesiones genéticas mediante PCR, la inmunofenotipificación de los blastos e incluso datos fenotípicos que aún están por implementarse, como la presencia de alteraciones epigenéticas<sup>8</sup>.

### **1.1. Leucemia**

La leucemia es descrita comúnmente como una proliferación neoplásica generalizada de leucocitos inmaduros provenientes de medula ósea, que pueden propagarse a sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo, hígado, sistema nervioso central y otros órganos. Por lo que se sabe, esta patología ha acompañado a la humanidad desde sus comienzos, sin embargo, la primera descripción con la que contamos corresponde a Peter Cullen, quien reportó en 1811 un paciente con sangre con apariencia de leche<sup>9</sup>, esta fue seguida a una descripción mucho más completa de Alfred Velpeau en 1825<sup>10</sup>. En este informe Velpeau proporcionó un informe detallado de sus hallazgos en un florista de 63 años de edad, reportando *post mortem*, una consistencia de la sangre similar a la papilla y esplenomegalia.

Los reportes anteriores no llamaron la atención y fue hasta 1845, cuando el patólogo Rudolf Virchow<sup>11</sup>, con apenas 24 años, publicó un análisis patológico de la sangre de una mujer de 50 años, con lo que el nombre “*weisses blut*” o “*leuka imie*”, acuñando así el termino actual con el que describimos dicha enfermedad, leucemia, el cual proviene de las raíces griegas *leukos* y *hemia* que significan literalmente sangre blanca. Curiosamente, aunque la primera descripción de un caso de leucemia data de antes de 1850 solo se pueden encontrar menos de 1000 manuscritos sobre esta enfermedad entre 1850 y 1950, lo que contrasta con los más

de 170.000 manuscritos sobre el tema que se publicaron en 1950-2000, cuando comenzó la era moderna del diagnóstico y la terapia<sup>11</sup>.

Actualmente sabemos que la enfermedad descrita por Virchow corresponde a una leucemia de tipo crónica puesto que el paciente había fallecido por una enfermedad crónica no descrita de 1 a 2 años de duración. La leucemia aguda se describió cerca de 25 años después, cuando se notó que los pacientes con “sangre blanca” fallecían con rapidez, después de una enfermedad debilitante y prolongada<sup>12</sup>. Fue hasta 1877 cuando Paul Ehrlich desarrollo una técnica de coloración que permitió la evaluación microscópica de los leucocitos y estableció que la leucemia era consecuencia de un aumento de los corpúsculos blancos<sup>12</sup>. Fue hasta 1900 que se estableció que las leucemias agudas y crónicas involucraban tipos diferentes de leucocitos<sup>12</sup>. En las leucemias crónicas, la sangre blanca estaba formada por células maduras, mientras que las leucemias agudas involucraban células inmaduras de origen mieloide o linfoide o *blastos*. Este descubrimiento fue la puerta de entrada a la clasificación del conjunto de enfermedades llamadas leucemia, pues los clínicos se dieron cuenta que para maximizar la eficacia de las terapias disponibles y generar nuevas terapias se requiere de una clasificación óptima de los pacientes, siendo más relevante la generación de subgrupos que presenten un pronóstico clínicamente distinto.

## **1.2. Clasificación de las leucemias**

Las leucemias pueden dividirse en enfermedades agudas y crónicas sobre la base de sus signos y síntomas, y por el tipo celular involucrado. Sin embargo, la discriminación entre ellas es menos clara ahora debido al desarrollo de una gama amplia de tratamientos eficaces.

Las leucemias agudas se caracterizan por el comienzo abrupto de los signos clínicos (infección, hemorragia y palidez) y síntomas (fatiga, debilidad, dolor óseo y articular), en este caso la muerte se produce en el transcurso de meses si no se comienza con el tratamiento<sup>12</sup>. Estas leucemias agudas afectan tanto a niños como a adultos. En términos globales los recuentos de leucocitos periféricos pueden estar

aumentados, disminuidos o dentro de los límites de referencia, si bien en los casos típicos se encuentran aumentados. Para la subclasificación de esta leucemia es necesario la cuantificación del número de blastos, en el caso de la clasificación franco-anglo-estadounidense (FAB) se requiere que estos constituyan al menos el 30% de las células nucleadas en medula ósea<sup>12</sup>, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó el porcentaje de blastos a 20% ya sea en sangre periférica (SP) o en medula ósea (MO)<sup>12</sup>. Por último, la anemia normocítica, la neutropenia y la trombocitopenia también son características distintivas de las leucemias agudas.

Las leucemias crónicas se caracterizan por el comienzo insidioso de los signos (palidez, aumento del tamaño del bazo, el hígado o ambos, pérdida de peso) y síntomas (debilidad, fatiga depresión), la muerte por lo general se produce años después del diagnóstico<sup>12</sup>. Las leucemias crónicas se producen principalmente en adultos, aunque existen casos raros de formas juveniles. Los recuentos leucocitarios pueden encontrarse disminuidos, aumentados o dentro de los límites de referencia, si bien por lo general se encuentra más elevados que los observados en las leucemias agudas. La MO se encuentra infiltrada por un número aumentado de células maduras o con contrapartes reconocibles de maduración normal. A diferencia de las leucemias agudas, en los pacientes con leucemia crónica en un comienzo se observan recuentos de plaquetas normales o aumentados que en la evolución posterior de la enfermedad desarrollan trombocitopenia. Por último, en estas leucemias es muy común la presencia de anemia.

La clasificación de las leucemias requiere de una investigación completa de las células involucradas. Como mínimo, el examen microscópico de la SP recolectada de manera cuidadosa, brinda el diagnóstico de leucemia aguda o crónica. La información que no puede proporcionar un examen completo de SP implica las subcategorizaciones de los linfocitos en el caso de las leucémicas linfoblasticas y la subcategorización de los mielocitos presentes en las leucemias mieloblasticas.

Este proceso de clasificación también requiere material recolectado con cuidado mediante aspirado y biopsia de medula ósea. El material obtenido del aspirado comúnmente debe dividirse en cantidades suficientes para la utilización de técnicas histoquímicas de rutina (técnica de Romanowsky), estudios citoquímicos y estudios inmunológicos, como la inmunofenotipificación mediante citometría de flujo y citogenética. Por su parte el tejido obtenido a partir de biopsia debe evaluarse por técnicas de coloración histológica de rutina, como hematoxilina y eosina, estudios de microscopia electrónica y diagnóstico molecular.

Históricamente las leucemias agudas también se dividieron desde el punto de vista citomorfológico en leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA), esto con base en el parecido morfológico de los blastos con los mieloblastos o los linfocitos inmaduros normales (linfoblastos). Hasta hace algunos años la piedra angular del diagnóstico era la observación al microscopio de las características morfológicas de muestras de medula ósea mediante el uso de la técnica de Romanowsky<sup>12</sup>. Sin embargo, en la actualidad los estudios de citoquímica, citogenética e inmunofenotipificación complementan la evaluación microscópica de los blastos, e incluso los datos más recientes sugieren que la identificación de anomalías genéticas específicas serán el futuro de la subclasificación<sup>12</sup>.

### **1.3. Morfología**

El uso de la observación microscópica fue el paso inicial para la diferenciación entre LMA y LLA, sin embargo, como Frederick Gunz mencionó, *“Si bien el acto simple de observar una célula nunca perderá su importancia, es probable que el uso combinado de todas las herramientas disponibles en la actualidad brinde conocimientos nuevos”*<sup>13</sup>. En realidad, las características morfológicas que las diferencian son sutiles. Por lo general los linfoblastos son más pequeños que los mieloblastos, si bien en realidad tienen dos o tres veces el tamaño de un linfocito normal. Los linfoblastos tienen citoplasma escaso azul con la cromatina distribuida de manera uniforme. Su núcleo contiene pocos nucléolos.

Los mieloblastos son células más grandes con núcleos más destacados. Su citoplasma es moderado y más gris que el de los linfoblastos. La cromatina es homogénea y finamente granular. Los mieloblastos suelen tener dos o más nucléolos destacados. Los cuerpos de Auer (inclusiones fusiformes de color rosa o rojo, que se conforman de derivados de gránulos azurofilos) pueden verse en el citoplasma de cualquier subtipo de LMA.

Si bien estos estudios morfológicos han permitido clasificar a los blastos en diferentes subtipos morfológicos según el sistema de clasificación de la FAB, en la actualidad es claro que además de la gran disparidad que se puede generar en esta clasificación, dependiente del observador, en general el sistema brinda poca información pronóstica<sup>12</sup>.

#### **1.4. Leucemia Mieloide Aguda**

Históricamente la leucemia mieloide aguda es uno de las mejores muestras de la dificultad de establecer un pronóstico de los pacientes con leucemia. Este tipo de cáncer que se caracteriza por la infiltración de médula ósea, sangre y otros tejidos por células proliferativas, clónales, anormalmente diferenciadas y ocasionalmente mal diferenciadas, hace 50 años era considerado prácticamente incurable; sin embargo la investigación y el mejoramiento de los sistemas de clasificación así como la generación de nuevos factores pronóstico, ha permitido que en la actualidad la remisión de los pacientes con LMA sea de entre el 35 y el 40% en el caso de pacientes de 60 años o menos, y de entre el 5 y el 15% en pacientes de más de 60 años de edad<sup>14</sup>.

En el caso específico de la leucemia mieloide aguda la incidencia anual a nivel mundial es de 3.5 casos por cada 100,000 habitantes, representando la leucemia más común en adultos<sup>15</sup>. En el caso de México el registro epidemiológico de neoplasias malignas (RHNM) reporta una incidencia anual de 0.7 pacientes por cada 100,000 habitantes al año<sup>16</sup>, y a pesar de que es considerada una enfermedad

de adultos mayores debido a que la edad media al diagnóstico es de 64 años<sup>15</sup>, en nuestro país existen reportes de incidencia en edades cercanas a los 45 años<sup>16</sup>.

La presentación clínica de un paciente con LMA es inespecífica y refleja en general la producción disminuida de los elementos celulares normales de la médula ósea. La mayoría de los pacientes presenta un recuento total de leucocitos entre 5,000 y 30,000/mm<sup>3</sup>, pero pueden ser tan bajos como 1,000 o tan altos como 200,000/mm<sup>3</sup>. En el 90% de los pacientes se pueden encontrar mieloblastos en SP<sup>12</sup>. La anemia, trombocitopenia y la neutropenia dan lugar a los hallazgos clínicos de palidez, fatiga, confusión, hemorragias y fiebre con infecciones. Además, también es frecuente encontrar menciones de coagulación intravascular diseminada y algunas otras anomalías hemorrágicas, sobre todo en ciertos subtipos<sup>12</sup>.

El 25% de los pacientes presenta dolor óseo y articular como síntomas iniciales. La esplenomegalia afecta a la mitad de todos los pacientes con LMA, pero el aumento de los ganglios linfáticos es raro. Otras anomalías de laboratorio observadas con frecuencia en los pacientes con LMA son niveles elevados de lisozima, hiperuricemia, hiperpotasemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia.

### **1.5. Clasificación de la LMA**

Morfológicamente los blastos de la LMA son células de tamaño variable, tan pequeños como un linfocito (9µM) o tan grandes como un monocito (18µM). El núcleo se muestra igualmente variable en cuanto a su tamaño y forma, y usualmente contiene varios nucléolos. Los blastos de la LMA expresan antígenos de superficie que podemos encontrar en las células mieloides inmaduras normales, incluyendo CD13, CD33 y CD34<sup>17</sup>. Algunos otros marcadores que comúnmente se expresan en este tipo de neoplasias dependen del subtipo morfológico de la LMA, es decir del estado de diferenciación en el que se encontraba la célula que se transformó, por ejemplo: si la hematopoyesis se bloqueó durante la diferenciación hacia

megacariocito los blastos expresaran CD41a y CD61, mientras que si el bloqueo ocurrió en la diferenciación hacia monocitos los marcadores que se encontrarán serán CD4, CD14 y CD11b, o por ejemplo si la transformación ocurrió durante la eritropoyesis los blastos serán positivos para los marcadores CD36 y CD71. Además de estos marcadores en algunas ocasiones pueden expresar marcadores aberrantes, por ejemplo, expresar marcadores específicos de linfocitos T y B como TdT (deoxinucleotidil-transferasa terminal), HLA-DR, CD7 y CD19. Incluso en casos raros los blastos pueden mostrar características morfológicas e inmunofenotípicas de ambos linajes tanto mielóide como linfóide lo que dificulta su clasificación; en estos casos la leucemia suele ser clasificada como de fenotipo mixto lo cual por lo general es de mal pronóstico<sup>18</sup>.

Debido a la complejidad de esta patología, a través del tiempo se han desarrollado diferentes esquemas de clasificación para esta enfermedad basados en la etiología, morfología, inmunofenotipo y genética. En 1970 la LMA fue clasificada de acuerdo al sistema de clasificación de la organización Franco-Americo-Británica (FAB) la cual usa principalmente criterios principalmente morfológicos, tinciones policromáticas e inmunofenotipo, los cuales permiten identificar 8 principales subtipos de LMA (M0-M7) (Tabla 1).

Por su parte la organización mundial de la salud (OMS) generó una clasificación que sustituyó a la de la FAB en la mayor parte de los países de primer mundo, representando en la actualidad el principal sistema de clasificación a nivel mundial en la actualidad. Esta clasificación fue actualizada en 2009 e identifica 7 subtipos de LMA: (1) LMA con anomalías genéticas recurrentes (*RUNX1-RUNX1T1* t(8;21)(q22;q22), *CBFB-MYH11* Inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), *PML-RARA* t(15,17)(q22;q12), *MLL* 11q23) y con mutaciones en Nucleofosmina 1 (NPM1) y CEBPA); (2) LMA con displasia multilineaje; (3) neoplasias mieloides asociadas al tratamiento; (4) LMA no clasificada (NOS) la cual es muy similar a la clasificación de la FAB; (5) Sarcoma mielóide; (6) Proliferaciones mieloides

relacionadas con síndrome de Down; y (7) neoplasia de células dendríticas plasmacitoides (Tabla 2).

Tabla 1 Clasificación de las leucemias mieloide agudas según la FAB<sup>15</sup>

	<b>Morfología</b>	<b>Histoquímica</b>	<b>Inmunofenotipo</b>
<b>M0</b>	Indiferenciada	MPO+ <3%; PAS y esterasa-	HLA-DR, CD13, CD33, CD34; CD7 y Tdt+/-
<b>M1</b>	Mieloide	MPO+ <3%; PAS y esterasa-	Similar a M0 excepto CD25+/-
<b>M2</b>	Mieloide con diferenciación	MPO+ >10%; PAS y esterasa-	HLA-DR; CD13, CD33; CD34+/-; CD15+
<b>M3</b>	Promielocítica	MPO++; PAS y esterasa-	HLA-DR-; CD13, CD15 CD33, CD34 +/-
<b>M4</b>	Mielomonocítica	MPO y esterasa +; PAS-	HLA-DR, CD14, CD15+/-; CD4+/-; CD34+/-;
<b>M5</b>	Monocítica	MPO-; PAS y esterasa +	CD33; CD13; CD11b
<b>M6</b>	Eritroleucemia	PAS ++; MPO y esterasa-	HLA-DR, CD13, CD33+/-; glicoforina A
<b>M7</b>	Megacarioblástica	PAS+/-; MPO y esterasa -	HLA-DR, CD34; CD33+/-; CD41, CD61, glicoproteína plaquetaria +

Por último basado solo en la etiología, la LMA puede dividirse en 3 distintas categorías: (1) LMA secundaria (s-LMA) la cual engloba a los pacientes con antecedentes de síndrome mielodisplásico o cualquier otro desorden mieloproliferativo; (2) LMA relacionada con el tratamiento (t-LMA) las cuales corresponden a las leucemias asociadas a la exposición previa a quimioterapia y las LMA *de novo*.



Tabla 2 Clasificación de las leucemias mieloide agudas según la OMS<sup>19</sup>.

<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>
<b>LMA con anomalías genéticas recurrentes</b>	LMA con t(8;21)(q22;q22), LMA (CBF $\alpha$ )/ETO
	Leucemia aguda promielocítica, LMA con t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR $\alpha$ ), y variantes (FAB M3)
	LMA con eosinófilos anormales en médula ósea: inv(16/p13q22) o t(16;16)(p13;q22), (CBF $\beta$ /MYH11)
	LMA con anomalías en 11q23(MLL)
<b>LMA con displasia multilineal</b>	Seguidas de un síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo
	Sin un síndrome mielodisplásico previo
<b>LMA y síndrome mielodisplásico relacionado con la terapia</b>	Relacionado con agentes alquilantes.
	Relacionado con inhibidores de la topoisomerasa tipo II
	Otros tipos
<b>LMA no clasificado</b>	LMA M0, M1, M2, M4, M5, M6, M7
	Leucemia aguda basófila
	Panmeiosis aguda con mielofibrosis
	Sarcoma mieloide
<b>Mieloproliferación asociada a síndrome de Down</b>	
<b>Neoplasia de células dendríticas plasmacitoides</b>	

### 1.6. Citogenética

La presencia de anomalías cromosómicas no aleatorias (deleciones y translocaciones) han sido identificadas en aproximadamente el 52% de los pacientes adultos con LMA, y además estas alteraciones han sido reconocidas como eventos que inician o promueven la enfermedad<sup>20</sup>. De todas las alteraciones que se han reportado algunas incluyendo (8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12) e

inv(16)(p13.1;q22 ) se han asociado con una remisión más larga así como una mayor supervivencia; mientras que alteraciones en el cromosoma 5 y 7 así como la presencia de cariotipos complejos (más de 3 anomalías cromosómicas en el mismo individuo) se han asociado con una respuesta pobre al tratamiento así como a una supervivencia más corta<sup>15</sup>.

Por otra parte, el restante 40% - 50% de los casos de LMA presenta un cariotipo normal (con el uso de un sistema de bandeado convencional)<sup>21</sup>. De manera general este grupo se considera de un riesgo intermedio, sin embargo, la gran heterogeneidad presente en esta población, ha hecho necesaria la búsqueda de otras estrategias, como el sondeo molecular, para así generar subcategorías de LMA críticas para el pronóstico.

### **1.7. Anormalidades moleculares**

Durante la década pasada múltiples estudios han mostrado la presencia o ausencia de mutaciones en genes específicos o también cambios en la expresión genética, que permitan la clasificación de los pacientes con LMA y sobre todo afectar el pronóstico y el tratamiento<sup>22</sup>. Cabe mencionar que dichas alteraciones son de mayor relevancia para los individuos con LMA que presentan un cariotipo normal. El uso de tecnologías actuales como la secuenciación masiva ha permitido evaluar la frecuencia de estas mutaciones, así como poder identificar si estas mutaciones son simplemente aleatorias o si realmente son mutaciones que dirijan el desarrollo y progresión de la enfermedad, dentro de los genes que más comúnmente se ven alterados en LMA encontramos a NPM1, FLT3, IDH, RUN1, CEBPA y MLL<sup>23</sup>.

Las mutaciones en nucleofosmina 1 (NPM1) son las mutaciones más frecuentes en LMA, presentándose entre un 25 y un 30% de los pacientes con LMA, y con una curiosa predominancia en los pacientes femeninos<sup>24</sup>. La mutación tiene como consecuencia la expresión citoplasmática de la proteína NPM1, lo que lleva a la proliferación descontrolada y al desarrollo de la leucemia<sup>25</sup>. Clínicamente esta mutación se ha asociado con una morfología de monocitos, así como la ausencia

de FLT3-ITD, prediciendo de esta manera un pronóstico favorable a la supervivencia. La razón de esta relación es aún desconocida, pero se ha asociado con una posible quimiosensibilidad<sup>26</sup>. La presencia de esta mutación se ha asociado con otras anomalías como la mutación en IDH, FLT3-TKD entre otras<sup>23</sup>.

Por su parte FLT3 (*FMs-Like Tyrosine Kinase 3*) fue descrita por primera vez en 1991 como un gen fuertemente expresado en células troncales hematopoyéticas, y cuya función estaba relacionada con la proliferación y la supervivencia<sup>27</sup>. Las alteraciones más comúnmente encontradas en este gen son las duplicaciones internas en tándem (ITD), la yuxtaposición del dominio de membrana (JM), y la mutación en el segundo dominio de tirosina cinasa (TKD); estas se pueden encontrar en un 20, 30 y 40% de los pacientes con LMA que presentan un cariotipo normal<sup>28</sup>. En todos los casos estas alteraciones llevan a una activación constante de la señal de FLT3 lo que promueve la proliferación blastica<sup>28</sup>. En cuanto a su función las mutaciones en FLT3-ITD se han asociado con un mayor riesgo, mientras que la relevancia de FLT3-TKD se mantiene aún como controversial<sup>28</sup>.

Por último, la mutación en IDH (*Isocitrate Dehydrogenase*) reportada en LMA lleva a una ganancia de función lo que permite a la enzima convertir  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato. La mutación en este gen se ha reportado en entre un 25 y 30% de los pacientes con LMA que presentan cariotipo normal<sup>29</sup>. Estas mutaciones son encontradas más comúnmente entre pacientes de mayor edad, y debido a su importancia en el inicio y progresión de la LMA en la actualidad existen proyectos que lo han utilizado como blanco terapéutico<sup>30</sup>.

### **1.8. Pronóstico y estratificación por riesgo**

La edad, la presencia de alteraciones cromosómicas, así como las aberraciones moleculares actualmente se mantienen como las herramientas más importantes para el pronóstico en la LMA. En 2010 la Red Europea de Leucemias (ELN, por sus siglas en inglés) creó un esquema de clasificación como un esfuerzo para estandarizar la estratificación de riesgo en los pacientes con LMA incorporando

todas las anomalías citogenéticas y moleculares que se conocían hasta el momento<sup>31</sup>. Usando dicha clasificación los pacientes son clasificados en uno de los 4 grupos: favorable, intermedio 1, intermedio 2 y adverso (Tabla 3).

*Tabla 3 Clasificación de las leucemias mieloides agudas según la European Leukemia Net (ELN)<sup>19</sup>. \* Un cariotipo complejo es definido cuando tres o más cromosomas presentan anomalías.*

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Subgrupo</b>
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 mutado NPM1 sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD <sub>low</sub> mutación bi-alélica en CEBPA
<b>Intermedio</b>	<i>Mutación en NPM1 y FLT3-ITD<sub>high</sub> Wild-type NPM1 sin FLT3-ITD o sin FLT3-ITD<sub>low</sub> (sin lesión genéticas de riesgo) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A. Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas.</i>
<b>Adverso</b>	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearrreglo t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1) 25 or del(5q); 27; 217/abn(17p) Cariotipo complejo, cariotipo monosomal, Wild-type NPM1 y FLT3-ITD <sub>high</sub> , RUNX1 mutado, ASXL1 mutado, TP53 mutado.

La importancia de estas estratificaciones por riesgo radica en que dependiendo de esta clasificación puede definirse la estrategia terapéutica a seguir; sin embargo, aún en la actualidad los marcadores con los que se cuentan son insuficientes, por lo que la búsqueda de nuevos marcadores es un área de constantes avances dentro de la investigación en este tipo de enfermedades.

En los últimos años las investigaciones han mostrado que existen otros tipos de modificaciones que no se habían considerado con anterioridad, pero que juegan un papel muy importante en el inicio y la progresión del cáncer. Estos cambios corresponden a mecanismos epigenéticos, los cuales de manera normal son

modificaciones que representan un mecanismo estable, mitóticamente perpetuado, capaz de regular el fenotipo y la expresión génica.

### **1.9. Epigenética**

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables en la expresión génica que no generan cambios en la secuencia primaria del DNA, dichos mecanismos son esenciales para la regulación transcripcional, el desarrollo y diferenciación de las células y organismos. Los tres principales eventos implicados en la regulación epigenética son: la expresión de microRNAs, las modificaciones post-transcripcionales en las histonas y la metilación del DNA.

Los microRNAs (miRNAs) son una gran familia de RNAs cortos no codificantes (17-25 nucleótidos)<sup>32</sup>, los cuales se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos como el desarrollo celular, la diferenciación, apoptosis y proliferación<sup>33</sup>, así como el crecimiento tumoral, metástasis y resistencia a la terapia<sup>34</sup>. Interesantemente la mayoría de los miRNAs se han localizado en regiones genéticas asociadas a cáncer o en regiones frágiles del genoma<sup>35</sup>. En la actualidad las bases de datos más importantes como miRBase, reportan alrededor de 1600 secuencias de precursores de miRNAs en humanos y alrededor de 2024 secuencias de miRNAs maduros, sin embargo, el número incrementa constantemente.

A pesar de que los miRNAs fueron descritos inicialmente como mecanismos que regulan la expresión génica a la baja inhibiendo directamente la traducción del RNA mensajero (mRNA) mediante su secuestro o su degradación directa, en la actualidad sabemos que algunos miRNAs pueden regular el incremento de la traducción de su mRNA blanco<sup>33</sup>. Los miRNAs son altamente estables, y constituyen un tipo particular de moléculas de RNA que son menos susceptibles a la degradación en comparación a muchas otras, posiblemente debido a su tamaño tan corto, a su particular biogénesis y naturaleza o posiblemente a su fuerte asociación con los complejos protéicos necesarios para el silenciamiento de los mRNAs (RISC)<sup>35</sup>. Recientemente se han detectado miRNAs en circulación en una

forma muy estable, ya sea asociados con proteínas o con complejos de lipoproteínas de alta densidad, unidos a vesículas, como los exosomas, microvesículas o hasta en cuerpos apoptóticos.

Por otro lado, más allá de la clásica función del octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4) y los 146 pb de DNA unidos a estas (gracias a la histona H1) como la estructura básica para la compactación de la cromatina, la evidencia actual muestra que las modificaciones postraduccionales, y las variantes de estas histonas, juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. De hecho, la identificación de estos cambios en distintas enfermedades, ha incrementado el entusiasmo de investigaciones que buscan utilizar a las histonas como un biomarcador.

Las modificaciones en las histonas han sido consideradas modificaciones epigenéticas ya que estas pueden inducir un cambio en el estado de la cromatina. Las modificaciones postraduccionales más comunes en ellas, como la acetilación, metilación y fosforilación, ocurren principalmente en los dominios protéicos presentes en la región N terminal. Estas modificaciones cambian la estructura del nucleosoma y la hipótesis es que este código presente en las histonas regula la apertura y cierre de la cromatina en una región específica<sup>36</sup>. Adicional a lo anterior conocemos actualmente la existencia de variantes de histonas en posiciones específicas, las cuales regulan la formación de nucleosomas mas o menos estables que los normales, por lo cual junto con la modificaciones específicas pueden regular la formación de zonas relajadas de cromatina (eucromatina) que permitan la unión de factores de transcripción o de represión, o por lo contrario formar zonas compactas de cromatina (heterocromatina), las cuales eviten el acceso a factores de transcripción o de represores de la misma.

La dificultad de este mecanismo recae en comprender la compleja e intrincada interacción entre las diferentes modificaciones en histonas y sus variantes y como la ruptura del balance de estas puede participar en condiciones patológicas.

### **1.10. Metilación del DNA**

La metilación del DNA es el cambio epigenético más estudiado; esta modificación consiste en la adición covalente de un grupo metilo en el quinto carbono de un residuo de citosina, generando de esta manera una 5 metil-citosina (5mC). La metilación del DNA desempeña un papel importante en diferentes procesos, como la inactivación del cromosoma X y la represión de retro-transposones, entre algunos otros<sup>37</sup>.

En el caso particular de los mamíferos, la metilación está restringida a las citosinas que se encuentran seguidas por una guanina, a lo que se le conoce como dinucleótido CpG. Del total de estos sitios en el caso específico del humano cerca del 80 % se encuentran metilados y solo un pequeño grupo de secuencias cortas y conspicuas de dinucleótidos CpG conocidos como islas CpG se encuentran desmetilados. Estas regiones se encuentran comúnmente cercanas al sitio de inicio de la transcripción, lo cual ocurre aproximadamente en el 70% de los promotores génicos<sup>38</sup>.

La regulación de la expresión génica mediada por la metilación sucede principalmente por dos mecanismos: El primero es de manera directa en la que la metilación previene la unión de los factores de transcripción manteniendo apagada la transcripción de los genes blancos; y el segundo método es una inhibición indirecta en la que la metilación en el DNA recluta a dos tipos de proteínas, las de unión a metilación (MBD) y a las desacetilasas de histonas (HDAC), las cuales se encargan de modificar el estado de compactación de la cromatina generando heterocromatina y por lo tanto reprimiendo la expresión génica<sup>39</sup> (Ilustración 1).

La metilación de DNA es un proceso altamente dinámico, que en la actualidad es mejor comprendido ya que hasta hace algunos años no se conocían bien a las DNA metil-transferasas (DNMTs), que son las enzimas encargadas de la metilación

del DNA. Sin embargo, el proceso de desmetilación era totalmente desconocido o se atribuía a un proceso completamente pasivo debido a una baja actividad de las DNMTs; esto cambió con el descubrimiento de las proteínas de la familia TET (del inglés, *ten eleven translocation*) capaces de modificar las metilcitosinas y generar 5-hidroxi-metilcitosina y comenzar así el proceso de desmetilación.

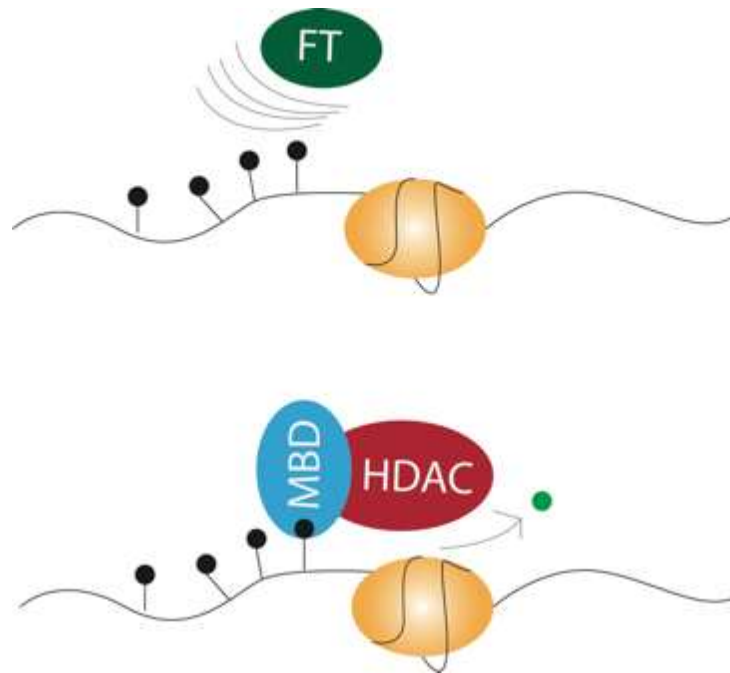


Ilustración 1. Mecanismos generales de regulación de la expresión génica mediante metilación

### 1.10.1. DNMTs

Hasta el momento y en el caso del genoma de los mamíferos las DNMTs son las únicas enzimas que se conoce que median la transferencia de un grupo metilo desde S-adenoxilmetionina (SAM) hacia una citosina<sup>40</sup>. De esta familia de enzimas sólo 3 son activas metabólicamente en el caso de los mamíferos: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B; el cuarto miembro DNMT3L no presenta actividad enzimática, pero si parece funcionar más bien como una proteína reguladora. De esta manera los cuatro miembros de esta familia de enzimas resultan esenciales no solo para



establecer un patrón de metilación específico sino también para su mantenimiento a través de la replicación.

DNMT1 es la metiltransferasa de mantenimiento, por lo que su función es preservar los patrones de metilación durante la división celular, esta enzima se expresa durante la replicación celular, específicamente durante la fase S del ciclo celular y prefiere unirse comúnmente a dinucleótidos CG presentes en sitios metilados o hemimetilados, esto a través de su interacción con el factor UHRF1<sup>41</sup>.

DNMT1 fue la primera DNA metiltransferasa identificada en organismos eucariontes, sin embargo, su estructura cristalográfica fue resuelta muy recientemente<sup>42</sup>. En dicho reporte se describe que el complejo activo de DNMT1 se encuentra conformado por dicha enzima unida a SAM y que este puede reconocer un sitio CpG no metilado, por lo que la regulación de esta metiltransferasa *de novo* debe ser aún más compleja, ya que la inhibición de esta actividad es indispensable para su función como metilasa de mantenimiento. Dos puntos aquí requieren ser resueltos, primero la estructura cristalográfica de DNMT1 unida a DNA hemimetilado y segundo que sea definida la preferencia intrínseca de las DNMTs hacia ciertas secuencias de DNA, ya sean estas CpG hemimetilados, CpG no metilados o incluso como algunos autores afirman, substratos que no sean sitios CpG. En cuanto al último punto, ya se ha reportado que el reclutamiento de DNMT1 hacia sitios CpG hemimetilados requiere del dominio SER de UHRF1<sup>43</sup>.

Con respecto a la enzima DNMT3, al ser esta la responsable de la metilación *de novo*, su reclutamiento debe llevarse a cabo hacia sitios CpG no metilados; para lograr esto diversos modelos han propuesto una explicación para el su reclutamiento a una región genómica específica. Estos modelos involucran tanto propiedades inherentes de DNMT3, como la influencia de factores externos que operen de manera separada o de manera sinérgica<sup>44</sup>. Los tres miembros de la subfamilia DNMT3 poseen dominios que parecen ser importantes para este fenómeno, ya que tanto DNMT3A como DNMT3B contienen un dominio PWWP y un dominio PHD-like

ADD, así como un dominio catalítico, mientras que el miembro no activo catalíticamente hablando, DNMT3L no presenta dichos dominios. Esto sugiere que dichos dominios deben estar implicados tanto en la actividad catalítica como en la búsqueda de la secuencia blanco. Por último a pesar de que DNMT3L no presenta actividad catalítica, se ha mostrado que es capaz de unirse a DNMT3A y aumentar su capacidad de metilación *de novo*, esto mediante su incremento de unión a SAM<sup>45</sup>.

Trabajos previos han mostrado que el acarreo de DNMT3A y DNMT3B hacia una secuencia blanco de metilación *de novo* podría estar determinado por las secuencias cercanas al sitio CpG<sup>44</sup>. Esta idea es soportada por el hecho de que estudios previos han demostrado que las DNMTs tienen la capacidad no solo de reconocer a otro tipo de dinucleótidos no-CpG, como los dinucleótidos CA, sino también de metilar en dichos sitios<sup>46</sup>. Algunas observaciones sugieren otros mecanismos para acarrear las metilasas *de novo* a su sitio blanco, ya que dichas DNMTs presentan una capacidad de lectura de algunas modificaciones en las histonas. De hecho tanto DNMT3A como DNMT3B se han encontrado ancladas a nucleosomas específicos donde los niveles de metilación son particularmente altos<sup>47</sup>, e incluso algunos trabajos han propuesto algunas modificaciones particulares que podrían ser candidatos a blancos de unión para DNMT3A; por ejemplo Dhayalan y colaboradores reportan que H3K36me3 es capaz de unirse al dominio WWP de DNMT3A e incrementar la actividad de metilación del DNA<sup>48</sup>. A pesar de lo anterior, la búsqueda de los mecanismos que permiten la metilación *de novo* aún en la actualidad sigue siendo un campo muy activo dentro de la epigenética.

Durante mucho tiempo la metilación del DNA se ha considerado como un marcador epigenético altamente estable, postulando que esta modificación epigenética es permanente post-diferenciación. Sin embargo, en la última década, diferentes estudios han revelado que la metilación del DNA es un proceso altamente dinámico<sup>49</sup>. Uno de los procesos que claramente se desconocía era la eliminación

de los grupos metilos agregados a las citosinas por parte de las DNMTs, es decir la desmetilación.

El primer mecanismo que se propuso para explicar la existencia de fenómenos de metilación diferencial en tejidos, dependientes de los procesos de desarrollo, fue un mecanismo de desmetilación pasivo. Este proceso se refiere a la pérdida de los grupos metilo de las 5mC debido a la inhibición, eliminación o exclusión nuclear de las DNMTs después de la replicación del DNA y tras rondas sucesivas de división celular; sin embargo este modelo pasivo y relativamente lento no es capaz de explicar la pérdida de metilación del DNA de células diferenciadas no replicativas, así como en células germinales y durante el desarrollo embrionario donde se ha reportado la pérdida de metilación de manera muy rápida. La enzima encargada de la desmetilación activa del DNA se mantuvo elusiva durante mucho tiempo, hasta el descubrimiento de la familia de proteínas TET (Ten Eleven Translocation)<sup>40</sup>.

### **1.10.2. TET**

La descripción original de esta familia de proteínas con actividad enzimática fue realizada en el 2009, dándoles el nombre de proteínas TET debido a que fueron encontradas en casos extraños de leucemia tanto mieloides como linfoides que presentaban la translocación  $t(10;11)(q22;q23)$ <sup>50</sup>. Dicha translocación fusionaba el gen MLL1 del cromosoma 10 con el gen TET1 localizado en el cromosoma 11, sin embargo, la presencia de esta translocación en dichos pacientes parece no ser de relevancia clínica. En realidad esta familia de enzimas llamó la atención cuando se descubrió que los 3 miembros de esta familia en mamíferos (TET1, TET2 y TET3) son dioxigenasas dependientes de Fe y 2-oxoglutarato que son capaces de catalizar la oxidación sucesiva de las 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC)<sup>51</sup>. Estas tres formas oxidadas de la 5mC fueron posteriormente encontradas en numerosos tejidos<sup>51</sup>.

Dichos productos de la oxidación de 5mC parecen funcionar como intermediarios en la conversión de 5mC a citosinas no modificadas, por lo que potencialmente proveen el primer paso en los mecanismos de desmetilación activa del DNA, y aunque esta familia de proteínas en la actualidad se ha descrito con funciones en diferentes procesos biológicos, incluyendo la regulación epigenética de la transcripción génica, la embriogénesis, la función de las células troncales y cancerosas, el mecanismo mediante el cual llevan a cabo estas funciones es aun pobremente comprendido. Los miembros de la familia TET consisten de proteínas grandes (~180 a 230 kDa) multidominio. Los tres miembros en mamíferos presentan un dominio conservado DSBH (del inglés, *Double-Stranded  $\beta$ -Helix*), un dominio rico en cisteínas y un dominio de unión a sus cofactores Fe(II) y 2-oxoglutarato (2-OG). En cuando al dominio catalítico varios estudios han demostrado que este se une a citosinas en un contexto CpG y a pequeñas regiones flanqueantes que pueden ser específicas y no específicas, lo que ha complicado que hasta el momento se cuente con un mecanismo específico que dirija el posible mecanismo de desmetilación<sup>52</sup>.

Gracias al descubrimiento de estas enzimas comprendimos que la colocación y eliminación del grupo metilo ocurre de una manera cíclica, donde el primer paso implica la colocación del grupo metilo en un contexto CpG, que como ya mencionamos anteriormente, ocurre durante la fase S del ciclo celular gracias al acarreamiento de las DNMT por parte de algunos factores como UHRF1, lo que permite mantener los patrones de metilación a través de la división celular; sin embargo el siguiente paso de este proceso, que implica la eliminación de la 5mC es aún un proceso que sigue bajo estudio constante<sup>53</sup>. Debido a lo anterior han surgido múltiples modelos al respecto; algunos de ellos sugieren que dicho proceso comienza con la generación de la 5hmC a través de la oxidación generada por las TET, esta 5hmC entonces puede ser aminada por algún miembro de la familia de proteínas AID/APOBEC generando así a la 5hmU el cual es objeto de la actividad de la enzima TDG (thymine–DNA–glycosylase), lo que da inicio al proceso de reparación por escisión del DNA (BER) reemplazando así al 5hmU con una citosina no metilada; alternativamente la 5hmC puede ser modificada nuevamente por la

actividad de las TET generando así a la 5fC o a 5caC las cuales son citosinas modificadas que pueden ser reconocidas de manera específica por TDG<sup>53</sup> (ilustración 2).

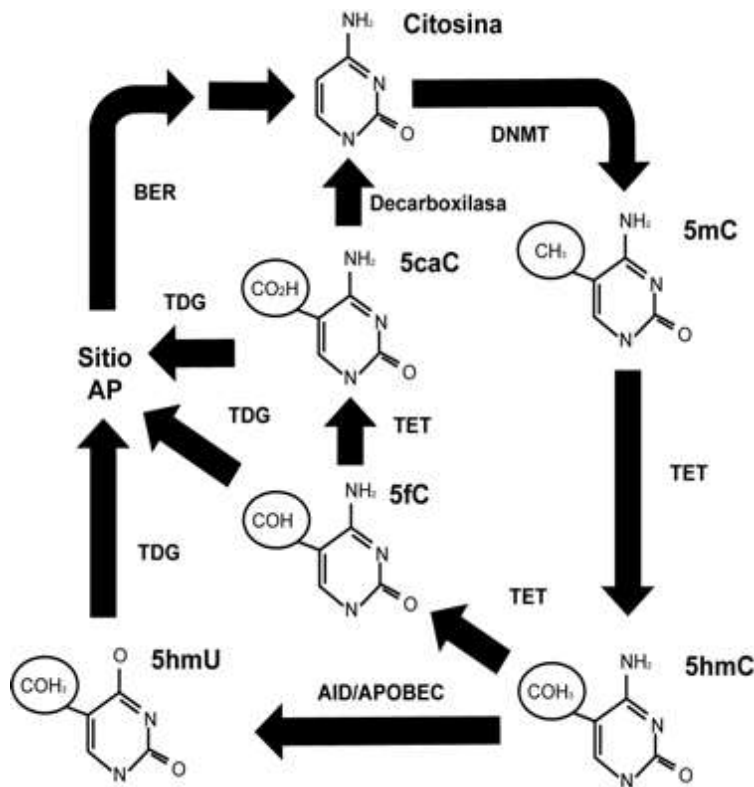


Ilustración 2. Mecanismo activo de desmetilación mediado por la actividad de las enzimas de la familia TET.

Algunos otros autores consideran que este proceso de desmetilación es aún más complejo y que en realidad la oxidación de la 5mC puede promover la desmetilación de dos maneras, una activa y una pasiva. El mecanismo pasivo al igual que los mecanismos propuestos anteriormente a la descripción de las proteínas TET, implica una disminución o abatimiento total de la actividad de las DNMTs, pero en este caso implican la presencia de 5hmC; esta teoría se fundamenta en los trabajos donde *in vitro* se ha mostrad que la actividad de DNMT1 disminuye dramáticamente cuando el DNA substrato contiene 5hmC<sup>54</sup>. A pesar de que lo anterior muestra sentido, es importante considerar que el proceso podría ser más complejo, ya que la actividad de otras DNMTs también está implicada, por

ejemplo, DNMT3A2 y DNMT3B, que se ha reportado previamente son capaces de metilar DNA que contenga 5hmC<sup>55</sup>.

De esta manera los mecanismos pasivos, tanto dependientes como independientes de TET parecen ser insuficientes para poder llevar a cabo el proceso de desmetilación, por lo que el principal mecanismo participante debe ser activo. Esto significaría la actividad enzimática de TETs sobre las bases 5mC y su posterior procesamiento por el sistema BER, que aunque en la actualidad es mejor comprendido, reportes recientes sugieren que algunos de sus pasos son más complejos de lo que se pensaba anteriormente, ya que se ha demostrado que el factor TDG no puede actuar directamente sobre la 5hmC, sino que su presencia acarrea a los sistemas de reparación, para que estos reconozcan a la 5fC y 5caC<sup>56</sup>.

Al igual que con las DNMTs, queda clara la importancia de su actividad en la dinámica de metilación del DNA; sin embargo, al igual que con las DNMTs, el conocer los mecanismos mediante los cuales las proteínas TET son reclutadas a un sitio particular del genoma para poder así regular los patrones de metilación específica, es aún un tema en investigación constante.

Aunque en primera instancia la actividad de las enzimas TET puede ser estimulada o inhibida por la presencia de distintos metabolitos, cofactores y modificaciones postraduccionales, la participación de sus dominios proteicos particulares parece ser fundamental. TET1 y TET3 son reclutados a los sitios blanco en el genoma gracias a su unión al DNA mediante su dominio CXXC, sin embargo en el caso de la estructura de TET2 este no revela la presencia de ningún dominio de unión a DNA, por lo que potencialmente este debe ser reclutado al DNA mediante un mecanismo independiente a un dominio CXXC, por ejemplo mediante una dinámica dependiente de diferentes factores de unión a DNA, lo que hace de TET2 una posible responsable de la regulación de la expresión génica donde la expresión diferencial física y temporal de los factores de reclutamiento sea la que modula la actividad de TET a un *loci* u otro.

## 1.11. DNMT y TET en neoplasias

A pesar de que la dinámica de metilación del DNA muestra ser un proceso altamente complejo, este parece estar regido principalmente por la actividad de dos familias de proteínas, las DNMTs y las proteínas TET. En la última década, múltiples grupos de investigación han reportado alteraciones en el nivel de expresión y/o mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas en diferentes neoplasias, siendo las más comunes las hematológicas. Tanto en la leucemia mieloide aguda como en el síndrome mielodisplásico, las alteraciones que sobresalen en estas familias génicas son la presencia de mutaciones en los genes DNMT3A y TET2.

### 1.11.1. DNMT3A

La descripción de mutaciones en DNMT3A en LMA es en realidad un evento reciente, y los reportes de su incidencia varían mostrando el 4.1% en la población japonesa, 9% en la China, y entre el 20 y el 22 % en población norteamericana<sup>57</sup>. Las alteraciones reportadas van desde mutaciones somáticas, cambios del marco de lectura, pérdida del sentido, corrimiento del marco de lectura, entre otras, sin embargo, la mutación somática en el codón que codifica para el aminoácido R882 se muestra mucho más recurrente en los pacientes con LMA<sup>57</sup>. En cuanto a la consecuencia de la mutación R882, se ha demostrado *in vitro* que genera una disminución de hasta el 50% de la actividad enzimática de DNMT3A, aunque esto no se ha logrado corroborar *in vivo*, ni en una comparación con una muestra sin alteraciones en DNMT3A<sup>58</sup>. Un análisis de la estructura protéica ha permitido detectar que el aminoácido 882 participa en su interacción con el DNA, así como en el proceso de homodimerización de esta misma, lo cual es un paso fundamental para su actividad<sup>58</sup>.

En el aspecto clínico, esta mutación se ha asociado en LMA con un peor pronóstico de supervivencia global y una rápida progresión, encontrando que aquellos pacientes con mutaciones en DNMT3A experimentan una supervivencia global de 12.3 meses, mientras que aquellos que carecen de dicha mutación sobreviven en promedio 41 meses<sup>57</sup>. Interesantemente el mecanismo por el cual estas mutaciones

en DNMT3A promueven el desarrollo y/o progresión de la leucemia, son hasta ahora desconocidos, por lo que el estudio de alteraciones moleculares consecuencia de estas mutaciones, se vuelve de vital importancia para la mejor comprensión de dicha patología.

### **1.11.2. TET2**

Diferentes trabajos han demostrado mediante diferentes metodologías la adquisición de alteraciones como eliminaciones, inserciones, mutaciones sin sentido, ó corrimiento del marco de lectura; estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gen, lo cual ha dificultado la formación de grupos, sin embargo, se ha observado que las mutaciones más recurrentes se presentan en tripletes que codifican para aminoácidos evolutivamente conservados y en dominios importantes para la función de dicha proteína<sup>59</sup>.

Esta alta heterogeneidad en la mutaciones presentes en el gen que codifica para TET2, han vuelto altamente complejo saber qué consecuencias tienen dichas modificaciones, sin embargo en los reportes más recientes de mutaciones TET2 en malignidades hematológicas, se observa que existen 3 exones que presentan una mayor incidencia de mutaciones, el exón 3, 5 y 7. Estos exones se encuentran en la región que codifica para una zona de la proteína que contiene aminoácidos evolutivamente conservados entre los 3 miembros de la familia que además codifica para un dominio activo de la proteína, lo cual coincide con algunos trabajos que sugieren que estas lesiones en TET2 tienen como resultado la pérdida de su función. En LMA la incidencia de este tipo de mutaciones en TET2 se reportan desde un 12% hasta un 32%. Existiendo además controversia sobre el valor pronóstico de dichas alteraciones<sup>59 60</sup>.

La hipótesis de la existencia de un patrón de metilación aberrante en la LMA, data de 1983, sin embargo esta “aberración” va más allá de un estado de hipometilación, ya que parece existir un estado contradictorio, pues si bien existe una disminución global de metilación, también es común encontrar en la LMA un



aumento en la metilación en islas CpG<sup>61</sup>; este último fenómeno no parece tener una explicación sencilla. Sin embargo la descripción de alteraciones en enzimas encargadas del proceso de demetilación del DNA (TET2) podría explicar la acumulación de 5mC en ciertas regiones del genoma, y probablemente de manera conjunta la alteración en DNMT3A y TET2 (ya sea a nivel de expresión, o de mutaciones que afecten su actividad enzimática), puedan explicar este estado contradictorio de metilación aberrante presente en la LMA, mostrando así una cooperación oncogénica de estos dos genes, como ya se ha sugerido en algunos otros tipos de cáncer<sup>62</sup>.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

De acuerdo a lo anterior y considerando que la leucemia mieloide aguda es una enfermedad que actualmente representa un problema de salud pública no solo en México sino a nivel mundial, la búsqueda del mecanismo molecular de la alteración en las dos principales enzimas que rigen la dinámica de la metilación del DNA (TET2, DNMT3A), es de gran importancia, no solo para comprender el papel etiopatológico que dichas alteraciones de manera individual juegan en la leucemogénesis, sino también para buscar una interacción entre dichos mecanismos, que lleve a la mejor comprensión del complejo y contradictorio estado aberrante de metilación que caracteriza a la leucemia mieloide aguda.

### **3. OBJETIVOS**

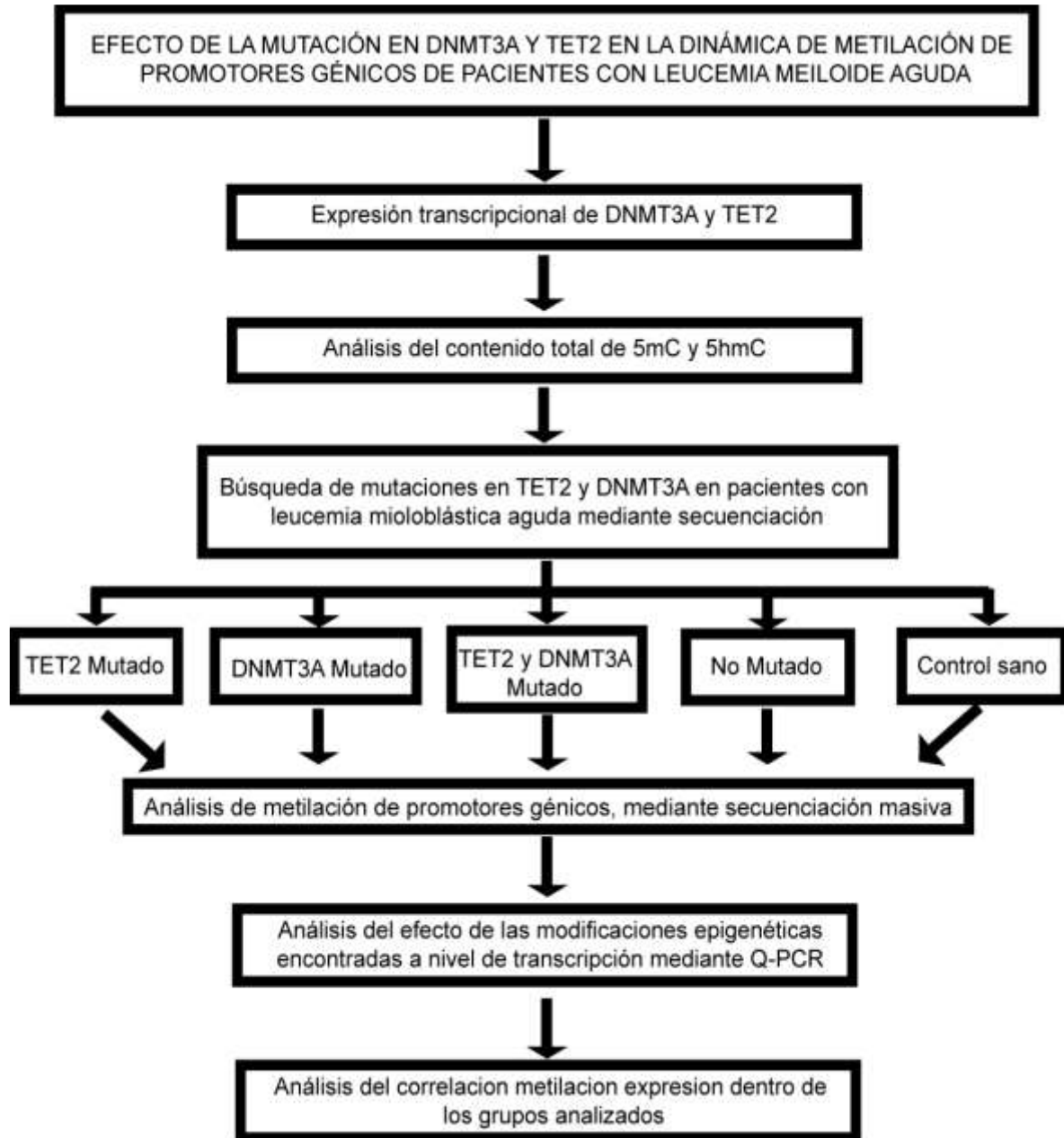
#### **3.1. Objetivo general**

Identificar modificaciones en el patrón de metilación (5mC y 5hmC) en promotores génicos, en pacientes con leucemia mieloide aguda con mutaciones en DNMT3A y TET2.

#### **3.2. Objetivos Particulares**

- Identificar mutaciones en DNMT3A y TET2 en pacientes con leucemia mieloide aguda, mediante secuenciación.
- Evaluar el contenido total de 5mC y 5hmC en pacientes con leucemia mieloide aguda con y sin mutaciones en DNMT3A y TET2.
- Evaluar la expresión transcripcional de DNMT3A y TET2 en pacientes con leucemia mieloide aguda con y sin mutaciones en DNMT3A y TET2.
- Identificar mediante secuenciación masiva cambios en el patrón de metilación a nivel de promotor en pacientes mutantes para DNMT3A, TET2.
- Analizar el efecto de la modificación en el patrón de metilación de los promotores, a nivel transcripción, mediante Q-PCR.

#### 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 5. CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes Mexicanos con diagnóstico *de novo* de leucemia mieloide aguda.
- Edad entre 25 y 70 años.
- Sin alteraciones cromosómicas (AF9-MLL t(9;11), AML1-ETO t(8;21) y PML-RAR $\alpha$  t(15;17)).

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Muestras de tejido humano

Las muestras de sangre periférica (SP) fueron colectadas de un total de 250 pacientes con diagnóstico *de novo* de leucemia mieloide aguda, esto durante la evaluación clínica de rutina para el diagnóstico durante un periodo de 3 años. Las muestras se obtuvieron de dos hospitales de concentración nacional: el Servicio de Hematología del Hospital General Centro Médico Nacional “La Raza”, e igualmente del Servicio de Hematología del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”. En el caso de las muestras control provenientes de individuos sanos, estas fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. En todos los casos las muestras de SP fueron tratadas con EDTA como anticoagulante, posteriormente estas fueron centrifugadas en un gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del productor, gracias a lo cual se logró colectar el plasma rico en leucocitos necesario para los siguientes análisis.

### 6.2. Determinación de alteraciones cromosómicas más comunes

Con la finalidad de descartar un estado general de inestabilidad genómica, se evaluaron las alteraciones cromosómicas más comúnmente presentes en LMA, siendo estas la translocaciones t(9;22), t(8;21) y t(15;17). Esto se logró mediante el diseño de un set de 3 pares de oligonucleótidos que amplificaran los genes fusionados resultado de las tres translocaciones: AF9-MLL en el caso t(9;22), AML1-ETO en el caso de t(8;21) y PML-RAR $\alpha$  en el caso de t(15;17). Dichos oligos fueron diseñados para poder amplificar juntos dentro de una misma reacción, esto con la finalidad de poder utilizarlo como un estuche multiplex. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes:

AF9-MLL	Fw	5'-	
GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAA-3',	Rev	5'-	
CTAGGTATGCCTTGTCACATTCACC-3';	AML1-ETO	Fw	5'-

CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3', Rev 5'-AGAGGAAGGCCCATGCTGAA-3';  
PMLA-RAR $\alpha$  Fw 5'-CAGTGTACGCCTTCTCCATCA-3', Rev 5'-  
GCTTGTAGATGCGGGGTAGA-3'.

### 6.3. Extracción de RNA total y RT-qPCR

El RNA total de los leucocitos de SP fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor, y con un tratamiento posterior con DNAsa RQ1 (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. El RNA obtenido se cuantificó mediante un NanoDrop (thermofisher). Se usó un total de 2 $\mu$ g de RNA total para realizar la reacción de transcripción reversa usando como primer oligo (dT) 15 (Promega) y reverso transcriptasa M-MLV (Promega). El cDNA obtenido de dichas reacciones fue utilizado para las reacciones de PCR-tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes evaluados (Tabla 1). Previo a la evaluación por tiempo real, cada uno de oligonucleótidos fue probado en PCR punto final.

Para la evaluación mediante RT-qPCR se siguieron las instrucciones del proveedor del Maxima SYBR Green qPCR kit (Thermo). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Step One (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las mismas en todos los casos, usando un paso inicial de 15 min a 95°C, después 40 ciclos con un primer paso de 95°C 15 segundos y un segundo paso de 60°C 1 min. Por último se realizó una curva de disociación desde 60° hasta 95° para observar el número de amplificadas generados durante la PCR. Con los datos de Ct arrojados por el software se realizó un análisis de 2- $\Delta\Delta$ Ct con la siguiente fórmula:

$$2^{-[(CT_{gen\ de\ interes} - CT_{gen\ constitutivo})_{problema} - (CT_{gen\ de\ interes} - CT_{gen\ constitutivo})_{control}]}$$

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos para evaluación mediante RT-qPCR.

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
DNMT3A	TGCTTTCTGGAGTGTGCGT	TCTTCCTTAATGGCTGCCTG
TET2	AAGCAAGATCCCAAGGAAGTT	GCAAATGAGACTCCAGTTTC
BCL11A	CACGCCTGGGATGAGTGC	ACTGGTGAATGGCTGTTTGC
SLC26A3	GGACCAGCCAATCAATACCA	CCAACGATATACACATCTACC
NR4A3	ACTCGCTCTAAAGACGGAAC	GGAGGCTGAGAGTGTAGGA
OLIG2	CTCCTCAAATCGCATCCAGA	AGAAAAAGGTCATCGGGCTC
PGRMC1	AAACTGCTGAAGGAGGGGG	CAGAGTGGACTGTTACAAATG
EFNA1	AGGAGTTCAAAGAAGGACACA	GACCGATGCTATGTAGAACC
LHX9	CTGGGAGTGGACATCGTCA	CTGGTGATGCTTGAAAGAGG
PTCH1	CGGTGTGAGAGGAGGGATT	CAACCAGTTCTCTTCAAGCA
GSTP1	GGCGGGCAAGGATGACTAT	GATCAGCAGCAAGTCCAGC
HIC1	GGAGTTCTGGAGTCGGAAG	AAATGGAAGCGGCTCTGGAA
HOXB3	TTCTCTCAGTTTGAAGAAGC	CAGGCGACAAATCTCCCCT
LAG3	CTTCTTGGAGCAGCAGTGTA	AGAAACAGCAGGAGGTGGC
TBX1	AAGATAGCGAGAAATATGCCG	CAGTCCTCAGGGTCACAGT
P15	GGACACGCTGGTGGTGCT	CAGGCTTACAGGCTTTCCG
P16	CCCCTACCGTAAATGTCCAT	TCAAGAGAAGCCAGTAACCC
HOXA5	CACATCAGCAGCAGAGAGG	GGTAACGGTTGAAGTGAAC
ABCG2	CACCTTATTGGCCTCAGGAA	CCTGCTTGAAGGCTCTATG
ACTIN	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG

#### 6.4. Extracción de DNA y evaluación de la metilación e hidroximetilación global

Se extrajo el DNA genómico de los leucocitos de los pacientes con LMA y los individuos sanos usando una extracción estándar fenol-cloroformo. Las concentraciones totales de 5mC y 5hmC se determinaron gracias al uso de los estuches *Methyl Flash TM Methylated DNA 5-mC and 5-hmC Quantification kits (colorimetric)* (EpigenTek), usando las instrucciones del proveedor.



## 6.5. PCR y secuenciación de TET2 y DNMT3A

El DNA genómico de los leucocitos de sangre periférica (LSP) fu obtenido mediante el método de fenol-cloroformo. Posteriormente se usaron cebadores específicos para amplificar mediante PCR las regiones a secuenciar de DNMT3A y TET2 (Tabla 2). Los productos de la amplificación fueron posteriormente secuenciados utilizando el método de Sanger, se utilizó tanto el cebador Forward como el Reverse para realizar dicha secuenciación.

## 6.6. Metilación de DNA gen especifica

Para analizar la metilación en promotores génicos específicos se procedió a realizar una conversión del DNA genómico con bisulfito. Para esto se utilizó el kit EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del proveedor. Con este DNA se procedió a determinar la metilación de dinucleótidos CpG en islas cercanas al sitio de inicio de la transcripción de genes específicos, para lo cual se usó pirosecuenciación post-transformación con bisulfito mediante la técnica Pyromark Q24 instrument (Qiagen). Los oligonucleótidos usados para la PCR y la secuenciación fueron obtenidos a partir de ensayos prediseñados;

Hs_ABCG2_01_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00111321),
Hs_GSTP1_01_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00151809),
Hs_CDKN2B_01_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00039893),
Hs_PTCH1_02_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00144333),
Hs_EFNA1_01_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00005054),
Hs_SCGB3A1_02_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00022694),
Hs_NR4A3_02_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00039004),
Hs_HIC1_14_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00182525),
Hs_TBX1_15_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00200851),
Hs_LHX9_04_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00003318),
Hs_CDKN2A_02_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00139972),
Hs_HOXA5_07_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00029568),
Hs_BCL11A_07_PM	PyroMark	CpG	assay	(Qiagen,	PM00009114),

Hs\_OLIG2\_01\_PM PyroMark CpG assay (Qiagen, PM00083923), Hs\_PGRMC1\_01\_PM PyroMark CpG assay (Qiagen, Hs\_PGRMC1\_01\_PM PyroMark CpG assay), Hs\_HOXB3\_03\_PM PyroMark CpG assay (Qiagen, PM00179256), Hs\_TP73\_01\_PM PyroMark CpG assay (Qiagen, PM00000609), LAG3\_Custom PyroMark Custom assay (Qiagen PMC0085002) and SLC26A3\_Custom PyroMark Custom assay (Qiagen PMC0064997).

Para las reacciones de PCR se usó el estuche comercial PyroMark PCR Kit (Qiagen) el cual utiliza HotStartTaq DNA polymerase, 1X PCR Buffer PyroMark, dNTPs, 1X CoralLoad, MgCl<sub>2</sub> mM, 0.2 uM de cebadores, 1X Q-solution y 20 ng de DNA convertido previamente con bisulfito. Los productos de PCR fueron verificados en cada uno de los casos usando electroforesis capilar con QIAxcel (Qiagen). Para la pirosecuenciación, el producto de PCR fue hibridado con perlas recubiertas de streptavidina y el cartucho de pirosecuenciación fue cargado con los reactivos incluidos en el estuche comercial PyroMark Gold Q24 kit (Qiagen). La pirosecuenciación se realizó en un equipo PyroMarck Q24 y los resultados fueron interpretados usando el software Q24 PyroMark v2.0.6.

*Tabla 5 Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación de DNMT3A y TET2*

<b>Gene</b>	<b>Forward Primer 5'-3'</b>	<b>Reverse Primer 5'-3'</b>
DNMT3A	CTAAGCAGGCGTCAGAGGA	TTTGTGTCGCTACCTCAGTTT
TET2-E6	CATTTCTCAGGATGTGGTCATAG	CCCAATTCTCAGGGTCAGATTTA
TET2-E7	GACTTATGTATCTTTTCATCTAGCT	ACTCTCTTCCTTTCAACCAAAGATT
TET2-E8	ATGCCACAGCTTAATACAGAGTTAG	GTCATATTGTTCACTTCATCTAAGC
TET2-E9	GATGCTTTATTTAGTAATAAAGGCA	TCAACAATTAAGAGGAAAAGTTAGA
TET2-E10	TGTCATTCCATTTTGTCTGGAT	AAATTACCCAGTCTTGCATATGTC

## **6.7. Análisis bioinformático de la metilación diferencial de DNA**

Los análisis de mapa de calor fueron realizados usando R software versión 3.2.4 y mediante Complex Heat map del servidor Bioconductor.

## **6.8. Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados usando el software Prism® v6.0. Los resultados se muestran con promedio y desviación estándar. Se realizó un ANOVA para los análisis estadísticos entre los múltiples grupos, y para confirmar la diferencia estadísticamente significativa entre dos grupos, se realizó un análisis post hoc. Las diferencias estadísticamente significativas fueron definidas con un valor de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Desarrollo de un kit para diagnóstico múltiple de translocaciones por PCR.

Para poder resolver si la alteración en la metilación del DNA que encontremos son resultado o se encuentran asociadas a las alteraciones de expresión o de mutación y no de un estado general de inestabilidad genómica decidimos buscar las alteraciones más comunes en la leucemia mieloide aguda: AF9-MLL t(9;11), AML1-ETO t(8;21) y PML-RAR $\alpha$  t(15;17). Como control positivo para la especificidad en la amplificación de dos pares de cebadores, se utilizó DNA genómico obtenido de líneas celulares que previamente se ha descrito que poseen la translocación correspondiente; la línea THP-1 para el caso de AF9-MLL y la línea celular Kasumi-1 para el caso de AML1-ETO<sup>63 64</sup>. En el caso de PML-RAR $\alpha$  como control positivo se utilizó el DNA genómico de leucocitos provenientes de un paciente que se sabía previamente por cariotipo que presentaba dicha translocación (paciente LR003).

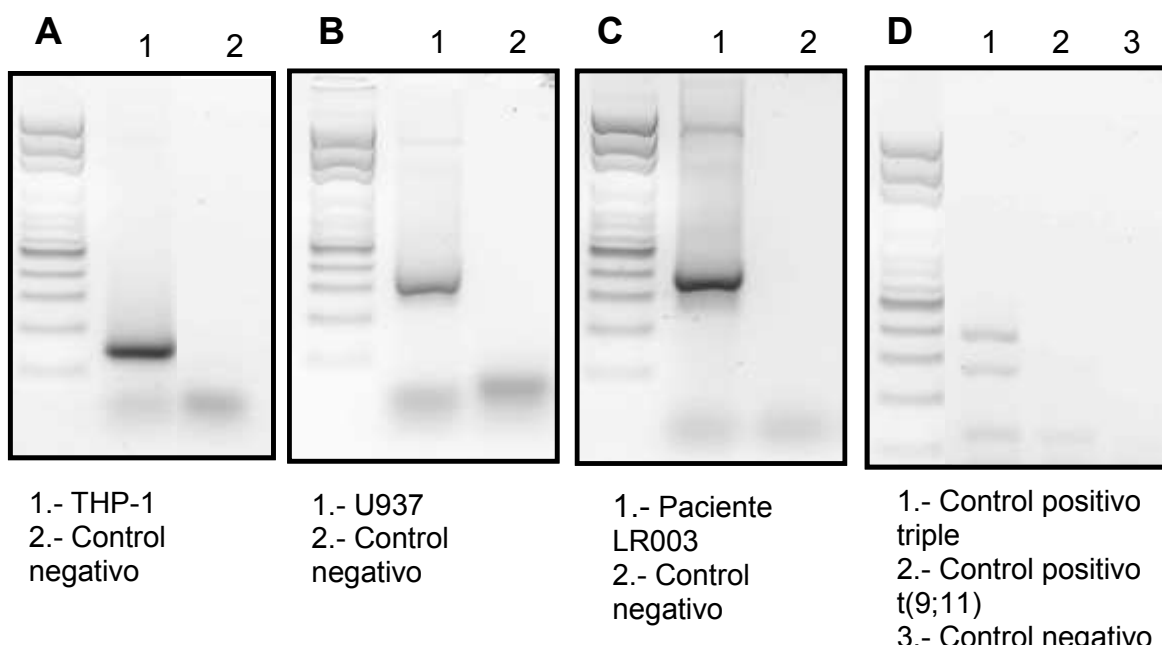


Figura 1 RT-PCR para los productos fusionados resultado de las translocaciones. A. AF9-MLL t(9;11). B. AML1-ETO t(8;21). C. PML-RAR $\alpha$  t(15;17). D. Control triple multiplex para las 3 translocaciones

El tamaño de los amplicones de manera individual fue de 149 pb para AF9-AMLL, 290 pb para AML1-ETO y de 349 pb para PML-RAR $\alpha$ ; dicha diferencia entre los amplicones permitirá discriminar entre la presencia de una y otra translocaciones mediante su migración en un gel de agarosa al 1% (Figura 1). Con la finalidad de poder usar estos oligonucleótidos de manera constante a manera de kit, se decidió clonar el producto amplificado de cada muestra control en el vector pGEM-T Easy, mediante el uso de la enzima de restricción EcoR1. El uso de dichos vectores permitió comprobar la amplificación múltiple de los tres productos fusionados mediante una sola reacción de PCR (Figura 1), esto debido a la diferencia en tamaño de los amplificados, correspondiendo a 145 pb para t(9;11), 281 pb para t(8;21) y 385 pb para t(15;17). Estas diferencias nos permitieron detectar la presencia de cualquiera de los productos en una sola reacción.

Cabe resaltar que los resultados de dicho análisis fueron realizados al momento de la entrega de la muestra, y en un lapso no mayor de 48 hrs, el resultado fue entregado al médico encargado del piso del hospital, por lo que dichos análisis fueron utilizados como parte de los criterios de diagnóstico para los pacientes.

## **7.2. La expresión de DNMT3A y TET2 en pacientes con LMA es altamente variable**

Debido a que DNMT3A t TET2 son las dos principales enzimas que regulan la dinámica de metilación del DNA primeramente cuantificamos los niveles de mRNA de ambos genes a través de RT-qPCR y los comparamos con los niveles de expresión de estos dos genes en individuos sanos, para lo cual utilizamos muestras provenientes de banco de sangre. En los pacientes con LMA detectamos los niveles de expresión de DNMT3A en un rango que va desde 17 veces superior hasta una disminución del 98% de dicho mRNA en comparación al promedio de los individuos sanos (Figura 2A). De manera similar los valores observados para TET2 se muestran altamente variables con un aumento que va desde 35 veces más expresión hasta pacientes que presentan un 90% del mRNA en comparación con lo presente en los individuos sanos (Figura 2B).

### 7.3. Evaluación de la actividad enzimática de DNMT3A y TET2 en pacientes con LMA

Al evaluar la concentración de 5mC y 5hmC en los pacientes con LMA encontramos que de la misma manera que con la cuantificación del mRNA de DNMT3A y TET2 la concentración de estas citosinas modificadas es altamente variable entre los individuos con dicha neoplasia presentando valores de entre 13.4 ng/100ng de DNA y hasta 0.5 ng/100ng de 5mC, lo que representa una alta variación ya que los individuos sanos presentan en promedio una concentración de 2.5 0.5 ng de 5mC por cada 100ng de DNA total. Lo mismo encontramos en el caso de las concentraciones de 5hmC los cuales varían entre valores de 10 ng/100ng de DNA total y 0.4 ng por cada 100ng de DNA total en los pacientes con LMA, mientras que el valor promedio de esta citosina modificada en individuos sanos es de 4.8 ng de 5hmC por cada 100ng de DNA (Figura 3).

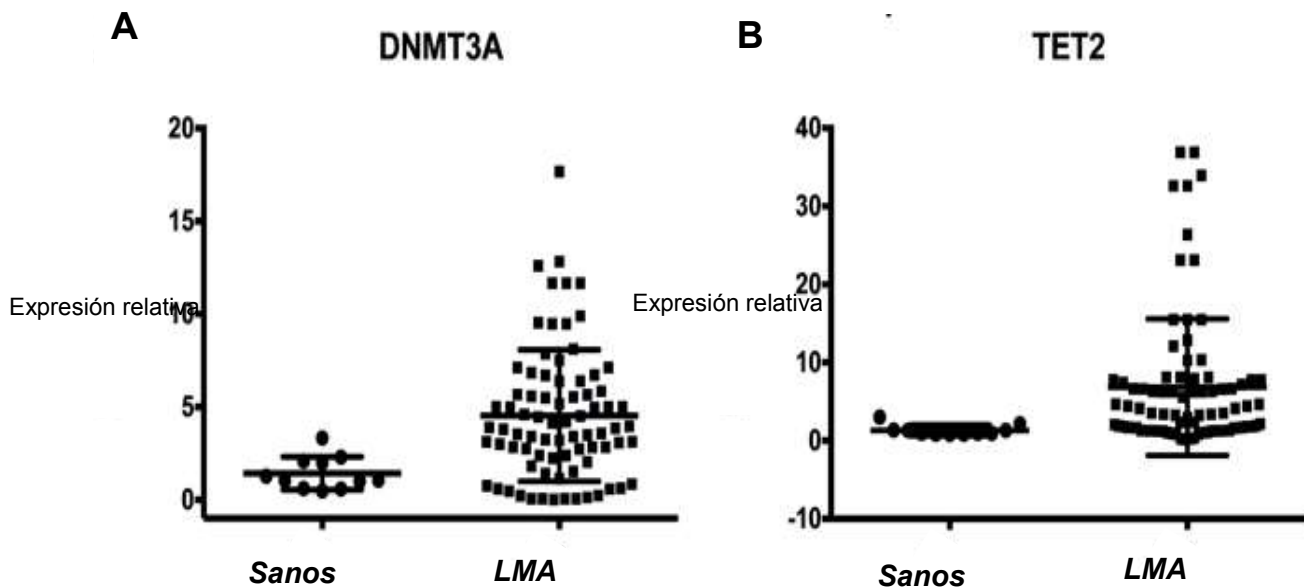


Figura 2. RT-qPCR comparativa entre los individuos sanos y los pacientes con leucemia mieloide aguda para DNMT3A (A) y TET2 (B).

A pesar de esta dispersión en los pacientes, nosotros encontramos que casi en todos los casos existe una clara correlación entre el nivel de mRNA y la actividad enzimática del producto protéico de dicho gen, medida indirectamente por la cuantificación del producto de su actividad enzimática; es decir mediante la cuantificación de 5mC y 5hmC. Sin embargo, a pesar de esta correlación existen algunos pacientes en los que a pesar de tener los valores más altos del nivel de mRNA de DNMT3A, muestran los niveles más bajos de 5mC; así mismo observamos individuos en los que los niveles de 5hmC son más bajos y que contradictoriamente presentan niveles promedio del mRNA de TET2. Esto en conjunto sugiere la presencia de una posible falla en la actividad enzimática de los productos protéicos traducidas de dichos mRNAs.

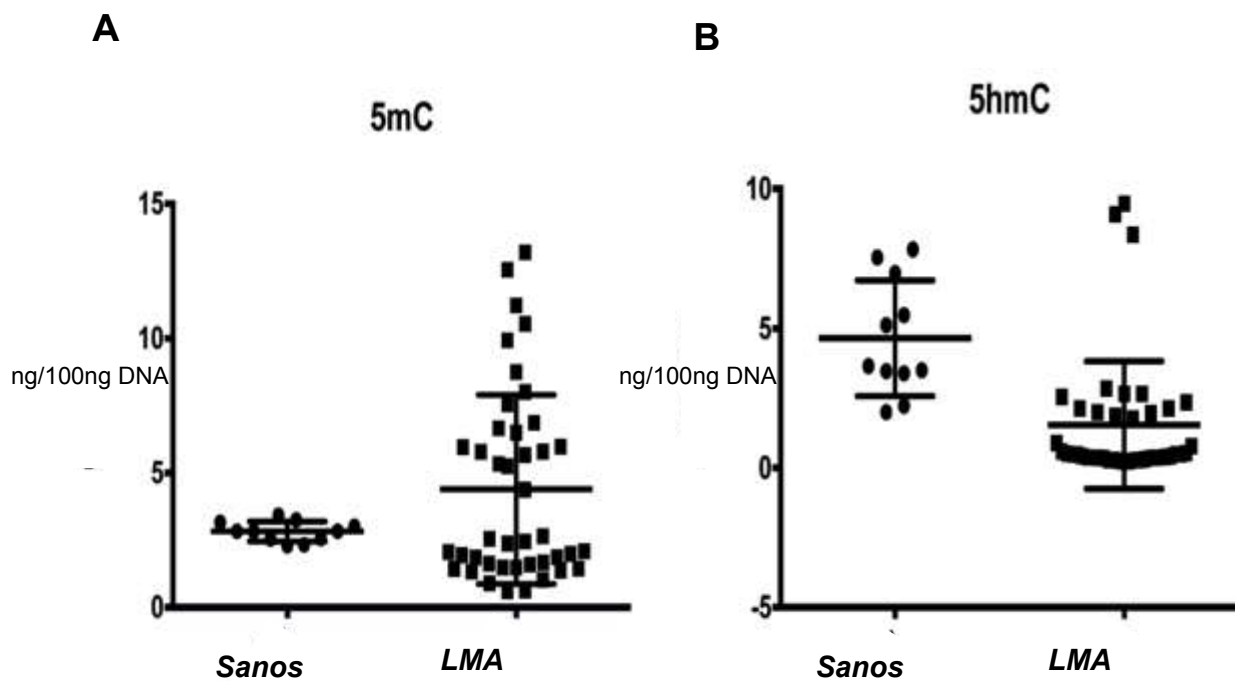


Figura 3. Comparación en las concentraciones de 5mC (A) y 5hmC (B) entre individuos sanos y pacientes con leucemia mieloide aguda.

#### 7.4. Incidencia de mutaciones en DNMT3A y TET2 en pacientes con LMA

Una de las posibles alteraciones en DNMT3A y TET2 que expliquen la disminución en su actividad enzimática a pesar de la presencia de mRNA es la aparición de mutaciones, por lo que decidimos evaluar en el caso de DNMT3A el “hotspot” previamente reportado en dicho gen; este “hotspot” se encuentra en el triplete que codifica para el aminoácido R882<sup>65</sup>. En el caso de TET2 desafortunadamente no existen reportes previos de algún “hotspot” como en el caso de DNMT3A, y la mayoría de los reportes indican la mutación a lo largo de todo el gen. Una revisión bibliográfica de los estudios sobre la presencia de mutaciones en TET2<sup>66 67 68</sup>, sugirió que algunos los exones tienen una mayor incidencia de mutaciones; a partir de ello decidimos evaluar los exones 6, 7, 8, 9 y 10. Estos exones además de ser los que presentan más comúnmente mutaciones, codifican para regiones conservadas entre los miembros de la familia TET2 y parecen participar en la función enzimática de dicha familia<sup>69</sup>.

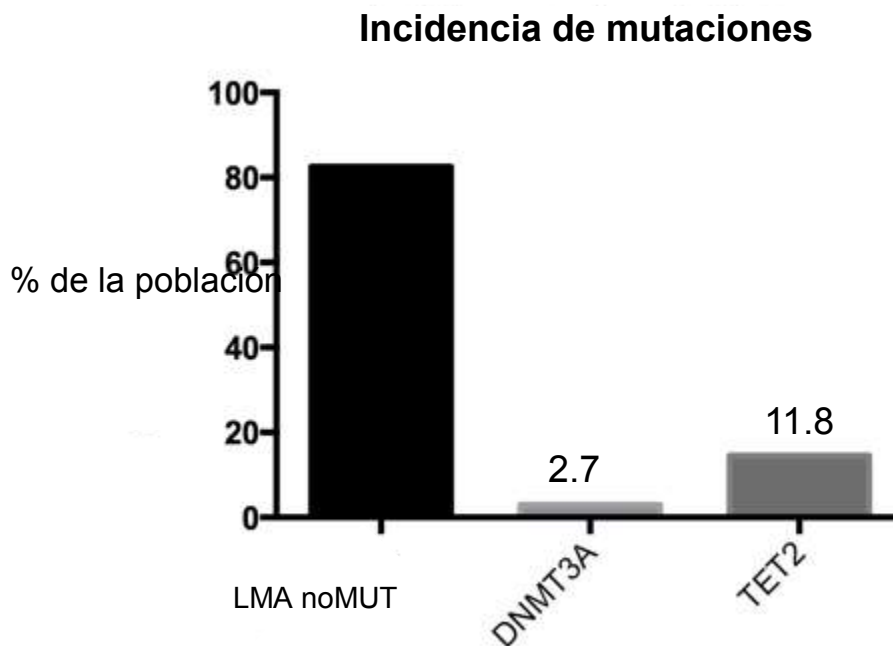


Figura 4. Incidencia de las mutaciones en DNMT3A (R882) y TET2 (Exon6-Exon10).

Una vez evaluada la presencia de mutaciones en los individuos encontramos que la incidencia de mutaciones en DNMT3A en pacientes mexicanos con LMA de



novo y sin translocaciones es de 2.7%, mientras que la incidencia de mutaciones en TET2 corresponde a 11.8% del total de los pacientes con LMA. Esto indica que el 85% de pacientes restantes no muestra ninguna alteración al menos en las regiones génicas que evaluamos (Figura 4).

### 7.5. Los pacientes con mutaciones en DNMT3A y TET2 representan los valores más alterados de 5mC y 5hmC

Para poder saber si la mutación en DNMT3A y/o en TET2 se pueden asociar con la función de su producto protéico, procedimos a buscar dentro de la gran dispersión de datos de concentración de 5mC y 5hmC, donde se encontraba los pacientes que presentaban mutaciones en tanto en DNMT3A como TET2 (Figura 5). Encontramos que los pacientes con mutaciones en TET2 presentan las concentraciones más altas de 5mC, mientras que los individuos con mutaciones en DNMT3A corresponden a los individuos con la menor concentración de 5mC (Figura 5A). En el caso de la concentración de 5hmC tanto los pacientes con mutaciones en DNMT3A como en TET2 presentan las concentraciones más bajas de esta citosina modificada (Figura 5B).

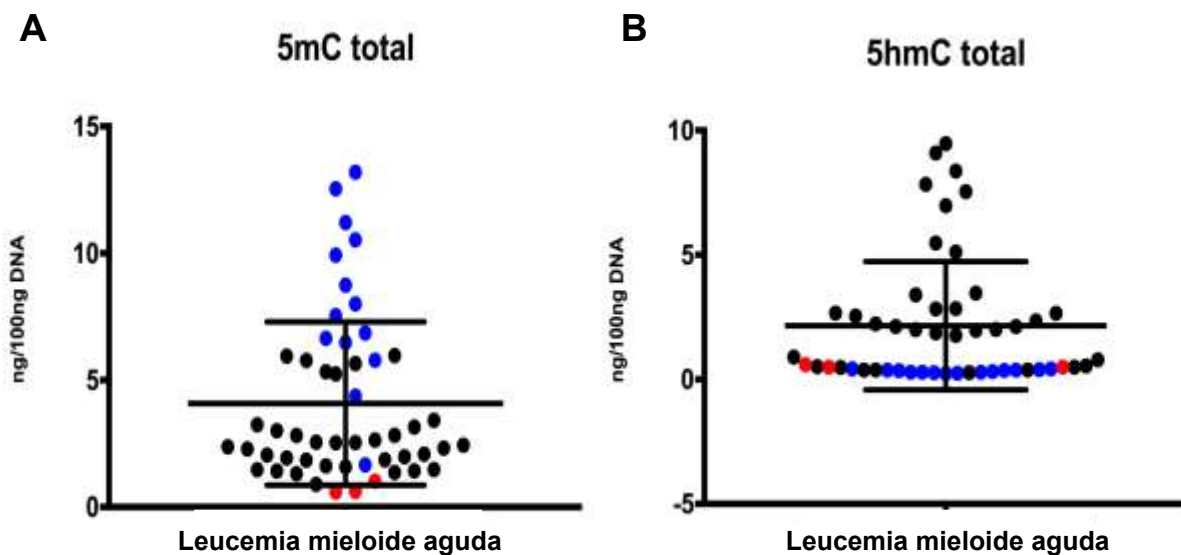


Figura 5. Concentración de 5mC (A) y 5hmC en pacientes con LMA sin mutación (círculos negros), mutantes en DNMT3A (círculos rojos) y mutantes en TET2 (círculos azules).

### 7.6. Los pacientes con mutaciones en DNMT3A y TET2 presentan las concentraciones de mRNA más extremas.

De la misma manera que con la concentración de las citosinas modificadas al identificar los valores correspondientes de mRNA de TET2 y DNMT3A de los individuos con mutaciones en estos genes, encontramos que aquellos individuos con mutación ya sea en DNMT3A o en TET2, presentan los niveles de mRNA de DNMT3A mas altos (Figura 6A), mientras que en el caso de la transcripción de TET2 los individuos mutantes en TET2 presentan niveles promedio, mientras que curiosamente los individuos con mutaciones en DNMT3A representan las concentraciones más bajas de mRNA de TET2 (Figura 6).

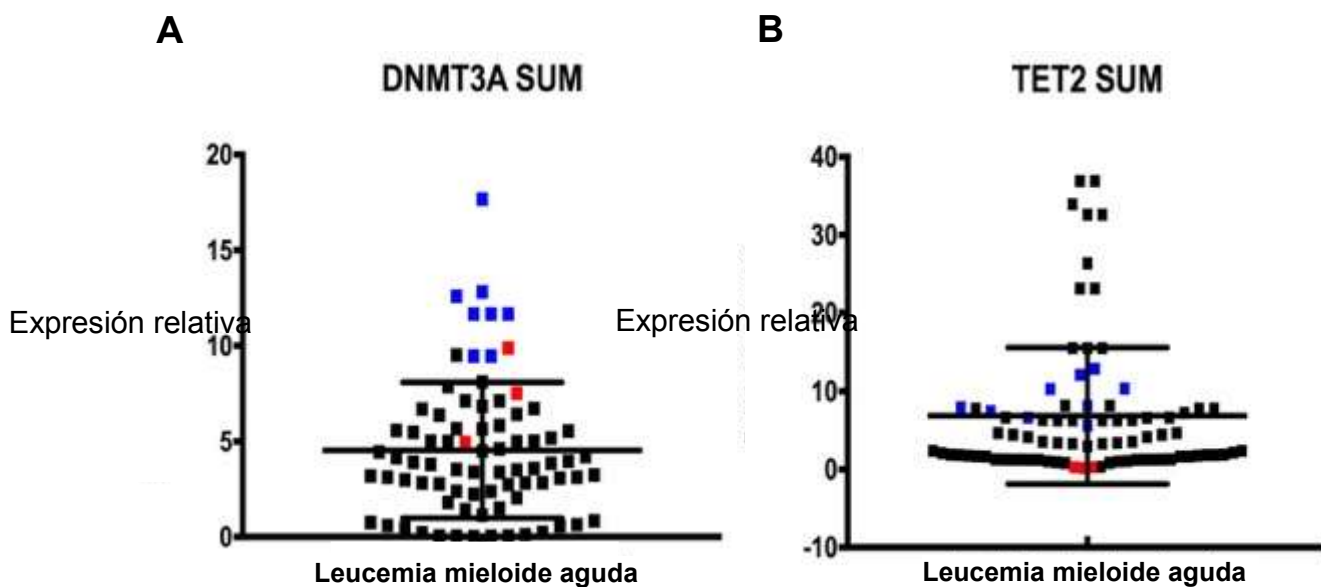


Figura 6. Expresión relativa de DNMT3A (A) y TET2 (B) en pacientes con LMA sin mutación (cuadrados negros), mutantes en DNMT3A (cuadrados rojos) y mutantes en TET2 (cuadrados azules).

### 7.7. Las mutaciones en DNMT3A y TET2 pueden explicar la variación en la concentración de 5mC y 5hmC en pacientes con LMA

Al organizar los pacientes con LMA en grupos basados en su estatus mutacional, y agrupar con base a estos subgrupos la concentración de 5mC y 5hmC se puede observar que el grupo de pacientes con mutaciones en DNMT3A

(mDNMT3A) presentan una concentración promedio de 5ng de 5mC por cada 100 ng de DNA total, lo que representa una disminución estadísticamente significativa de casi el 75% en la concentración de esta citosina modificada en comparación de la concentración observada en individuos sanos y aún la observada en pacientes con LMA sin mutaciones (LMA noMUT) (2.7 ng/100 ng DNA) (p 0.001) (Figura 7A). En cuanto al grupo de pacientes con mutaciones en TET2 (mTET2), estos muestran una concentración promedio de 5mC de 8.2 ng de 5mC por cada 100 ng de DNA total, lo que representa un incremento de un 200% de la concentración de esta citosina en comparación de la presente en individuos sanos (p 0.001) (Figura 7A).

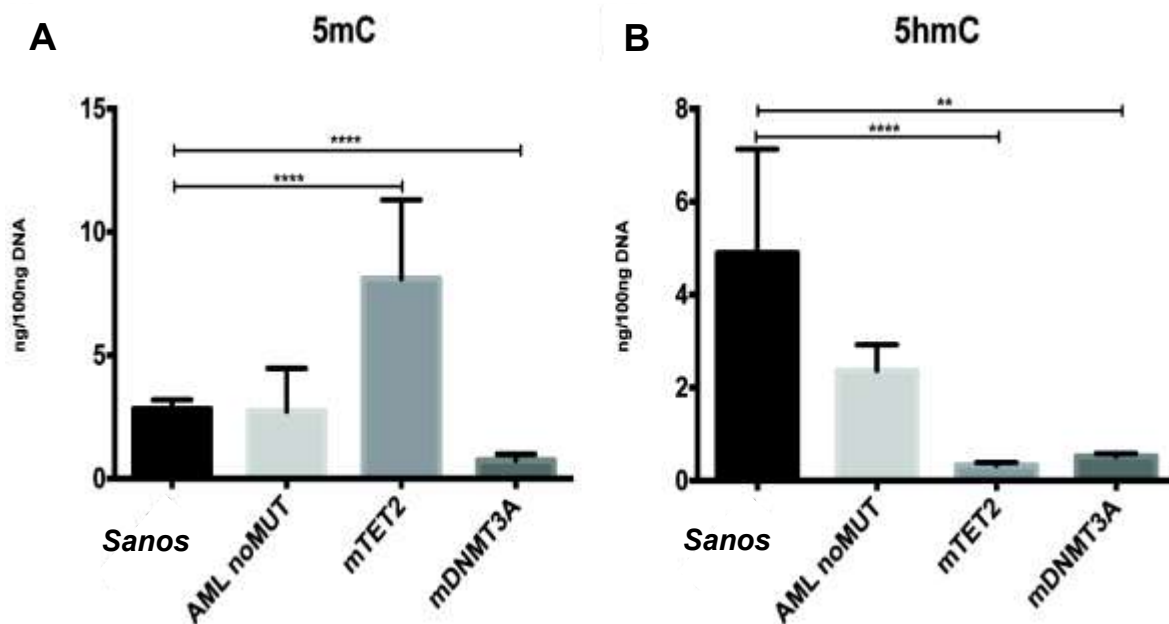


Figura 7. Comparación de la concentración de 5mC (A) y 5hmC (B) en pacientes con LMA sin mutación, mutantes en DNMT3A, mutantes en TET2 e individuos sanos.

En general los pacientes con LMA presentan un claro decremento de la concentración de 5hmC, sin embargo, los pacientes con mutaciones ya sea en DNMT3A o en TET2, presentan los niveles más bajos de 5hmC, presentando una concentración promedio de 0.3 ng de 5hmC por cada 100ng de DNA total en el

grupo de mTET2 (p 0.001) y de cerca 0.5 ng en el caso del grupo de mDNMT3A (p 0.008) (Figura 7B).

### **7.8. Los pacientes con LMA con mutaciones en DNMT3A o TET2 presentan niveles alterados del mRNA de TET2 y DNMT3A**

Los datos de la actividad transcripcional de los genes DNMT3A y TET2 muestran que los niveles de mRNA de DNMT3A es más alto en los pacientes pertenecientes a los grupos mDNMT3A y TET2 presentándose un aumento de 6 veces en el caso de mDNMT3A (p 0.001) y un aumento de 11 veces (p 0.001) en el caso de los individuos del grupo mTET2 (Figura 8A). En el caso del nivel de mensajero de TET2 este se presentó elevado en promedio 8 veces en el grupo mTET2 (p 0.001) mientras que en el caso de los individuos con mutaciones en DNMT3A presentaron en promedio una disminución del 80% del mRNA de TET2 en comparación con los individuos sanos (p 0.001) (Figura 8B).

Interesantemente en el grupo de pacientes no mutantes los niveles de transcrito de ambos genes se ven incrementados, sin embargo, la variación dentro de los individuos es tan alta que no se presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 8).

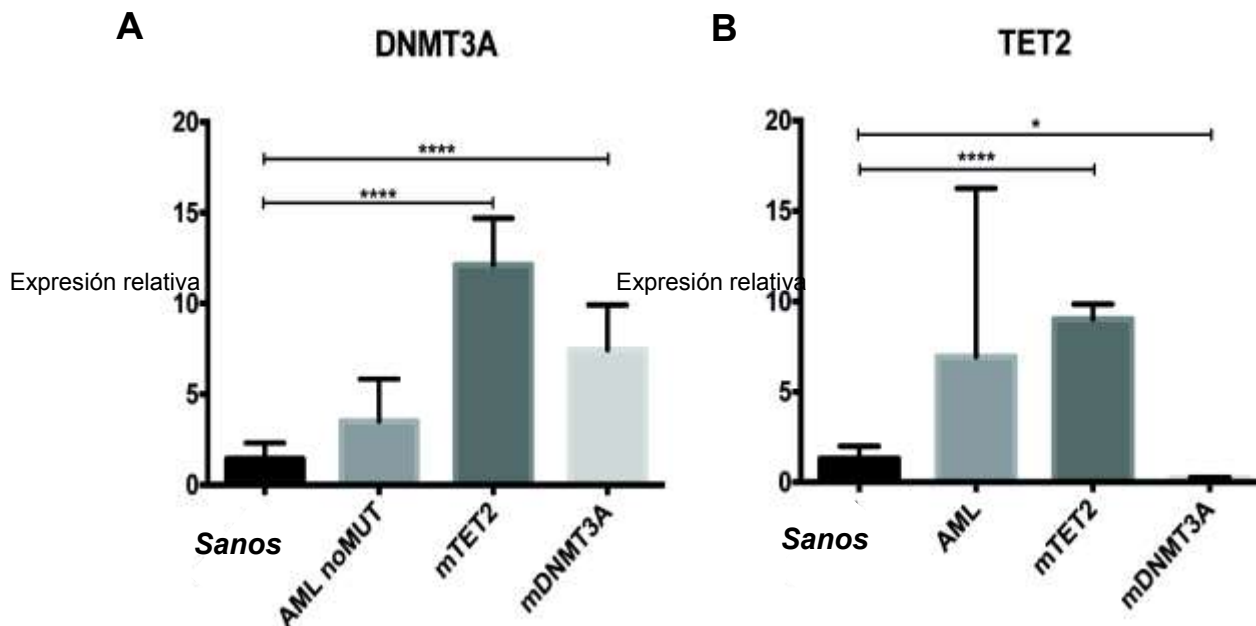


Figura 8. Comparación de la expresión relativa de DNMT3A (A) y TET2 (B) en pacientes con LMA sin mutación, mutantes en DNMT3A, mutantes en TET2 e individuos sanos.

### 7.9. Los pacientes con mutaciones en DNMT3A o TET2 muestran un patrón de metilación diferencial específico

Debido a que nuestros datos muestran que las mutaciones en DNMT3A y TET2 llevan a cambios en la concentración global de 5mC y 5hmC, nuestra intención fue determinar si dichas mutaciones afectan el estatus de metilación de promotores génicos específicos. Para dicho objetivo seleccionamos un total de 19 genes que previamente se han analizado en pacientes con leucemia y se han mostrado con alteraciones en la metilación de sus promotores. Para poder evaluar dicho estatus de metilación usamos el DNA genómico del total de los individuos de los grupos mDNMT3A y mTET2, así como de un grupo de 13 individuos del grupo LMA noMUT y 13 individuos sanos y analizamos los promotores de los 18 genes antes seleccionados mediante pirosecuenciación post-tratamiento con bisulfito.

De los 18 genes evaluados 3 no presentaron ninguna variación entre los grupos (HOXA5, P73 y HIN1) por lo que fueron descartados para los subsecuentes análisis. Con los datos del porcentaje de metilación sitio por sitio en cada uno de los promotores y para cada uno de los individuos se realizó un HeatMap que permitiera agrupar a todos los individuos en *clusters* dependiendo del estado de metilación, sin que se les proporcionara a este cual era el estado mutacional de DNMT3A o TET2; para lograr dicho análisis se utilizó el software “R project” de Free Software Foundation Inc (<http://cran.r-project.org/>) así como el paquete Complex HeatMap (Zuguang Gu 2015). Sorprendentemente nuestro análisis agrupó mediante los dendogramas que se observan en la figura 9A a todos los individuos evaluados en 3 *clusters* que presentan un patrón de metilación específico, y justamente estos grupos coinciden con los grupos que generamos previamente mediante la detección del estado mutacional de DNMT3A y TET2 (Figura 9A). El primer grupo incluye 8 individuos perteneciente a los controles sanos, el segundo incluye a 6 de los 8 individuos pertenecientes al grupo LMA noMUT, y el tercer grupo se divide a su vez en dos subgrupos más pequeños donde el primer subgrupo incluye a todos los individuos de grupo mDNMT3A y el segundo subgrupo a 11 de los 12 individuos del grupo mTET2.

#### **7.10. Los pacientes con mutaciones en DNMT3A o TET2 muestran un patrón de actividad transcripcional específico**

Para evaluar si los cambios en el patrón de metilación que observamos tienen consecuencias a nivel de la expresión génica, evaluamos la abundancia relativa de

los mRNAs de los genes previamente evaluados mediante RT-qPCR. Con los datos obtenidos de dicho análisis generamos un HeatMap mediante el uso del software “R proyect” de Free Software Foundation Inc (<http://cran.r-project.org/>) así como el paquete Complex HeatMap (Zuguang Gu 2015), con la finalidad de agrupar a los individuos en *clusters* que presentaran un patrón de expresión parecido de los genes evaluados (Figura 9B). En este caso los dendogramas muestran de nuevo 3 principales *clusters* lo que implica 3 patrones generales de expresión entre todos los individuos del estudio. De nuevo esto sucede sin que en el análisis se considere el estado mutacional de dichos individuos. El primer *cluster* está compuesto por el total de los individuos sanos incluidos en el análisis, el segundo incluye a los 3 individuos del grupo mDNMT3A y un individuo perteneciente al grupo mTET2, el último grupo se divide a su vez en dos subgrupos más pequeños que incluyen en el primero a todos lo demás individuos del grupo con LMA que presenta mutaciones en TET2 y el segundo grupo incluye al total de los pacientes pertenecientes al grupo LMA noMUT .





### **7.11. Algunos de los genes evaluados presentan una clara correlación entre metilación y actividad transcripcional.**

Con la intención de analizar si los patrones de metilación presentes entre los individuos, correlacionan con un cambio en la expresión a nivel de transcripción de dichos genes, realizamos un análisis de correlación de los dos HeatMaps previos de nuevo mediante el uso del software “R project” de Free Software Foundation Inc (<http://cran.r-project.org/>) así como el paquete Complex HeatMap (Zuguang Gu 2015). Dicho análisis se muestra en la figura 9C donde se observan tanto correlaciones inversamente proporcionales (en un color rojo donde la mayor intensidad del color corresponde a la mayor correlación), es decir que a mayor nivel de metilación se observa una menor actividad transcripcional, así como correlaciones directamente proporcionales (en un color azul donde la mayor intensidad del color corresponde con la mayor correlación), es decir que en este caso a mayor metilación existe una mayor expresión (Figura 9C).

Posterior a este análisis decidimos revisar de manera individual a los genes que presentaron las correlaciones más altas entre metilación y expresión. Analizamos un total de 8 genes: EFNA1, OLIG2, PTCH, LAG3, PGRMC1, P15, HOXB3, y LHX9 (Figura 10). De dichos genes, sólo EFNA (Figura 10A) muestra una clara correlación inversamente proporcional entre la metilación y la expresión, donde los individuos con los valores de metilación más bajos (3% en promedio) corresponden con los individuos del grupo mDNMT3A y que presentan a su vez los niveles más altos de expresión de dicho gen (valores hasta 20 veces mayores con

respecto al control), mientras que los individuos con los niveles más altos de metilación en el promotor de EFNA1 corresponden a los individuos sanos (con un 66% de metilación en promedio) los cuales presentan los niveles más bajos de actividad transcripcional de dicho gen (1.3 veces en promedio) (Figura 10A).

De los restantes 7 genes, 4 muestran una aparente correlación directamente proporcional entre la metilación y la expresión (Figura 10B-F). De estos, el gen con una mayor correlación fue OLIG2 (Figura 10B) en el que los valores más altos de expresión (un incremento de 5 veces con respecto al control) se encontró en los individuos del grupo mDNMT3A que corresponden a los individuos con los valores de metilación más altos (36% en promedio); por otra parte los individuos que presentaron los niveles más bajos de expresión (una disminución del 40% de la expresión con respecto al control), correspondieron a los individuos del grupo LMA noMUT que corresponden a aquellos con el menor nivel de metilación en el promotor de OLIG2 (15% en promedio) (Figura 10B).

En el caso del gen HOXB3 la correlación es claramente inversamente proporcional. Sin embargo, no se observan diferencias en esta correlación entre los grupos analizados, ya que entre todos los individuos la metilación del promotor fue en promedio del 89% mientras que la expresión se mantuvo constante entre todos los individuos de todos los grupos (Figura 10G). En cuanto al último gen incluido (LHX9), en el análisis este no muestra una correlación clara entre la metilación de su promotor y la expresión a nivel transcripcional, ya que mientras la metilación se mantiene constante en cada uno de los grupos (20% en promedio), la expresión varía entre los individuos siendo muy elevada entre cada uno de los grupos de pacientes con LMA con respecto al control sano (Figura 10H).

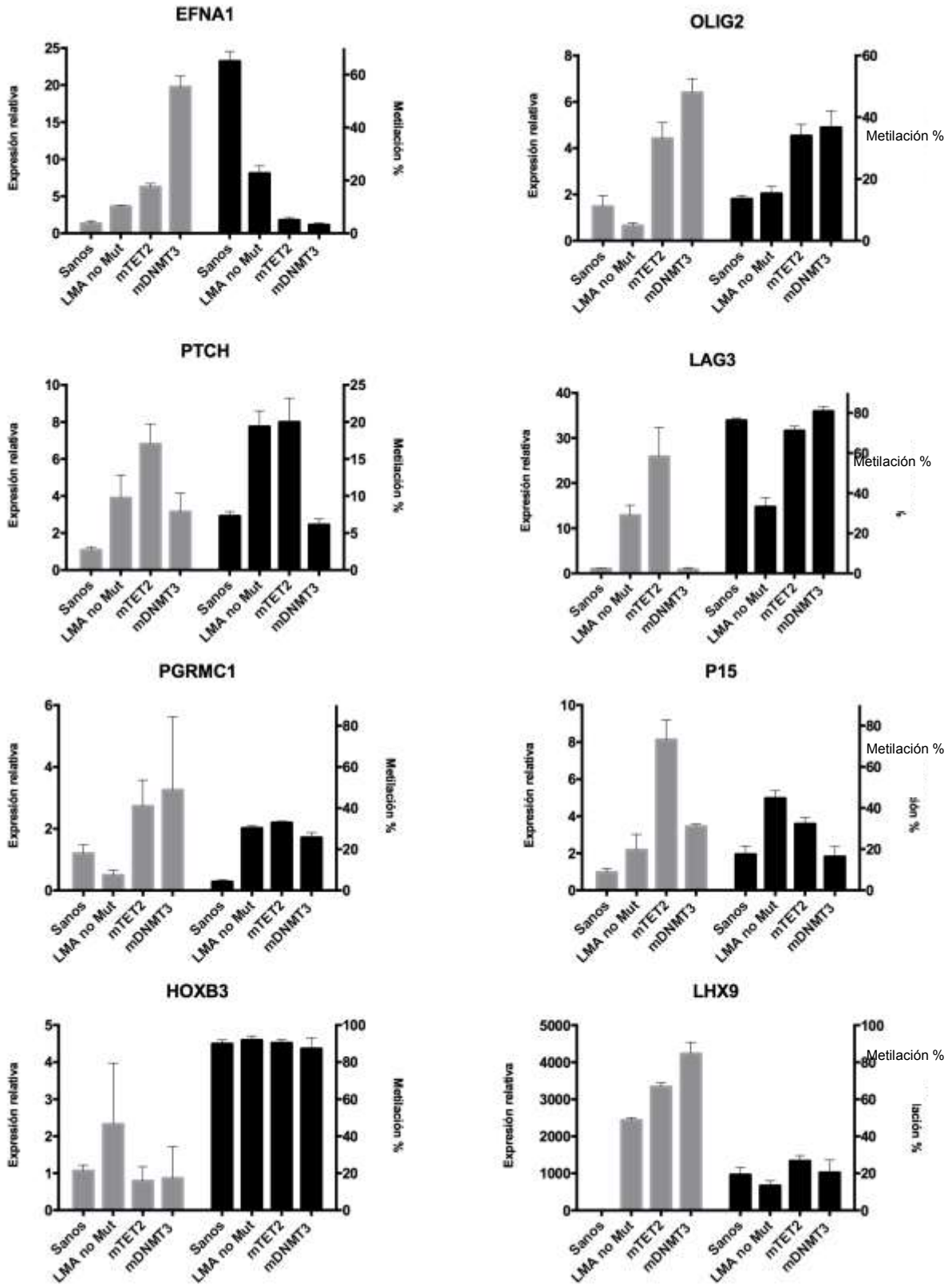


Figura 10. Correlación metilación-expresión en genes con una relación directamente proporcional (A), inversamente proporcional (B-F) y sin correlación clara (G y H).

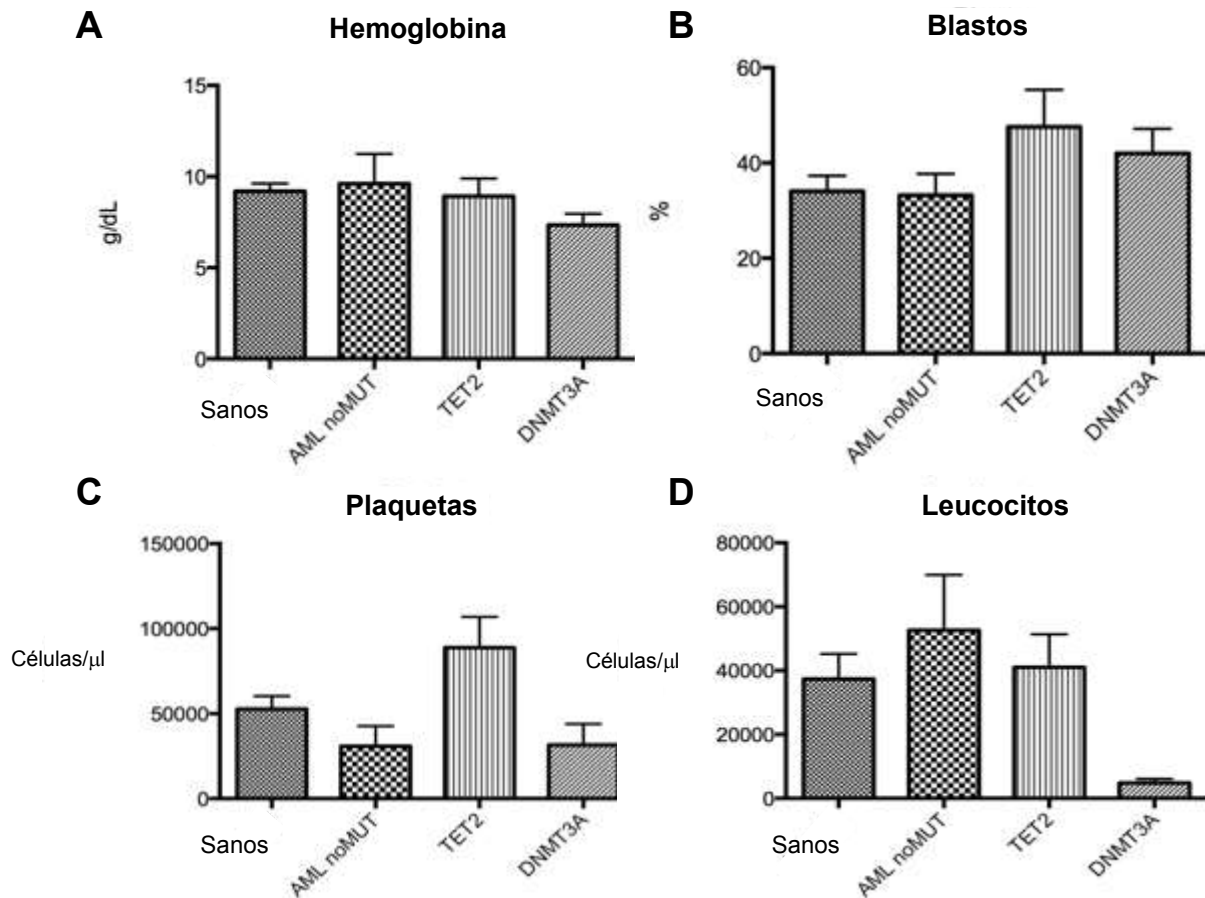


Figura 11. Comparación de características clínicas entre los individuos sanos, pacientes con LMA sin mutación y mutantes en DNMT3A y TET2, incluyendo hemoglobina (A), conteo de blastos (B), plaquetas (C) y conteo de leucocitos (D).

### 7.12. La presencia de mutaciones en TET2 y DNMT3A no tiene un claro efecto sobre las características clínicas de los pacientes con LMA

A pesar de que los más de 115 pacientes con LMA *de novo* incluidos en este estudio presentaron una edad similar entre dos diferentes grupos (44 años en promedio), los datos clínicos que comúnmente se evalúan al momento del diagnóstico no muestran en ninguno de los grupos diferencias estadísticamente

significativas. El único dato que presentó una diferencia fue el conteo de plaquetas que se mostró considerablemente más alto en el caso del grupo de individuos con mutaciones en TET2 (Figura 11C); otro dato clínico que se modificó, pero no significativamente fue el conteo de leucocitos, mostrándose más bajo en el caso de los pacientes con mutaciones en DNMT3A (Figura 11D).

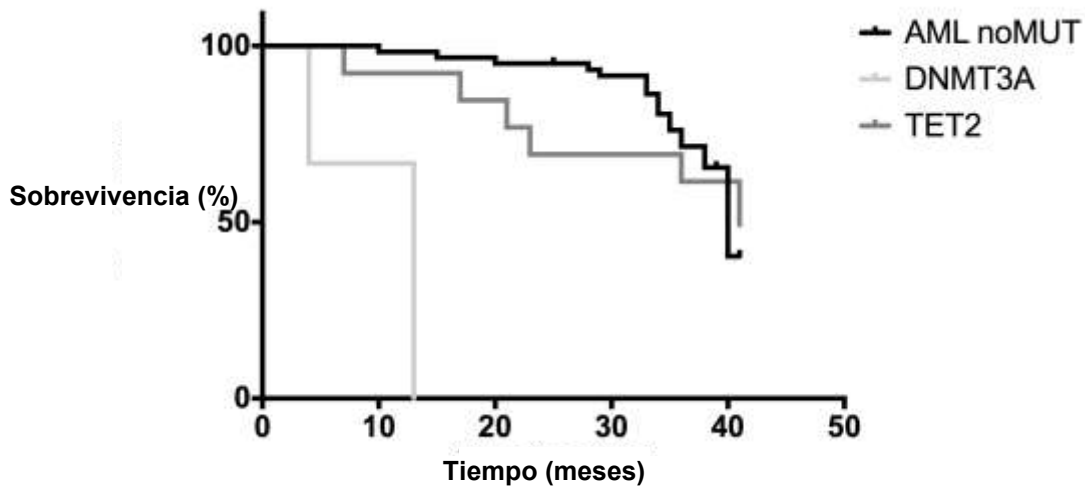


Figura 12. Supervivencia de los pacientes con LMA sin mutación, y mutantes para DNMT3A y TET2.

### 7.13. La presencia de mutaciones en TET2 y DNMT3A tienen un impacto en la supervivencia de los pacientes con LMA

Por último, hemos realizado un análisis de la supervivencia de los pacientes de los diferentes grupos generados a partir del estado mutacional, de metilación y expresión. Nuestros análisis muestran una clara correlación entre la supervivencia y la presencia de mutaciones, particularmente observándose una drástica disminución en la supervivencia para los pacientes pertenecientes al grupo de mDNMT3A, los cuales sobreviven en promedio únicamente 4 meses a partir del diagnóstico, mientras que el promedio de supervivencia de todos los individuos con LMA en los demás grupos es de 40 meses (Figura 12).

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo describimos por primera vez una posible interacción en pacientes con LMA *de novo* entre las dos principales enzimas que gobiernan la dinámica de metilación del DNA (DNMT3A y TET2), además de esto la presencia de dicha mutación tiene un claro efecto sobre la sobrevivencia de los pacientes. Nuestro trabajo sugiere que DNMT3A y TET2 podrían usarse como biomarcadores tempranos del diagnóstico en LMA.

Como primer paso para nuestro trabajo decidimos utilizar solo muestras de pacientes con un diagnóstico *de novo* es decir al momento del diagnóstico primario sin que se les haya aplicado aún ningún tratamiento para dicha neoplasia, esto con dos intenciones: la primera que la enfermedad de estos pacientes se encuentre en el estadio más parecido entre todos los individuos, y segunda (y mucho más importante), que las alteraciones moleculares que describimos no se deban al efecto genotóxico y citotóxico de los tratamientos que comúnmente se aplican para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. Es claro que nuestro criterio de inclusión de diagnóstico *de novo* no es suficiente para afirmar que los pacientes se encuentran en todos los casos dentro del mismo estadio de la enfermedad; sin embargo, hasta el momento es difícil definir el estadio de la enfermedad de un paciente con LMA cuando este ingresa. A pesar de ello, para tratar de homogeneizar un poco más la población se desarrolló un kit para el diagnóstico de las translocaciones que se presentan más comúnmente en los pacientes con LMA<sup>70</sup>. Dicho kit debería permitirnos el diagnóstico multiplex por lo menos de las 3 translocaciones más comunes, con la intención de que resultara accesible realizarlo a todos los pacientes posibles, ya que dicho diagnóstico no está incluido dentro de los análisis de rutina en los hospitales de salud pública de nuestro país, debido principalmente a los altos costos que implica la implementación de diagnósticos moleculares.

El uso del kit desarrollado en este trabajo, permitió la adecuada selección de las muestras de los pacientes que no presentaran alteraciones cromosómicas, lo cual nos garantizaría que las posibles alteraciones moleculares que encontraríamos más adelante no se deberían a una inestabilidad genómica generalizada la cual comúnmente se presenta en los pacientes con alteraciones cromosómicas<sup>71</sup>. Pero además de esto, el uso del kit permitió integrar dicho análisis molecular al expediente de los pacientes, lo que permite que este pueda ser utilizado como parte del diagnóstico.

Una vez integrada la población de estudio después de dos años de muestreo continuo, el primer análisis que se realizó fue la cuantificación del contenido absoluto de 5mC y 5hmC en el DNA genómico del total de los pacientes con LMA y en un grupo de individuos con el mismo promedio de edad, pero sin ninguna alteración hematológica. Los niveles alterados de 5mC y 5hmC en DNA se han asociado con una variedad de enfermedades incluyendo el cáncer<sup>72</sup>. La disminución en la concentración de 5hC se ha reportado previamente en tumores sólidos como cáncer de próstata, hígado, colon y algunos otros<sup>73</sup>, así como en neoplasias líquidas como leucemia linfoblástica crónica y leucemia linfoblástica aguda<sup>74</sup>.

Al respecto nuestros resultados muestran una enorme variación en la concentración de 5mC genómico en todos los pacientes con LMA en comparación con las concentraciones de dicha citosina modificada en individuos sanos (Figura 3A), lo cual contrasta con múltiples reportes previos que indican la presencia de una hipometilación generalizada en la mayoría de los tipos de cáncer<sup>75 76 77</sup>. Sin embargo, Lehman y colaboradores han reportado previamente una importante variación en la concentración total de 5mC en pacientes con LMA, que además parece no ser casual sino que los autores reportan una posible correlación entre la concentración de dicha citosina con el pronóstico y supervivencia<sup>78</sup>, lo que podría sugerir que la variación observada en nuestro trabajo podría ser reflejo de la presencia de subgrupos de pacientes.

Por otra parte numerosos estudios han revelado niveles significativamente bajos de 5hmC en líneas celulares derivadas de cáncer<sup>79</sup>, así como en tumores primarios como melanoma, adenoma y carcinoma<sup>80</sup>. A pesar de esta constancia en los trabajos que reportan una disminución de la concentración de 5hmC, trabajos recientes han reportado en el caso específico de pacientes con LMA una variación importante en la concentración de esta citosina modificada<sup>81</sup>, lo que es consistente con la variación observada en el presente trabajo (Figura 3B). De manera similar a como se reportó con 5mC en el caso de la variación de la concentración de 5hmC que se ha reportado previamente en pacientes con LMA puede deberse a la presencia de subgrupos que además podrían ser importantes para el pronóstico de los pacientes<sup>82</sup>.

Todos los trabajos previos reportan que la variación en la concentración de 5mC y 5hmC pueden ser causadas por cambios importantes en la expresión o función de los genes que codifican para las enzimas responsables de la metilación y desmetilación del DNA<sup>83 81</sup>. Con la intención de analizar si este es el caso de nuestros pacientes, procedimos a evaluar la actividad transcripcional de DNMT3A y TET2 las dos principales enzimas encargadas de generar 5mC y 5hmC respectivamente. Nuestros resultados muestran que, como se había reportado previamente, los niveles de mRNA tanto de DNMT3A como de TET2 son altamente variables entre los pacientes con LMA. Al correlacionar el nivel de mRNA de la enzima correspondiente con la concentración del producto de su actividad, como era de esperarse se encontró una clara correlación en 80% de los casos; sin embargo, esto no ocurrió en el 20% restante de los pacientes, lo cual sugiere que, en estos casos, la variación de la concentración de las citosinas modificadas puede deberse a diferentes mecanismos como la presencia de alguna mutación en los genes de las enzimas correspondientes.

Se ha reportado previamente que la mutación en TET2 y DNMT3A frecuentemente causa una disminución en la actividad enzimática de sus productos proteicos<sup>78</sup>. En el caso específico de DNMT3A se ha reportado la presencia de un



*hotspot* que afecta el residuo R882, el cual se ha demostrado que disminuye la actividad enzimática en al menos un 50%. En el caso de TET2 las mutaciones reportadas se han reportado a lo largo de toda la región codificante, y en todos estos casos dichas mutaciones llevan a una disminución en la actividad enzimática; sin embargo hasta el momento no se ha establecido un posible *hotspot* para este gen<sup>84</sup><sup>82</sup>. Debido a lo anterior nosotros hemos buscado las posibles mutaciones en los pacientes con LMA en el *hotspot* de DNMT3A y en los exones de TET2 que han mostrado un mayor número de mutaciones y que interesantemente incluyen los dominios funcionales para la actividad enzimática de TET2.

La incidencia de mutaciones encontrada tanto en DNMT3A como en TET2, es similar a las que se han reportado previamente<sup>85</sup><sup>86</sup>. Sin embargo, el presente trabajo representa el primer reporte de la presencia de estas mutaciones en pacientes mexicanos, reportando una incidencia de 11.8% para el *hotspot* de DNMT3A y de 2.7% para las mutaciones en TET2 (Figura 4). En contraste con lo reportado por trabajos previos como el de Nguyen y colaboradores quienes reportan en muestras de linfoma de células T la presencia de individuos con una doble mutación en TET2 y DNMT3A<sup>87</sup>, nosotros no logramos identificar ningún paciente con LMA que presentara dicha co-mutación, por lo que es probable que en el caso de LMA no exista relación entre estas mutaciones.

Como era esperado en los pacientes que mostraron mutaciones en DNMT3A (mDNMT3A) la concentración de 5mC fue la más baja en comparación a los individuos que no presentaron dicha mutación (Figura 5A y 7A) sugiriendo una disminución en la actividad enzimática responsable de la síntesis de 5mC<sup>85</sup>. En contraste la concentración de 5mC se mostró claramente disminuida en los pacientes pertenecientes al grupo mTET2, esto como un posible resultado de la baja actividad desmetilante de TET2<sup>81</sup>.

La asociación entre la mutación en DNMT3A y TET2 y los niveles de 5hmC fue menos clara ya que los individuos que presentaron mutaciones en cualquiera de

los dos genes evaluados, muestran una clara disminución en la concentración de 5hmC (Figura 5B y 7B). En el caso específico de TET2 los bajos niveles de 5hmC eran esperados debido a que una disminución en la actividad enzimática del producto de este gen llevaría a una disminución del producto de su actividad, como se ha reportado ya previamente<sup>81</sup>; sin embargo en el caso de los pacientes pertenecientes al grupo de mDNMT3A esta disminución en la concentración de 5hmC es totalmente inesperada ya que no se detectaron mutaciones en TET2 en dichos pacientes. Lo anterior sugiere que existe un complejo mecanismo que regula los niveles de 5hmC en pacientes con LMA en el cual posiblemente participa DNMT3A.

Los reportes acerca de la asociación entre la presencia de mutaciones en DNMT3A y TET2 y los niveles de mRNA de estos genes se han mostrado contradictorios, ya que los informes independientes de ambos genes, han demostrado que las mutaciones disminuyen los niveles de mRNA en algunos casos o no tienen ningún efecto en absoluto en otros<sup>88 65</sup>. En contraste con los reportes previos, nuestros datos indican que los individuos con mutaciones en DNMT3A presentan un alto nivel de expresión de este gen, en comparación con los individuos sanos o con los pacientes con LMA sin mutaciones (Figura 6A y 8A). De manera similar nuestras observaciones en cuanto a TET2 se muestran contradictorias con respecto a la bibliografía<sup>88 65</sup>, ya que los individuos con mutaciones en TET2 correlacionan con los niveles de expresión del mismo gen (Figura 6B y 8B). Interesantemente los pacientes del grupo mDNMT3A muestran una clara disminución de los transcritos de TET2 (Figura 6B y 8B) lo cual podría explicar las bajas concentraciones de 5hmC observadas en los individuos de dichos grupos, ya que previamente se ha informado que una disminución de los niveles de mRNA TET2 conduce a una drástica disminución de la concentración de 5hmC<sup>83</sup>. Lo anterior muestra que la presencia de mutaciones en TET2 o la disminución del mRNA de dicho gen tienen el mismo efecto, es decir la disminución en la concentración de 5hmC<sup>89</sup>.

La disminución de los niveles del mensajero de TET2 en los individuos con mutaciones en DNMT3A no se ha reportado previamente y representa un campo totalmente nuevo de investigación. Una posible explicación para la disminución de la actividad enzimática de TET2 en nuestros pacientes es la presencia de mutaciones en la región promotora de su gen, o diferentes mecanismos epigenéticos que se ven activados solo cuando DNMT3A presenta una disminución clara de su actividad, ya sea por mutación o por una disminución en la producción de su producto proteico; por ejemplo la expresión de un miRNA capaz de disminuir la actividad transcripcional de TET2<sup>83</sup>. Aunque este tipo de interacciones han sido predichas en modelos experimentales por varios grupos de investigación<sup>62</sup>, nuestro trabajo representa uno de los primeros informes donde se reporta de manera simultánea la búsqueda de alteraciones en los dos miembros más importantes en el proceso de metilación y desmetilación del DNA, la coexistencia de mutaciones en DNMT3A y la correlación con una disminución de los niveles de transcritos de TET2.

Por último en el caso de los individuos con mutaciones en TET2 nosotros encontramos altos niveles de su mRNA, lo cual confirma que la baja concentración de 5hmC en dichos pacientes es causado por un decremento en la actividad enzimática de TET2 la cual a su vez es resultado de las mutaciones que encontramos en dicho gen. Dicho resultado coincide con lo reportado por Scopim-Riberio y colaboradores, los cuales encuentran que la actividad transcripcional de TET2 es independiente de la mutación en el gen TET2<sup>90</sup>.

Diferentes estudios han sugerido que el estado de metilación global (medido como concentración total de 5mC), puede tener un impacto particular en los patrones de metilación de genes específicos, y en muchos casos asociarse con parámetros clínicos particulares<sup>78</sup>. Por esta razón, decidimos evaluar experimentalmente el estado de metilación de las islas CpG cercanas al promotor de 18 genes los cuales fueron seleccionados de una base de datos generada a partir de las publicaciones disponibles en línea entre los años 2000 y 2015; dicha base consta del número total de reportes de alteraciones en expresión genética y

metilación por cada gen particular en pacientes con leucemia, así como la relevancia de la alteración de su expresión en el inicio y progresión de la enfermedad<sup>77 91 92</sup>.

Los resultados del patrón de metilación de estos 18 genes particulares constituyeron una cantidad considerable de información ya que se obtuvo el dato de metilación de cada uno de los sitio CpG incluidos en la isla CpG analizada de cada gen de cada individuo, por lo que el análisis de estos datos mediante métodos convencionales resultaba poco práctico. Debido a esto, realizamos un “Mapa de Calor” o HeatMap que nos permitiera mediante una análisis de similitud agrupar a los individuos que tuvieran patrones de metilación muy parecidos en el total de sitios CpG. Dicho análisis permite separar al total de individuos de este estudio en dos grandes grupos o clústers (Figura 9A), correspondiendo el primero de ellos a los individuos sanos y el segundo a todos los pacientes que padecen leucemia mieloide aguda. Estos primeros resultados son similares a los reportados previamente en diferentes enfermedades, incluyendo varios tipos de cáncer; en todos estos trabajos el patrón de metilación específico de los individuos enfermos difiere claramente al observado en individuos sanos<sup>93</sup>.

Interesantemente el clúster generado que contiene a los pacientes con LMA, esta constituido a su vez por 2 clúster más pequeños que se empalman perfectamente con los grupos de mutantes y no mutantes; sin embargo, interesantemente el clúster que contiene a los individuos mutantes se subdivide a su vez en 2 subclústers, uno de ellos que contiene a los pacientes mDNMT3A y otro a los mTET2. Todos esto indica que la presencia de mutaciones en cualquiera de estos dos genes lleva no solo al desarrollo de un cambio en la metilación global, sino que también se asocia con un cambio en el patrón de metilación de promotores génicos específicos. De hecho, los resultados muestran que existen diferencias en los patrones de metilación entre los individuos del grupo mDNMT3A y mTET2, ya que a pesar de que las mutaciones parecen tener un efecto similar, las consecuencias en cuanto a metilación específica parecen ser distintas.

Este tipo de asociaciones entre la mutación en genes implicados en el proceso de metilación del DNA como TET2 o DNMT3A y la presencia de patrones de metilación del DNA en promotores específicos, ha sido previamente reportado en ciertos tipos de cáncer como glioblastoma, en el que los subgrupos de pacientes generados a partir de un patrón de metilación particular, mostraron una clara asociación con características clínicas específicas y muy importantemente con el diagnóstico y pronóstico de los pacientes<sup>94</sup>. Más aún, otros autores sugieren que la presencia de patrones de metilación específicos asociados a mutaciones particularmente en TET2, así como a los genes que afectan su actividad, podrían estar relacionados con el inicio y progresión de la leucemogénesis<sup>95</sup>. Todo lo anterior sugiere que los subgrupos que hemos encontrado asociados no solo a la presencia de mutaciones sino también a los patrones de metilación específica, podrían correlacionar con procesos etiopatológicos particulares, pero sobre todo con aspectos clínicos como el pronóstico.

Diferentes estudios han reportado una correlación directa entre la actividad transcripcional de genes específicos y los cambios en los patrones de metilación en sus promotores<sup>73 96 97 95</sup>, por lo que nos abocamos a evaluar la expresión transcripcional de los genes evaluados previamente en cada uno de los individuos de los diferentes grupos. Con dichos resultados y con la intención de que estos datos fueran comparables con los de metilación, realizamos también un HeatMap que nos permitiera igualmente formar clústers y subclústers de los individuos, dependiendo de su patrón de expresión.

De manera muy similar a lo observado en el estatus de metilación, el HeatMap de los niveles de expresión mostró la formación de 3 clústers que corresponden a patrones de expresión particular, el presente en todos los individuos con LMA no mutantes y los individuos de los grupos mDNMT3A y mTET2 (Figura 9B). Esto confirma que la presencia de mutaciones en estos genes, no solo lleva al desarrollo de un patrón de metilación de DNA específico, sino que también altera la expresión transcripcional, generando un perfil diferencial entre los pacientes con

LMA no mutantes y particularmente distinto entre los individuos con mutaciones en DNMT3A y TET2.

Aunque clásicamente se tiene la idea de una correlación inversa entre la metilación de un promotor y su expresión génica, existen actualmente evidencias de una correlación directa entre estos dos eventos, sugiriendo que, la metilación y la expresión genética son fenómenos biológicos con una alta complejidad<sup>73</sup>. Nuestros resultados reflejan ambos comportamientos, ya que como se puede observar en la barra lateral de la figura 9, la correlación inversa entre la metilación y los niveles de expresión se observa en los genes EFNA1 y HOXB3, puesto que se observó en sus promotores un bajo porcentaje de metilación y un alto nivel de expresión de estos genes. Sin embargo, de manera general en los restantes genes evaluados, la correlación entre los niveles de metilación y expresión parece ser más bien directamente proporcional (Figura 9), mientras que en algunos genes como LHX9, estos eventos no parecen estar asociados, ya que a pesar de mantener una metilación constante en su promotor en todos los individuos, su expresión se detectó claramente incrementada en algunos de los grupos (Figura 10H).

Aunque todo lo anterior muestra la gran complejidad de la regulación epigenética, actualmente se tienen evidencias que sugieren que la alteración en la expresión de genes particulares inducidos por la actividad de DNMT3A y TET2 podrían desempeñar un papel importante tanto en el inicio como en la progresión de diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha reportado que EFNA1, uno de los genes incluidos en nuestro estudio y que además mostró niveles de expresión alterados en los pacientes con LMA, se encuentra también sobre-expresado en carcinoma de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer gástrico, glioma, mesolteioma y recientemente también en cáncer colorrectal<sup>98</sup>. De hecho, en este último caso los autores reportan una tasa menor de supervivencia en los pacientes con una alta expresión de este gen. En concordancia con este trabajo, nosotros detectamos una alta expresión de EFNA1 en todos los pacientes con LMA, pero además en los pacientes en los que se detectó la mutación en el gen DNMT3A, la

expresión de EFNA1 fue considerablemente mayor (Figura 10A) y de manera muy interesante, también observamos una tasa de supervivencia más baja en este grupo de individuos (Figura 12).

Por otro lado, en nuestro estudio también incluimos algunos genes cuya expresión es tejido-específica, como es el caso de OLIG2 que normalmente se restringe a tejido neural, y que se ha observado expresado en líneas celulares derivadas de cáncer mamario y de cáncer de pulmón, así como en pacientes con leucemia linfoblástica aguda<sup>99</sup>. De acuerdo a lo reportado por Aplan y colaboradores, en ratones la sobre-expresión de este gen induce con una eficacia del 60% un fenotipo de leucemia linfoblástica aguda de células pre-T, lo que sugiere que la expresión de este gen podría ser importante al comienzo de la leucemogénesis<sup>99</sup>. En el presente trabajo observamos la sobre-expresión de OLIG2 en los individuos con LMA pertenecientes tanto al grupo mTET2 como a mDNMT3A, reforzando así la idea de que su expresión podría constituir un paso importante en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad.

El gen PTCH1 se ha considerado desde hace tiempo como un gen supresor de tumores, debido a que su mutación precede generalmente a la formación de un carcinoma; sin embargo, Bellamini y colaboradores reportaron recientemente que PTCH1 también puede funcionar como un oncogen, ya que si se sobre-expresa simultáneamente al tratamiento con inductores químicos, se promueve el desarrollo de carcinoma escamoso, aunque aparentemente su sobre-expresión podría ser un evento temprano necesario para la carcinogénesis, pero no estrictamente requerido para el mantenimiento del tumor<sup>100</sup>. Nuestros datos concuerdan con algunas de las observaciones del estudio antes mencionado, ya que encontramos este gen claramente sobre-expresado en todos los pacientes con LMA (Figura 10C), reforzando la idea de que la alteración en la expresión de este gen puede deberse a una variedad de eventos previos, y particularmente en nuestro estudio, derivado de las mutaciones en los genes reguladores de la metilación, lo cual según lo reportado parece ser un evento temprano en la leucemogénesis.

Por otro lado, el gen LAG3 que en nuestro estudio detectamos sobre-expresado en el grupo de individuos mTET2, pero con una expresión baja en los pacientes del grupo mDNMT3A, se ha considerado normalmente un regulador negativo de la función de las células T. Particularmente en el contexto del cáncer, se ha observado a este gen sobre-expresado en tumores en los que existe una importante infiltración por linfocitos<sup>101</sup>. Además, en cáncer de mama se ha observado una interesante correlación directa entre su nivel de expresión en el momento del diagnóstico y la tasa de supervivencia de los pacientes, lo que hace muy evidente su relevancia clínica. Estas observaciones correlacionan con nuestros datos, ya que observamos que los pacientes con LMA en los que no existe mutación en DNMT3A ni en TET2, son aquellos que presentan la mayor expresión de LAG3 (Figura 10D), siendo este grupo el que presentó la mayor tasa de supervivencia (Figura 12). En contraste, los pacientes con mutaciones en mDNMT3A, presentaron una baja expresión de LAG3 (Figura 10D) y fueron los que mostraron la menor tasa de supervivencia (Figura 12).

En resumen, las modificaciones transcripcionales que observamos resultado de las alteraciones en el patrón de metilación asociadas a las mutaciones en los genes TET2 y DNMT3A, parecen jugar un papel importante tanto en el inicio de la enfermedad (OLIG2 y PTCH1) como en la supervivencia del paciente (EFNA1 y LAG3).

En cuanto a las características clínicas observadas entre los diferentes grupos analizados en este estudio, no se encontraron diferencias en diversos parámetros comúnmente evaluados durante el desarrollo de las leucemias, como son la concentración de hemoglobina, el conteo de blastos, el conteo de plaquetas o el conteo de leucocitos (Figura 11); sin embargo, los datos de supervivencia muestran claras diferencias entre los pacientes con LMA dependiendo sobre todo de la presencia de mutaciones en los genes DNMT3A y TET2. Sin embargo, el impacto de las mutaciones en el hotspot de DNMT3A es sobresaliente, ya que la



supervivencia general promedio en estos pacientes fue solo una décima parte de la que corresponde a la de los pacientes sin mutaciones detectables en este gen ( $p=0.001$ ). Por otro lado, aunque los pacientes portadores de mutaciones en TET2 tuvieron una supervivencia en general mayor, el número de individuos con LMA con esta alteración genética fue demasiado limitado como para establecer una asociación confiable.

En suma, los datos obtenidos en este trabajo demuestran que en los pacientes con LMA, la presencia de mutaciones en TET2 y DNMT3A altera los niveles de metilación e hidroximetilación global, generando además cambios en la metilación de promotores específicos, que se ven reflejados en sus niveles de expresión; pero sobre todo que la presencia de estas mutaciones genera un drástico cambio en la supervivencia de los pacientes. Estos datos también sugieren que el estado mutacional y los niveles de expresión de TET2 y DNMT3A, pueden ser usados como biomarcadores pronósticos en LMA, en conjunto con los marcadores JAK2, cKIT y FLT3 ya propuestos por su alta frecuencia en LMA (30%) y que se han asociado con una disminución en la tasa de supervivencia<sup>102</sup>. De hecho, recientemente se ha sugerido que los grandes grupos generados por la presencia de alteraciones en JAK2, cKIT y FLT3, podrían a su vez dividirse en subgrupos más pequeños, de acuerdo a la presencia de mutaciones menos comunes<sup>102</sup>, tales como las reportadas en el presente trabajo.

## 9. CONCLUSIONES

La incidencia de la mutación en el hotspot R882 de DNMT3A en pacientes mexicanos con leucemia mieloide aguda *de novo* es del 2.7%.

La incidencia de mutaciones de TET2 en la región comprendida entre los exones 6 y 10 en pacientes mexicanos con leucemia mieloide aguda *de novo* es del 11.8%.

La presencia de mutaciones en DNMT3A se asocia con una hipometilación global del DNA en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

La presencia de mutaciones en TET2 se asocia con una hipermetilación global del DNA en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

La mutación en el hotspot R882 en DNMT3A coincide con una disminución en el nivel de transcrito de TET2.

Tanto la mutación en DNMT3A como en TET2 se asocian con el desarrollo de un patrón de metilación particular a nivel de promotor génico en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

El patrón de metilación de DNA generado por las mutaciones en TET2 y DNMT3A se asocian también a un patrón de transcripción particular, en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

El patrón de expresión transcripcional asociado a la presencia de las mutaciones en TET2 y DNMT3A afecta genes importantes tanto para el inicio (OLIG2 y PTCH1) como para la supervivencia (EFNA1 y LAG3) de los pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

La presencia de mutaciones en el hotspot R882 se asocia con una reducción del 90% del tiempo de supervivencia en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

Las mutaciones en DNMT3A y TET2 pueden ser usadas como biomarcadores en conjunto con marcadores ya establecidos como JAK2, cKIT y FLT3, en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*.

## 10. PERSPECTIVAS

Un estudio similar a este en el que se considere un número mayor de pacientes podría permitir observar más claramente las diferencias en algunos parámetros clínicos, como la cuantificación de blastos y plaquetas y su correlación con la presencia de mutaciones en DNMT3A y TET2. Adicionalmente, permitiría determinar su relación con la supervivencia en el caso de los individuos con mutaciones en TET2, ya que estos individuos no mostraron diferencias estadísticamente significativas debido principalmente a la dispersión de los datos.

El análisis de los niveles de metilación de cada dinucleótido CpG incluido en las islas CpG dentro y cercano al promotor de cada gen analizado, así como su correlación con el nivel de expresión, podría ser verificado mediante el análisis de inmunoprecipitación de cromatina. Esto confirmaría que las modificaciones en la metilación del DNA asociadas a la presencia de mutaciones en DNMT3A y TET2, explican claramente cada uno de los cambios a nivel de expresión transcripcional, y así proponer mecanismos mediante los cuales las mutaciones reportadas modificarían la expresión en cada uno de estos genes.

El análisis de las alteraciones en la metilación de promotores génicos y el patrón de expresión transcripcional en aquellos individuos que presentan disminuciones claras en los niveles de transcritos de DNMT3A y TET2 sin que exista mutación alguna en estos genes, nos permitirían analizar mecanismos alternativos que lleven a las mismas modificaciones en la metilación del DNA y por lo tanto en transcripción, que no dependan de la presencia de mutaciones.

El análisis de los mecanismos mediante los cuales la presencia de mutaciones en el hotspot R882 en DNMT3A llevan a la disminución del nivel del transcrito de TET2 representan un área aún no explorada. Podría tratarse de mecanismos epigenéticos, como la presencia de una isla CpG en el promotor de TET2 la cual

sea regulada directamente por DNMT3A o por la abundancia de un miRNA cuya expresión sea regulada por metilación y que sea capaz de regular el nivel de mRNA de TET2.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Wright, N. A. Boveri at 100: Cancer evolution, from preneoplasia to malignancy. *Journal of Pathology* **234**, 146–151 (2014).
2. Nowell, P. & Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic 9 granulocytic leukemia. *Science (80-. )*. **132**, 1488–1501 (1960).
3. Rowley, J. D. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 245–250 (2001).
4. Shah, K., Parikh, S. & Rawal, R. Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia Therapy: a Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **17**, 3025–33 (2016).
5. Mertens, F., Johansson, B., Fioretos, T. & Mitelman, F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 371–381 (2015).
6. Dalla-Favera, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7824–7 (1982).
7. Cleary, M. L. & Sklar, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7439–43 (1985).
8. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, (2016).
9. Cullen, P. Case of splenitis acutus in which the serum of the blood drawn from the arm had the appearance of milk. *Edinb. Med. J.* **7**, 169–171 (1811).
10. Velpeau, A. Altération du sang. *Arch. Gén. Med* 462–463 (1825).
11. Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res.* **36**, 6–13 (2012).
12. Kaushansky, K., Williams, W. J. & Joseph, W. *Williams hematology*. (McGraw-Hill Medical, 2010).
13. Shreiner, D. P. William Dameshek and Frederick Gunz's Leukemia. *JAMA* **232**, 1282 (1975).
14. Komanduri, K. V. & Levine, R. L. Diagnosis and Therapy of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Molecular Risk Stratification. *Annu. Rev. Med.* **67**, 59–72 (2016).
15. Longo, D. L., Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–1152 (2015).
16. Ríos, P. R., Rivera, A. G., Cervantes, F. S. & Martínez, P. M. Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid. Médica e Investig. en Salud* **8**, 5–15 (2015).
17. Gorczyca, W. *et al.* in *Methods in Cell Biology* **103**, 221–266 (2011).
18. Wolach, O. & Stone, R. M. How I treat mixed-phenotype acute leukemia. *Blood* **125**, 2477–2485 (2015).
19. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).
20. Byrd, J. C. *et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of

- induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, (2002).
21. Gaidzik, V. & Döhner, K. Prognostic Implications of Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia With Normal Cytogenetics. *Semin. Oncol.* **35**, 346–355 (2008).
  22. Lindsley, R. C. *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* **125**, (2015).
  23. Marcucci, G., Haferlach, T. & Döhner, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 475–486 (2011).
  24. Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F. & Mecucci, C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): Biologic and clinical features. *Blood* **109**, 874–885 (2007).
  25. Cheng, K. *et al.* The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model Brief report The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model. *Blood* **115**, 3341–3345 (2010).
  26. Döhner, K. *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood* **106**, 3740–3746 (2005).
  27. Gilliland, D. G. & Griffin, J. D. Role of FLT3 in leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 274–281 (2002).
  28. Elyamany, G. *et al.* Frequency and Prognostic Relevance of FLT3 Mutations in Saudi Acute Myeloid Leukemia Patients. *Adv. Hematol.* **2014**, 141360 (2014).
  29. Rakheja, D., Konoplev, S., Jeffrey Medeiros, L. & Chen, W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum. Pathol.* **43**, 1541–1551 (2012).
  30. Fathi, A. T., Wander, S. A., Faramand, R. & Emadi, A. Biochemical, epigenetic, and metabolic approaches to target IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Semin. Hematol.* **52**, 165–171 (2015).
  31. Creutzig, U. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood* **120**, 3167–3205 (2012).
  32. Cai, Y., Yu, X., Hu, S. & Yu, J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **7**, 147–154 (2009).
  33. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–88 (2013).
  34. Peng, Y. *et al.* The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 15004 (2016).
  35. Klopffleisch, R., Weiss, A. T. A. & Gruber, A. D. Excavation of a buried treasure-DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol. Histopathol.* **26**, 797–810 (2011).
  36. Önder, Ö., Sidoli, S., Carroll, M. & Garcia, B. A. Progress in epigenetic histone modification analysis by mass spectrometry for clinical investigations. *Expert Rev. Proteomics* **12**, 499–517 (2015).
  37. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian

- development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204–220 (2013).
38. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–92 (2012).
  39. Schübeler, D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* **517**, 321–326 (2015).
  40. Franchini, D.-M., Schmitz, K.-M. & Petersen-Mahrt, S. K. 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 419–441 (2012).
  41. Avvakumov, G. V. *et al.* Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**, 822–825 (2008).
  42. Song, C.-X. *et al.* Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* **29**, 68–72 (2011).
  43. Sharif, J. *et al.* The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908–12 (2007).
  44. Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P. & Jeltsch, A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem* **12**, 206–222 (2011).
  45. Lister, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315–322 (2009).
  46. Gowher, H. & Jeltsch, A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites. *J. Mol. Biol.* **309**, 1201–1208 (2001).
  47. Sharma, S., De Carvalho, D. D., Jeong, S., Jones, P. A. & Liang, G. Nucleosomes Containing Methylated DNA Stabilize DNA Methyltransferases 3A/3B and Ensure Faithful Epigenetic Inheritance. *PLoS Genet.* **7**, e1001286 (2011).
  48. Dhayalan, A. *et al.* The Dnmt3a PWWP Domain Reads Histone 3 Lysine 36 Trimethylation and Guides DNA Methylation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26114–26120 (2010).
  49. Ziller, M. J. *et al.* Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* **500**, 477–81 (2013).
  50. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (80-. )*. **324**, 930–5 (2009).
  51. Ito, S. *et al.* Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science (80-. )*. **333**, 1300–1303 (2011).
  52. Hu, L. *et al.* Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature* **527**, 118–122 (2015).
  53. Wu, H. & Zhang, Y. Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* **156**, 45–68 (2014).
  54. Ji, D., You, C., Wang, P. & Wang, Y. Effects of tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine on DNA replication in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1304–1309 (2014).
  55. Hashimoto, H. *et al.* Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4841–4849 (2012).
  56. Spruijt, C. G. *et al.* Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* **152**, 1146–1159 (2013).



57. Yang, L., Rau, R. & Goodell, M. a. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 152–165 (2015).
58. Yan, X.-J. *et al.* Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat. Genet.* **43**, 309–315 (2011).
59. Gaidzik, V. I. *et al.* TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1350–7 (2012).
60. Metzeler, K. H. *et al.* TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1373–81 (2011).
61. Schoofs, T., Berdel, W. E. & Müller-Tidow, C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **28**, 1–14 (2014).
62. Scourzic, L. *et al.* DNMT3A R882H mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice. *Leukemia* **30**, 1–11 (2016).
63. Martino, V. *et al.* Down-regulation of MLL-AF9, MLL and MYC expression is not obligatory for monocyte-macrophage maturation in AML-M5 cell lines carrying t(9;11)(p22;q23). *Oncol. Rep.* **15**, 207–11 (2006).
64. Elsässer, A. *et al.* The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene* **22**, 5646–5657 (2003).
65. Walter, M. J. *et al.* Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153–1158 (2011).
66. Tefferi, A., Lim, K.-H. & Levine, R. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1117–1118 (2009).
67. Kosmider, O. *et al.* TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* **114**, 3285–3291 (2009).
68. Nibourel, O. *et al.* Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood* **116**, 1132–1135 (2010).
69. Xu, Y. *et al.* Tet3 CXXC Domain and Dioxygenase Activity Cooperatively Regulate Key Genes for Xenopus Eye and Neural Development. *Cell* **151**, 1200–1213 (2012).
70. Alcalay, M. *et al.* Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene* **20**, 5680–5694 (2001).
71. Bunting, S. F. & Nussenzweig, A. End-joining, translocations and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 443–54 (2013).
72. Masri, S., Kinouchi, K. & Sassone-Corsi, P. Circadian clocks, epigenetics, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **27**, 50–6 (2015).
73. Ehrlich, M. & Lacey, M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **754**, 31–56 (2013).
74. Wahlfors, J. *et al.* Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **80**, 2074–80 (1992).
75. Toraño, E. G., Petrus, S., Fernandez, A. F. & Fraga, M. F. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical

- significance. *Clin. Chem. Lab. Med.* **50**, 1733–42 (2012).
76. Zelic, R. *et al.* Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **18**, 1–12 (2015).
  77. Kroeger, H. *et al.* Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* **112**, 1366–1373 (2008).
  78. Deneberg, S. *et al.* Gene-specific and global methylation patterns predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **24**, 932–941 (2010).
  79. Nestor, C. E. *et al.* Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* **22**, 467–477 (2012).
  80. Yang, H. *et al.* Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* **32**, 663–9 (2013).
  81. Kroeze, L. I. *et al.* Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood* **124**, 1110–1118 (2014).
  82. Scopim-Ribeiro, R. *et al.* Low Ten-eleven-translocation 2 (TET2) transcript level is independent of TET2 mutation in patients with myeloid neoplasms. *Diagn. Pathol.* **11**, 28 (2016).
  83. Coutinho, D. F. *et al.* TET2 expression level and 5-hydroxymethylcytosine are decreased in refractory cytopenia of childhood. *Leuk. Res.* **39**, 1103–1108 (2015).
  84. Shimoda, K. *et al.* TET2 Mutation in Adult T-Cell Leukemia / Lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop.* **55**, 145–149 (2015).
  85. Im, A. P. *et al.* DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* **28**, 1774–83 (2014).
  86. Damm, F. *et al.* TET2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: Clinical implications and evolutionary patterns. *Genes Chromosom. Cancer* **53**, 824–832 (2014).
  87. Nguyen, T. B. *et al.* Double somatic mosaic mutations in TET2 and DNMT3A???origin of peripheral T cell lymphoma in a case. *Annals of Hematology* **94**, 1221–1223 (2015).
  88. Itzykson, R. *et al.* Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **25**, 1147–1152 (2011).
  89. Quivoron, C. *et al.* TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**, 25–38 (2011).
  90. Scopim-Ribeiro, R. *et al.* Low Ten-eleven-translocation 2 (TET2) transcript level is independent of TET2 mutation in patients with myeloid neoplasms. *Diagn. Pathol.* **11**, 28 (2016).
  91. Martin-Subero, J. I. *et al.* A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One* **4**, (2009).
  92. Scholz, C. *et al.* Distinction of acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia through microarray-based DNA methylation analysis. *Ann. Hematol.* **84**, 236–244 (2005).

93. Cedar, H. & Bergman, Y. Programming of DNA Methylation Patterns. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 97–117 (2012).
94. Sturm, D. *et al.* Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* **22**, 425–437 (2012).
95. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
96. Holm, K. *et al.* Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res.* **12**, R36 (2010).
97. Aryee, M. J. *et al.* DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastases. *Sci. Transl. Med.* **5**, 169ra10 (2013).
98. Yamamoto, H. *et al.* Ephrin-A1 mRNA is associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **42**, 549–555 (2013).
99. Lin, Y. W. *et al.* OLIG2 (BHLHB1), a bHLH transcription factor, contributes to leukemogenesis in concert with LMO1. *Cancer Res.* **65**, 7151–7158 (2005).
100. Kang, H. C. *et al.* Ptch1 Overexpression Drives Skin Carcinogenesis and Developmental Defects in K14PtchFVB Mice. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1311–1320 (2013).
101. Nguyen, L. T. & Ohashi, P. S. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 45–56 (2014).
102. Muhammad Tayyab, M. K. T. A. Z. I. S. A. Z. N. and N. N. Distinct Gene Mutations, their Prognostic Relevance and Molecularly Targeted Therapies in Acute Myeloid Leukemia (AML). *J. Cancer Sci. Ther.* **6**, 337–349 (2014).

## 12. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDE AGUDAS SEGÚN LA FAB <sup>15</sup> .....	10
TABLA 2 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDE AGUDAS SEGÚN LA OMS <sup>19</sup> .....	11
TABLA 3 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS SEGÚN LA EUROPEAN LEUKEMIA NET (ELN) <sup>19</sup> . * UN CARIOTIPO COMPLEJO ES DEFINIDO CUANDO TRES O MÁS CROMOSOMAS PRESENTAN ANORMALIDADES.....	14
TABLA 4 SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EVALUACIÓN MEDIANTE RT-QPCR. ....	34
TABLA 5 OLIGOS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN PARA DNMT3A Y TET2.....	36

## 13. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 RT-PCR PARA LOS PRODUCTOS FUSIONADOS RESULTADO DE LAS TRANSLOCACIONES. A. AF9-MLL T(9;11). B. AML1-ETO T(8;21). C. PML-RAR $\alpha$ T(15;17). D. CONTROL TRIPLE MULTIPLEX PARA LAS 3 TRANSLOCACIONES .....	38
FIGURA 2. RT-QPCR COMPARATIVA ENTRE LOS INDIVIDUOS SANOS Y LOS PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA PARA DNMT3A (A) Y TET2 (B). ....	40
FIGURA 3. COMPARACIÓN EN LAS CONCENTRACIONES DE 5MC (A) Y 5HC (B) ENTRE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	41
FIGURA 4. INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES EN DNMT3A (R882) Y TET2 (EXON6-EXON10).....	42
FIGURA 5. CONCENTRACIÓN DE 5MC (A) Y 5HMC EN PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN (CÍRCULOS NEGROS), MUTANTES EN DNMT3A (CÍRCULOS ROJOS) Y MUTANTES EN TET2 (CÍRCULOS AZULES). 43	
FIGURA 6. EXPRESIÓN RELATIVA DE DNMT3A (A) Y TET2 (B) EN PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN (CUADRADOS NEGROS), MUTANTES EN DNMT3A (CUADRADOS ROJOS) Y MUTANTES EN TET2 (CUADRADOS AZULES). ....	44
FIGURA 7. COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE 5MC (A) Y 5HMC (B) EN PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN, MUTANTES EN DNMT3A, MUTANTES EN TET2 E INDIVIDUOS SANOS.....	45
FIGURA 8. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE DNMT3A (A) Y TET2 (B) EN PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN, MUTANTES EN DNMT3A, MUTANTES EN TET2 E INDIVIDUOS SANOS. ....	47
FIGURA 9. MAPAS DE CALOR DE LA METILACIÓN DE LA ISLA CPG DEL PROMOTOR GÉNICO (A), EXPRESIÓN (B) Y CORRELACIÓN METILACIÓN EXPRESIÓN (C) DE LOS 18 GENES EVALUADOS.....	50
FIGURA 10. CORRELACIÓN METILACIÓN-EXPRESIÓN EN GENES CON UNA RELACIÓN DIRECTAMENTE PROPORCIONAL (A), INVERSAMENTE PROPORCIONAL (B-F) Y SIN CORRELACIÓN CLARA (G Y H).....	53
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ENTRE LOS INDIVIDUOS SANOS, PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN Y MUTANTES EN DNMT3A Y TET2, INCLUYENDO HEMOGLOBINA (A), CONTEO DE BLASTOS (B), PLAQUETAS (C) Y CONTEO DE LEUCOCITOS (D). ....	54
FIGURA 12. SOBREVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON LMA SIN MUTACIÓN, Y MUTANTES PARA DNMT3A Y TET2. ....	55