



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**Detección de mutaciones genéticas de la enzima  
isocitrato deshidrogenasa  
asociadas al diagnóstico de pacientes con  
Leucemia Mieloide Aguda.**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA  
PRESENTA  
ARRATIA GUTIÉRREZ BRENDA ANGÉLICA**

**ASESOR(A) DE TESIS:  
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR  
CO-ASESOR DE TESIS:  
M. en C. IDALIA CARMEN AVILA MIYAZAWA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

**Detección de mutaciones genéticas de la enzima isocitrato deshidrogenasa asociadas al diagnóstico de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.**

Que presenta la pasante: **Brenda Angélica Arratia Gutiérrez**  
Con número de cuenta: **309112457** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Junio de 2018.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martinez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sindicales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

Este trabajo fue apoyado por Celgene México y registrado en la Dirección de Investigación del Hospital General de México (AG221-TR-AML-PI-007979, DIC/16/103/03/115) y Clinical Trials.gov(NCT03204838).

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi humilde agradecimiento a mi madre María De Lourdes porque sin ella no hubiera logrado cumplir este objetivo, gracias por las enseñanzas, el tiempo, la paciencia y el amor incondicional que siempre has demostrado, me siento la persona más bendecida del mundo al tener una madre como tú, eres mi mejor amiga, tu y yo para siempre, te amo.

A mi padre Enrique por enseñarme el valor de la constancia, empeño y las ganas de trabajar, estoy muy orgullosa de ser tu hija, muchas gracias por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado.

A mi hermano Quique por brindarme apoyo, amor, risas y compañía, gracias a ti me he dado cuenta de que no existe ningún impedimento en la vida que me haga flaquear en mis objetivos y que siempre puedo lograr lo que me proponga; espero que siempre encuentres en mi apoyo y consuelo.

Un especial agradecimiento al equipo del laboratorio de Biología Molecular de la U.204 del Hospital General de México "Eduardo Liceaga".

Al Dr. Adolfo Martínez Tovar por la paciencia, el conocimiento, apoyo, orientación y el interés que ayudo a fomentar en mí por la investigación, muchas gracias por ser mi tutor y darme la oportunidad de realizar este trabajo con usted, una disculpa por las fallas en toda mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Irma Olarte Carrillo por confiar en mí, apoyarme, orientarme y tener paciencia infinita, muchas gracias por permitirme realizar este proyecto con usted, es un excelente ser humano y modelo por seguir, si tuviera la oportunidad de agradecerle por todo lo que contribuyo en mí nunca acabaría.

A la Q.F.B Anel Gala por adoptarme en el laboratorio de Biología Molecular, creer en mí, preocuparse, orientarme, un gusto haber compartido este tiempo contigo, perdón por todos los desastres que cause, muchas gracias por todo.

Al BQD. Adrián de la Cruz por el apoyo en la realización de este proyecto, el conocimiento y el tiempo brindado, eres un excelente profesionalista y ser humano.

A la Dra. Iveth por la paciencia, tiempo, experiencias brindadas, la vida es grata cuando se conoce a personas buenas como usted.

Al BQD. Rafael Cerón por el conocimiento, tiempo y apoyo, eres un gran ser humano, apasionado por su trabajo, que impulsa a la creación de personas que se interesen en la ciencia.

Me gustaría reconocer la contribución de todo el equipo de hematología médicos, químicos, administrativos que brindaron su tiempo en la realización de este proyecto.

A cada uno de los profesores que ayudaron a mi formación profesional, en especial a la M.en.C Idalia Miyasawa por el apoyo y la paciencia brindada, gracias por ser mi tutor interno, confiar en mí, transmitirme su conocimiento y amor por la hematología.

A la Maestra Sonia del Rincón por la enseñanza de vida que dejo en mí, el apoyo y todos los consejos que brindo, muchas gracias por todo, que Dios la bendiga.

Al Dr. Federico Centeno y su equipo de trabajo por brindarme las herramientas necesarias para realizar y culminar mi trabajo

A mis amigos del alma Karina, Fabiana, Anita, Raúl Palmero, Raúl HC, por brindarme su amistad y apoyo incondicional en todo este tiempo, los amo hoy y siempre.

A mi prima Maríajose por enseñarme el valor de la amistad, respeto, reciprocidad, cariño genuino, gracias por todo.

A mis abuelos Luisa, Víctor y Margarita por darme unos padres tan maravillosos, por educarme con amor, aunque ya no estén aquí, quiero que sepan que cada uno de los logros que yo realice serán para ustedes porque siempre creyeron en mi en especial para ti abuelita Luisa te amo y siempre te recordare, yo sé que si estuvieras aquí, estarías muy orgullosa de mí.

A toda la familia Gutiérrez a mis tíos y mis primos, los quiero mucho.

A mi alma mater UNAM “Facultad Estudios Superiores Cuautitlán” fue una experiencia difícil pero hermosa, gracias por las risas, lágrimas y tiempo, me siento la persona más orgullosa de pertenecer a la mejor universidad de México.

En hora buena, ¡lo logré!, por mi raza hablará el espíritu. ¡GOYA!

## DEDICATORIA

Este proyecto se lo quiero dedicar a mi madre, compañera, mejor amiga María de Lourdes Gutiérrez Mayén, gracias por todo, cada esfuerzo, desgaste y logro es por ti, porque tú siempre te has empeñado en darme todo y hacerme feliz, eres la mejor mamá de todas y mereces muchas cosas buenas, te amo, siempre voy a estar para ti.

Gracias por educarme con tanto amor inculcarme valores de constancia, reciprocidad, respeto al prójimo, por ti he aprendido a desempeñar cualquier actividad con entrega y esmero, yo sé que no soy la hija que soñaste, pero trataré de compensarte todo lo que has hecho por mí.

Abuelita Luisa gracias por darme a una mamá como la que tengo, te dedico este proyecto, te mando un abrazo, estoy feliz por lograr esta meta, aunque no pueda compartir esto físicamente contigo, en mi corazón estarás presente y yo sé que te alegraras de por mí, eres la mejor abuelita de todas, gracias por enseñarme que las personas podemos avanzar y lograr lo que queramos, aunque no tengamos los estímulos económicos o educación profesional, la cosa aquí es echarle ganas, en serio te extraño mucho y te amo.

<b>I. INDICE.....</b>	<b>i</b>
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>III. ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS.....</b>	<b>v</b>
<b>V. ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>VI. RESUMEN.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. MARCO TEORICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sistema Hematopoyético.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Organización del Sistema Hematopoyético .....	1
1.1.2 Generación de Linaje Hematopoyético Mieloide .....	2
<b>1.2 Leucemia Aguda.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Etiología de las leucemias agudas .....	3
1.2.2 Epidemiología de las leucemias agudas.....	4
<b>1.3 Leucemia Mieloide Aguda .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Morfología, inmunofenotipo y citogenética. ....	6
1.3.2 Diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda.....	11
1.3.3 Tratamiento de Leucemia Mieloide Aguda .....	12
<b>1.4 Enzima Isocitrato Deshidrogenasa.....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Ciclo de Krebs. ....	12
1.4.2 Isocitrato Deshidrogenasa. ....	15
1.4.3 Mecanismo de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa.....	16
1.4.4 Vía de señalización de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa mutada	17
1.4.5 Tipos de mutación de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa.....	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo General .....	24
4.2 Objetivos Particulares .....	24
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
5.1 Tipo de diseño y estudio. ....	25



5.2	Población y tamaño de muestra .....	25
5.2.1	Tamaño de la muestra.....	25
5.3	Criterios de inclusión .....	25
5.4	Criterios de exclusión .....	25
5.5	Criterios de eliminación .....	25
5.6	Variables experimentales .....	26
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
6.1	Material biológico .....	27
6.2	Aislamiento de Leucocitos de AMO y SP .....	27
6.3	Extracción y Purificación del DNA genómico .....	27
6.4	Cuantificación, determinación de la calidad y la integridad del material genético .....	28
6.5	Genotipificación de Mutaciones .....	28
6.6	MLPA .....	29
6.7	Análisis estadístico.....	30
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
7.1	Características de la población. ....	31
7.2	Cuantificación, Extracción de Material Genético y Análisis de Integridad de Muestras .....	35
7.3	Genotipificación.....	36
7.4	MLPA .....	39
7.5	Frecuencia de las mutaciones en la población mexicana .....	40
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>
11.1	Protocolo general de MLPA .....	58

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Hematopoyesis	2
<b>Figura 2.-</b> Morfología de Leucemia Mieloide Aguda	6
<b>Figura 3.-</b> Clases moleculares de LMA y mutaciones más recurrentes en pacientes mayores de 65 años	10
<b>Figura 4.-</b> Modelo de cooperación entre mutaciones asociadas a LMA	11
<b>Figura 5.-</b> Regulación del Ciclo de Krebs	14
<b>Figura 6.-</b> Cromosoma de IDH1/IDH2	16
<b>Figura 7.-</b> Mecanismo molecular de la enzima Isocitrato deshidrogenasa mutada	19
<b>Figura 8.-</b> Modelo de estructura de IDH1/IDH2	20
<b>Figura 9.-</b> Esquema de MLPA	30
<b>Figura 10.-</b> Electroforesis de DNA genómico de 12 pacientes con LMA	35
<b>Figura 11.-</b> Gen constitutivo GAPDH (440pb)	35
<b>Figura 12.-</b> Plot de discriminación alélica de IDH1	37
<b>Figura 13.-</b> Plot de discriminación alélica de IDH2	38
<b>Figura 14.-</b> Electroferograma de MLPA para mutaciones de IDH1/IDH2	39

### III. ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1.-</b> Frecuencia de las diferentes variedades de Leucemia Aguda	5
<b>Tabla 2.-</b> Clasificación de Leucemia Mieloide Aguda	6
<b>Tabla 3.-</b> Clasificación de la OMS 2016 de las neoplasias Mieloides y de la Leucemia Mieloide Aguda	7
<b>Tabla 4.-</b> Clasificación de datos citogenéticos y de biología molecular de LAM con factor pronóstico	9
<b>Tabla 5.-</b> Tipos de mutaciones de la enzima isocitrato deshidrogenasa	21
<b>Tabla 6.-</b> Tabla operacional de variables independientes y dependientes	26
<b>Tabla 7.-</b> Sondas Taq Man® empleadas para la identificación de mutaciones de IDH1/IDH2	28
<b>Tabla 8.-</b> Características generales de la población	34
<b>Tabla 9.-</b> Pacientes que presentan los diferentes tipos de mutaciones de IDH1/IDH2 género y variante de LAM	42
<b>Tabla 10.-</b> Características de pacientes con LMA con IDH1 wild type y mutada	45
<b>Tabla 11.-</b> Características de pacientes con LMA con IDH2 wild type y mutada	47

## IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.-</b> Frecuencia de género en la población de LMA	31
<b>Gráfico 2.-</b> Frecuencia de edades de población	32
<b>Gráfico 3.-</b> Clasificación de pacientes con Leucemia Aguda <i>de novo</i>	32
<b>Gráfico 4.-</b> Frecuencia de por género mutaciones de IDH1	40
<b>Gráfico 5.-</b> Frecuencia de por género mutaciones de IDH2	41
<b>Gráfico 6.-</b> Frecuencia de mutaciones de IDH1	43
<b>Gráfico 7.-</b> Frecuencia de mutaciones de IDH2	43

## V. ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>KG</b>	$\alpha$ -Cetoglutarato
<b><math>\alpha</math>HG</b>	$\alpha$ -Hidroxioglutarato
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Grados Centígrados
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMO</b>	Aspirado de médula ósea
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>CD</b>	Cluster de diferenciación
<b>CTP</b>	Células troncales hematopoyéticas
<b>CPH</b>	Células progenitoras hematopoyéticas
<b>dNTP's</b>	Desoxinucleosidos trifosfato
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>HGM</b>	Hospital General de México
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible a Hipoxia
<b>HLA-DR</b>	Antígenos Leucocitarios Humanos
<b>IDH</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>LA</b>	Leucemia Aguda
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoide Aguda
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>CN-LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda – Cariotipo normal
<b>MLPA</b>	Amplificación dependiente de ligación por sondas multiplex
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>NAD(+)</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADP(+)</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAS</b>	Ácido Periódico-Schiff
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEM</b>	Progenitores eritroides-megacariocíticos
<b>PGM</b>	Progenitores granulo-monocíticos
<b>PMC</b>	Progenitores mieloides comunes



<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SNPs</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>SP</b>	Sangre periferica
<b>TET2</b>	Tet metilcitosina dioxigenasa 2
<b>WT</b>	Wild type

## VI. RESUMEN

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA o LAM) es un tipo de neoplasia hematológica heterogénea de progresión rápida y representa el 80% de casos de LMA en adultos, en la cual existe la proliferación clonal de células inmaduras que pierden la capacidad de diferenciarse a células maduras, por la desregulación de diferentes genes. La incidencia mundial por año es de 4 casos por cada 100,000 habitantes.



Los estudios genómicos y funcionales recientemente han identificado dos clases de mutaciones que cooperan durante el desarrollo de la LMA, mutaciones de Clase I las cuales confieren una ventaja proliferativa y las mutaciones de clase II que se caracterizan por promover la auto-renovación y bloquear la diferenciación de células madre hematopoyéticas.

Recientemente, se han identificado mutaciones somáticas en los genes que codifican a la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Estos genes codifican enzimas metabólicas clave que convierten a él isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Dichas mutaciones producen el "oncometabolito" 2-Hidroxiglutarato (R-2-HG) que puede inhibir competitivamente múltiples desoxigenasas dependientes de  $\alpha$ -KG, incluidos los reguladores epigenéticos clave como las histonas desmetilasas y las proteínas de TET2.

En el presente trabajo se identificó la frecuencia de las mutaciones de IDH1/IDH2 en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda *de novo* del Hospital General de México, mediante la técnica de amplificación de sondas múltiples (MLPA) MCR-Holland<sup>®</sup> y sondas de hidrolisis específicas Taq Man<sup>®</sup>.

Se analizaron un total de n=84 pacientes, logrando reclutar a casi todas las variedades de LMA siendo la más frecuente la LMA-M4, el resultado de las frecuencias de las mutaciones para el gen IDH1 fue de 11.9% (10/84), estas actúan solas o combinadas, la mutación más frecuente fue V178I 4.8% (4/84), seguido por R132H 3.6%(3/84), R132C 2.4%(2/84), combinadas se obtuvo una frecuencia porcentual igual para R132H/R132C y G105G/R132C de 1.2%(1/84).En el caso de las mutaciones del gen IDH2 la frecuencia fue de 3.6% (3/84), identificando la presencia de la mutación en el aminoácido R172K fue de 2.4% (2/84) y de la mutación R140Q de 1.2% (1/84).

La presencia de las mutaciones del gen IDH1/IDH2 en LAM es de gran relevancia ya que actualmente se cuenta con tres medicamentos como Enasidenib, Ivosidenib, AG-120,



(Celgene) que pueden inhibir la función de la enzima IDH1/IDH2, bloqueando la generación del oncometabolito y la hipermetilación del DNA, permitiendo la diferenciación celular.



# 1. MARCO TEORICO

## 1.1 Sistema Hematopoyético

El sistema hematopoyético está integrado por diferentes tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas), este se localiza en diferentes regiones del organismo como son: la médula ósea, la sangre y el sistema linfoide para generar los diferentes linajes sanguíneos (Hoffman, Shattil, Furie, Cohen & Silberstein,2000) y tiene como función eliminar de la circulación las células defectuosas o aquellas que han cumplido con su ciclo de vida y reemplazarlas por células nuevas. (Ivanova et al.,2002)

La hematopoyesis se define como un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian dando lugar a distintos tipos de células maduras, en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras. (Merino, 2010)

### 1.1.1 Organización del Sistema Hematopoyético

El sistema hematopoyético puede ser clasificado de diferentes maneras la primera es de acuerdo con su grado de maduración y la segunda depende de los distintos linajes celulares que genere, si se habla del grado de maduración se divide en cuatro compartimentos, el primero corresponde a las células primitivas también llamadas células troncales hematopoyéticas (CTH), las características que tienen es que se auto-renuevan y son multipotenciales, corresponden al 0.1% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea, expresan antígenos como CD34,CD117 y CD133. (Wognum, Eaves &Thomas,2003)

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) estas pierden su capacidad de auto-renovación, pero conservan su capacidad proliferativa, corresponden al <0.5% de las células en médula ósea, comparten antígenos como CD34 pero presentan patrones celulares particulares al linaje que pertenecen. (Civin & Gore,1993)

Las CPH dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología (tercer compartimento), las cuales a pesar de ser inmaduras pueden ser identificadas en un frotis de médula ósea por microscopía de luz, las células precursoras corresponden al >90% de

células residentes en la cavidad medular, las precursoras hematopoyéticas al madurar generan células sanguíneas circulantes, cuarto compartimento. (Mayani et al.,2007)

La segunda clasificación es por linaje y puede ser dividido a su vez en dos grupos mieloides y linfoides. (Merino, 2010)

### 1.1.2 Generación de Linaje Hematopoyético Mieloide

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) dan origen a los progenitores mieloides comunes (PMC) que tienen gran capacidad proliferativa por lo tanto son muy activos en el ciclo celular, pero son incapaces de auto-renovarse, el linaje es específico, limitado por un número de citocinas cuyo evento está definido por el número de receptores que presentan, posteriormente se podrán diferenciar en progenitores más específicos, tales como granulo-monocíticos (PGM) y los progenitores eritroides-megacariocíticos (PEM) (Rosenbauer & Tenen, 2007), tal y como se ejemplifica en la figura 1.

La diferenciación en progenitores más específicos culminará en la maduración de células sanguíneas circulantes todo este proceso estará controlada por diferentes programas genéticos en el que los genes que mantienen la capacidad de auto-renovación se apagan y los que regulan la diferenciación se encienden. (Merino, 2010)

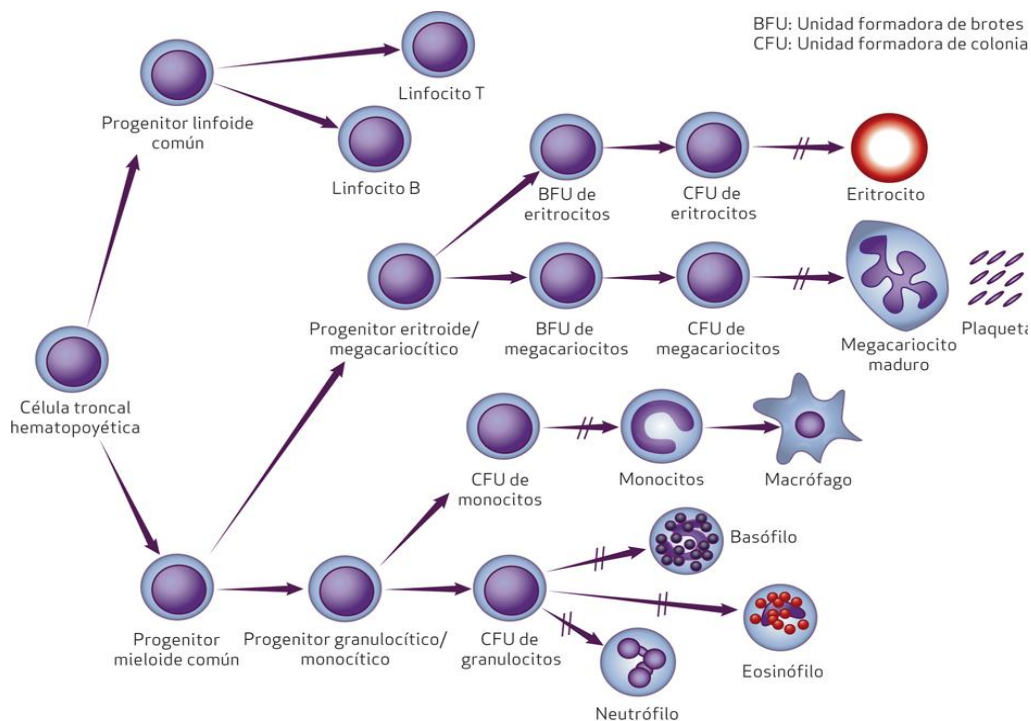


Figura 1. Hematopoyesis. (Tomada de Fortoul;2009)

Las modificaciones en la hematopoyesis pueden dar como resultado una mutación somática en una célula madre hematopoyética, que desencadena una sobreproducción clonal de células leucémicas inmaduras o una producción deficiente de las mismas. (Nichol, Assouline & Miller,2013)

## **1.2 Leucemia Aguda**

Las leucemias Agudas (LA) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades con diferente etiología, patogenia y pronóstico, con su clasificación se ha intentado reducir dicha heterogeneidad e identificar subgrupos biológicamente diferentes y con distintas opciones terapéuticas, lo que ha permitido mejorar el pronóstico de los pacientes. Las alteraciones genéticas que acompañan a la transformación leucémica de una célula suelen ser alteraciones cromosómicas adquiridas. En la leucemia aguda las células blásticas proliferan en la medula ósea y reemplazan a la celularidad normal, lo que provoca una disminución de las 3 series hematopoyéticas en sangre periférica (anemia, neutropenia y trombocitopenia). En consecuencia, las LA suelen acompañarse de infección y/o hemorragia. La proliferación de las células blásticas en otros órganos se traduce en la presencia de hepatomegalia y/o esplenomegalia. (Nichol, Assouline & Miller,2013)

### **1.2.1 Etiología de las leucemias agudas**

El origen de las leucemias en parte es desconocido, pero hay factores que pueden ser predisponentes por ejemplo, el haber estado expuesto de forma accidental a radiaciones, los supervivientes de bombas atómicas, fumadores de cigarrillo, algunas etiologías víricas como Epstein Barr y HTLV-1, exposición a benceno o derivados, algunos fármacos (fenilbutazona, cloranfenicol, hidroxurea, etopósido y agentes alquilantes) o por herencia<sup>5</sup>. Las alteraciones genéticas dan como resultado una desregulación de los perfiles de expresión génica, y esto a su vez conlleva a la alteración de vías de señalización que controlan la proliferación y las funciones celulares. (Sala, Blanco, Pérez & Pérez,2015)

Las enfermedades en las que existe inestabilidad cromosómica, como Síndrome de Fanconi, pueden culminar en algún tipo de LA y la prevalencia de este tipo de leucemias es mayor en individuos con Síndrome de Down, Síndrome de Bloom en comparación con la población en general. (Tenen,2013)

### **1.2.2 Epidemiología de las leucemias agudas**

Las LA se caracterizan por la proliferación descontrolada de células inmaduras, de forma general se encuentran dentro de las causas de morbilidad y mortalidad relacionadas con cáncer (5.8 del total de defunciones en 2002). (Tirado & Mohar,2007) La incidencia de la leucemia linfocítica aguda de ha incrementado a 30.9% en un lapso de 40 años. (Candelaria et al.,2009)

En México, el registro epidemiológico de neoplasias malignas informa que por cada 100,000 habitantes de la población general, existe una incidencia anual de leucemias agudas de 2%; de leucemia linfocítica aguda de 1.3% y de leucemia mielocítica aguda 0.7%. (Crespo,2001)

La leucemia mielocítica aguda tiene una incidencia de 3.7 por cada 100,000 habitantes, con aproximadamente 12,000 casos nuevos diagnosticados cada año en Estados Unidos y más del 90% de los casos ocurren en adultos. La leucemia mielocítica aguda es una de las primeras 10 causas de mortalidad por cáncer en adultos y es la segunda leucemia más frecuente después de la leucemia linfocítica crónica, pero ocupa el primer lugar en muertes con 8,950 decesos por año. (Ahmedin, Rebecca & Jiaquan,2010)

El registro histopatológico de neoplasias malignas de México reporta una incidencia anual de leucemia aguda en la población general de 2 de cada 100,000 habitantes al año, para leucemia mielocítica aguda es de 0.7 por cada 100,000 habitantes al año. (Ferlay, Bray, Pisani & Parkin, 2000) En grupo de 43 pacientes con leucemia mieloblástica aguda tratados con un esquema 7+3, la tasa de remisiones completas fue de 60%, con 61% de pacientes con recaídas postinducción a la remisión. La mortalidad en la inducción a la remisión fue de 30%. La supervivencia a 12 y 78 meses fue de 50 y 18%, respectivamente. (Buitrón et al., 2003)

En México existe poca información epidemiológica de LA, el Hospital General de México es una institución de referencia que atiende principalmente a población del centro de la República Mexicana, en la tabla 1 reporta la frecuencia de las diversas leucemias agudas acorde con la clasificación del grupo FAB (Franco-Américo-Británico). (Santoyo et al., 2013)

**Tabla 1.** Frecuencia de las diferentes variedades de Leucemia Aguda. (Tomada de Santoyo et al;2013)

Variedad	Casos		Variedad	Casos		Total
	n	%		n	%	
LLA 1	16	1.9	LMA3	83	10.0	n= 833, 100%
LLA2	457	54.9	LMA4	121	14.5	
LLA3	18	2.1	LMA5	8	1.0	
LMA0	2	0.2	LMA6	12	1.4	
LMA1	17	2.0	LMA7	0	0.0	
LMA2	99	11.9				

### 1.3 Leucemia Mieloide Aguda

La leucemia mieloide aguda (LAM ) es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación mieloide y una proliferación descontrolada de los progenitores mieloides anormales, que se acumulan en la médula ósea y posteriormente en la sangre (Grove et al.,2014), esta representa el segundo tipo de leucemia más frecuente en la infancia con 15% y el tipo más común de Leucemia Aguda en población adulta con un 80 a 90 %, la mortalidad es elevada y se asocia directamente con la enfermedad o con las complicaciones relacionadas al tratamiento. (Bugá et al.,2014)

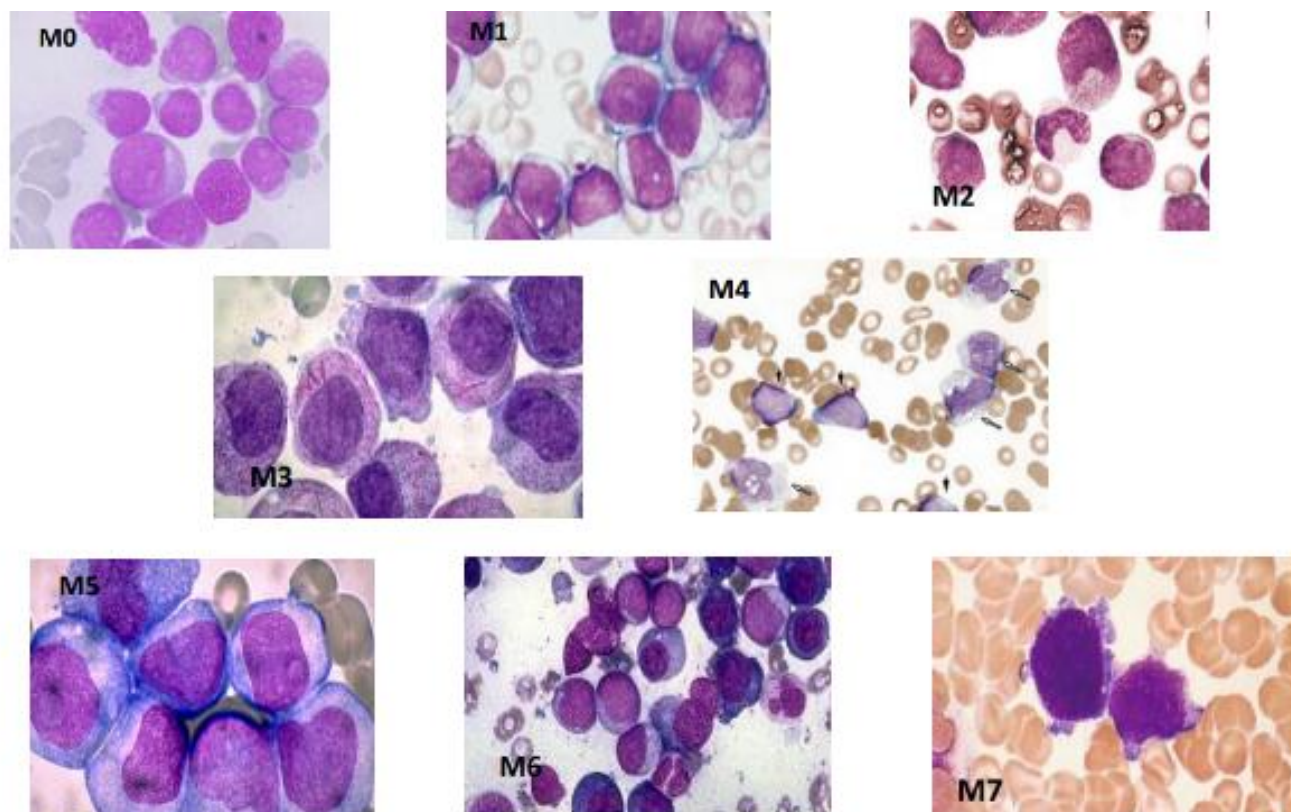
En la década de los 80 el grupo cooperativo Franco Americano-Británico (FAB), ha subdividido a LMA en diferentes variantes basados en su morfología y citoquímica, el examen de la morfología de la médula nos permite calcular el porcentaje de blastos en el espacio medular y datos morfológicos que distinguen entre los blastos mieloides, también se realizan diferentes tinciones específicas, en los 90 los estudios citogenéticos y de inmunofenotipo consolidaron un papel fundamental en el diagnóstico. (Merino,2010)

### 1.3.1 Morfología, inmunofenotipo y citogenética.

Las LAM se diferencian de acuerdo con sus características morfológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de Leucemias Mieloides Agudas. (Tomado de Beveridge et.al;2003)

	<b>Morfología</b>	<b>Histoquímica</b>	<b>Inmunofenotipo</b>	<b>Citogenética</b>
<b>MO</b>	Indiferenciada	MPO + <3%; PAS y esterasa-	HLA-DR CD13 CD 33,CD34,CD7	11q13; cambios complejos en 5 o 7; t(9;22) ocasionalmente
<b>M1</b>	Mieloide	MPO + <3%; PAS y esterasa-	Similar a MO excepto CD15	-5,-7,-17, del 3 p,+21,+8
<b>M2</b>	Mieloide con diferenciación	MPO >10%; PAS y esterasa-	HLA-DR CD13 CD 33, CD34,CD15	(8;21); del 3p o inv(3); -5,-7,t(6,9)+8
<b>M3</b>	Promielocítica	MPO ++; PAS y esterasa-	HLA-DR CD13, CD15,CD33, CD34	t(15;17)
<b>M4</b>	Mielomonocítica	MPO y esterasa +; PAS -	HLA-DR CD14,CD15, CD34,CD33,CD13,CD11	Inv(16) o -16q; t(18,21) a veces -5,-7,+8
<b>M5</b>	Monocítica	MPO -; PAS y esterasa +		t(9;11)(p21;p23),+8
<b>M6</b>	Eritroleucemia	PAS ++; MPO y esterasa -	HLA-DR CD13,CD33,glicoforina	-7 o del(7q) y/o -5 o del -3,+8
<b>M7</b>	Megacarioblástica	PAS ; MPO y esterasa -	HLA-DR CD34,CD33,CD41 CD61 , glicoproteína plaquetaria	20-25% hiperploidia +8,+21



**Figura 2.** Morfología de Leucemia Mieloide Aguda, M0-Indiferenciada, M1-Mieloide, M2-Mieloide con diferenciación, M3-Promielocítica, M4-Mielomonocítica, M5-Monocítica, M6-Eritroleucemia, M7-Megacarioblástica. (Tomada de Ruiz; 1994)

A pesar de su utilidad diagnóstica y de constituir la primera herramienta a la mano de los investigadores, se reconoció que la interpretación morfológica, inmunofenotípica y citogenética era insuficiente para establecer grupos de riesgo adecuados por lo tanto, en la última década comienzan a descifrarse algunos mecanismos que originan las diferentes variantes de LMA. (Harmut et al., 2017) En las neoplasias, las alteraciones moleculares suelen afectar a genes claves implicados en el control del ciclo celular o en mecanismos de apoptosis.(Kelly & Guilliand, 2002) También pueden ser secundarias a la fusión de genes normales y a la formación de genes nuevos que dan lugar a proteínas oncogénicas.(Takahashi, 2011) El resultado de las alteraciones moleculares da un desequilibrio del ciclo celular o la supresión de los mecanismos de apoptosis, que tienen como consecuencia la prolongación de la vida celular; por lo tanto, en el 2016 la OMS sugiere una nueva clasificación en la que relaciona las diferentes variedades de LMA (Chen, Shen & Chen, 2013) como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación de la OMS 2016 de las neoplasias mieloides y de la Leucemia Mieloide Aguda. (Tomado de Harmut et.al; 2017)

<b>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) Y NEOPLASIAS RELACIONADAS</b>
<b>LMA con anomalías genéticas características</b>
LMA con t(8;21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1(CBFA/ETO) LMA con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), CBFB-MYH11  Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q11-12),PML-RARA LMA con t(9;11)(p22;q23),MLLT3-MLL LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 LMA con inv (3) (q21;q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2),RPN1-EVI1 LMA (megacarioblástico) con t (1;22)(p13;q13), RBM15-MKL1 Entidad provisional: LAM con BCR-ABL1 LMA con NPM1 mutado  LMA con mutaciones bialelicas CEBPA Entidad provisional: LAM con RUNX1 mutado
<b>LMA con características relacionadas con la mielodisplasia</b>
<b>Neoplasia mioide asociadas a tratamiento</b>
<b>LMA, no categorizada</b>
LMA con diferencia mínima LMA sin maduración LMA con maduración Leucemia aguda mielomonocítica Leucemia monoblástica y monocítica aguda Leucemia eritroide aguda  Leucemia megacarioblastica aguda Leucemia basofilica aguda  Panmielosis aguda con mielofibrosis
<b>Sarcoma mioide</b>
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down Mielopoyesis anormal transitoria Leucemia mioide relacionada con el síndrome de Down Neoplasia celular dendrítico plasmacitoide blastico.

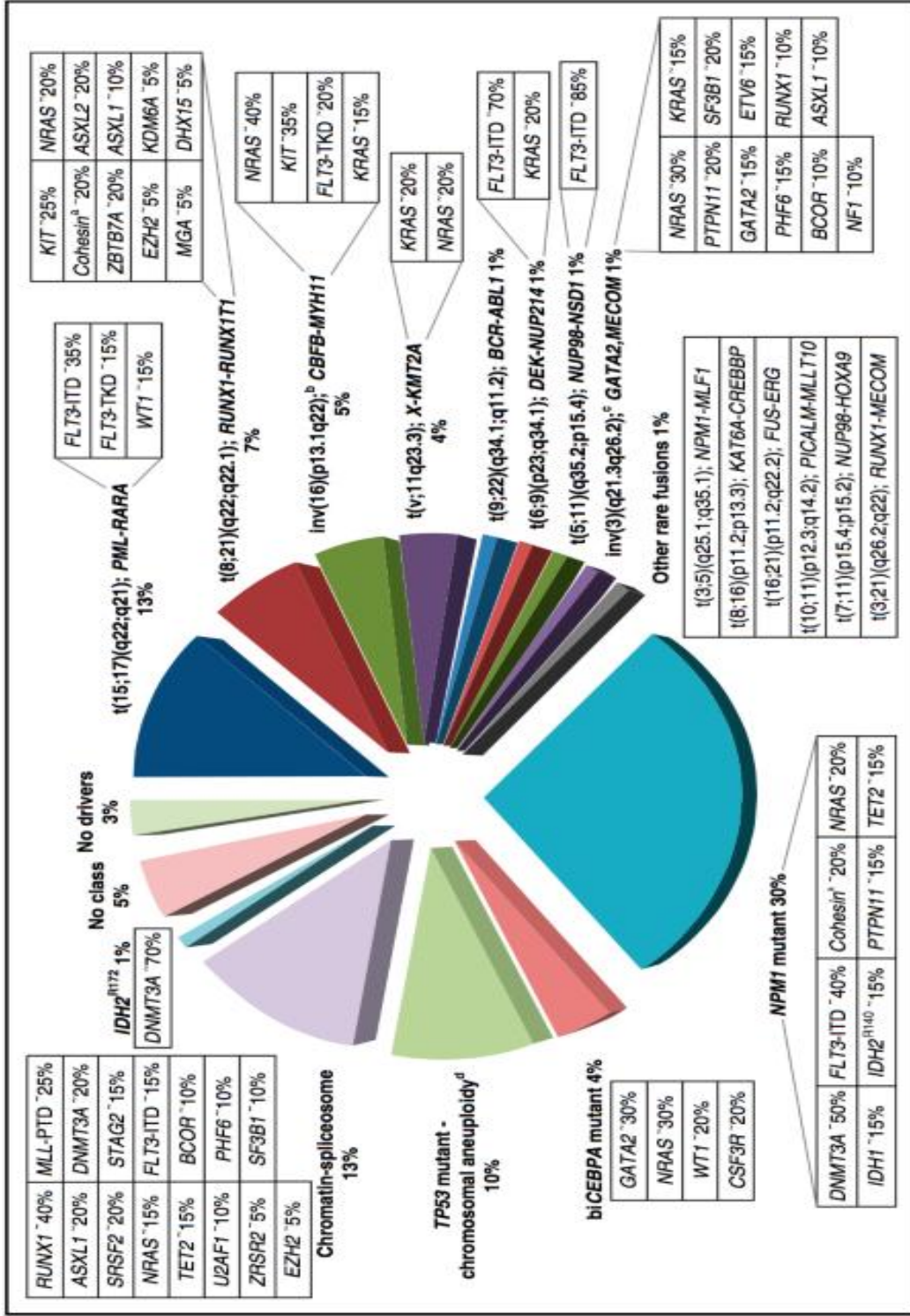


Recientemente se ha propuesto una clasificación en la que se agrupan ciertas anomalías cromosómicas y genéticas, solas o combinadas, de las cuales se dividen cuatro grupos de riesgo como se observa en la tabla 4. (Mrózek et al., 2012)

**Tabla 4.** Clasificación de datos citogenéticos y biología molecular de LAM con factor pronóstico. (Dohner et.al; 2017)

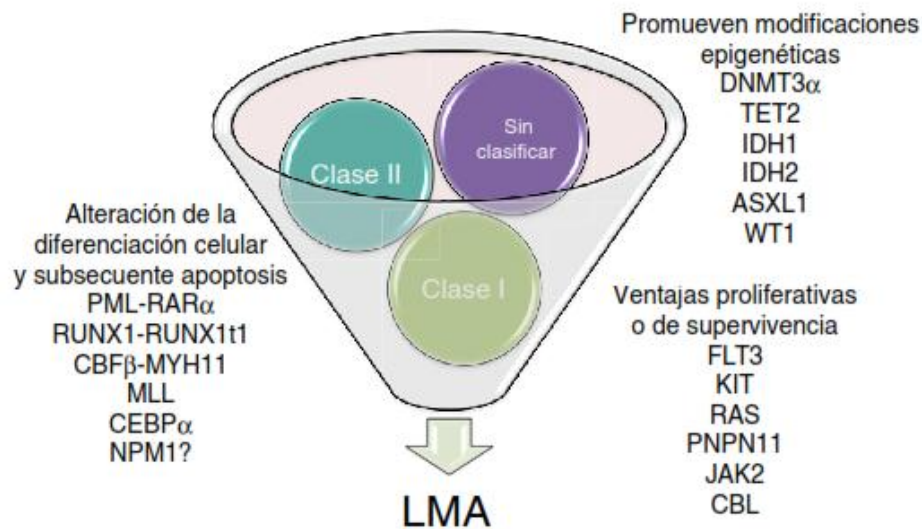
Grupo de riesgo	Subconjuntos
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 NPM1 mutado sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD <sup>bajo</sup> CEBPA con mutación bialélica
<b>Intermedio-I</b>	NPM1 mutado con FLT3-ITD <sup>alto</sup> Wild-type NPM1 sin FLT3-ITD con FLT3-ITD <sup>bajo</sup>
<b>Intermedio-II</b>	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); MLL rearreglo -5 o(5q); -7/abnl(17p)

Con el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación, se descubren genes que se encuentran relacionados a la progresión de LMA, recientes estudios han demostrado que las mutaciones y la desregulación en la expresión en los genes principalmente en pacientes con LMA cariotipo normal (CN-LMA) en particular presentan mayor heterogeneidad (Harmut et al., 2017) como se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Clases moleculares de LMA y mutaciones más recurrentes pacientes mayores de 65 años. (Tomado de Harmut et.al; 2017)

Las mutaciones pueden actuar solas o combinadas para el desarrollo de LMA y estas se agrupan en 2 clases; Clase I confieren ventajas proliferativas o de supervivencia en las cuales se encuentra involucrados genes como FLT3, KIT, RAS, PNP11, JAK2, la Clase II alteran los procesos de diferenciación celular y apoptosis en el que se encuentran involucrados PML-RAR  $\alpha$ , RUNX1-RUNX1t1, CBF $\beta$ - MYH11, MLL, CEBP $\alpha$ , NPM1, recientemente se han descubierto diversas mutaciones que no se encuentran en ninguna clasificación pero promueven modificaciones epigenéticas como por ejemplo DNMT3 $\alpha$ , TET2, IDH1, IDH2, ASXL, WT. (Laguna, 2016)



**Figura 4.** Modelo de cooperación entre mutaciones asociadas a LMA. (Tomado de Laguna;2016)

### 1.3.2 Diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda

El diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda se lleva a cabo mediante una recopilación de datos clínicos (biometría hemática, aspirado de medula ósea, citogenética y biología molecular). (Lichtman & Liesveld, 2005)

Se realiza un análisis de frotis en médula ósea siguiendo los criterios de FAB, al igual que una citoquímica con tinciones como mieloperoxidasa, negro de Sudán para M1, M2, M3 y la tinción de esterasa para M4, M5 y PAS para M6, el inmunofenotipo en el que se identifica el predominio de cada población celular y se complementa con estudios de citogenética y biología molecular en los cuales se clasificará a los pacientes en diferentes grupos de riesgo. (Gutiérrez, 2014)

### **1.3.3 Tratamiento de Leucemia Mieloide Aguda**

La fase inicial de la quimioterapia se llama “tratamiento de inducción”. La inducción puede implicar el uso simultáneo de varios fármacos, o una secuencia planificada de tratamientos. Para la mayoría de los subtipos de la LAM, los pacientes se tratan con una antraciclina, como daunorrubicina, doxorrubicina o idarrubicina, combinada con citarabina (también llamada “citosina arabinósida” o “ara-C”). Es posible que se añadan otros fármacos, o que se administren sustitutos para pacientes en mayor riesgo, con una enfermedad resistente al tratamiento o en recaída. Para los pacientes que sufran una recaída de LAM o pacientes con alto riesgo de recaída después de la quimioterapia, puede que se añada al plan de tratamiento un autotrasplante o alotrasplante. La antraciclina y la citarabina actúan de diferentes modos para detener la proliferación de las células de LAM. (Othus et al., 2014)

La daunorrubicina por lo general se administra durante los primeros 3 días de tratamiento, la citarabina comienza a administrarse al mismo tiempo, pero la duración es de 7 a 10 días, este tratamiento también se conoce como “3+7”. (Lowenberg et al., 2010)

El tratamiento que se utiliza para M3 es el anterior más tabletas de ácido transretinoico de la cual se observa un 85 a 90% de remisiones completas. (Huang et al., 1998)

El desarrollo de nuevos fármacos moleculares como blancos terapéuticos para leucemia mieloide en los que se espera mejores resultados en los pacientes como por ejemplo para IDH1/IDH2, existen tres medicamentos de relevancia los cuales son AG-120, Enasidenib, Ivosidenib (Celgene), en los cuales se observan tasas de remisión del 57% junto con el esquema 7+3. (Dang et al., 2009)

## **1.4 Enzima Isocitrato Deshidrogenasa.**

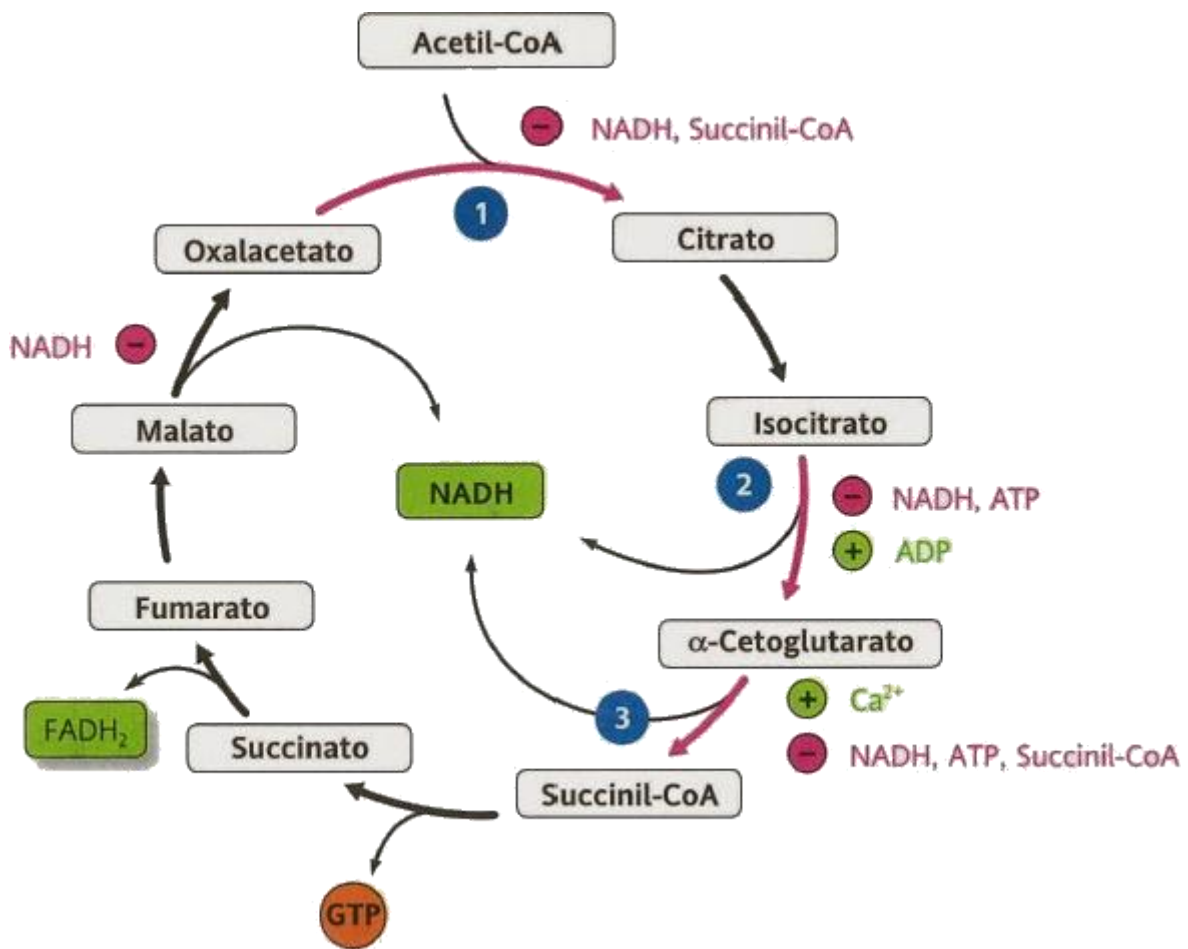
### **1.4.1 Ciclo de Krebs.**

El ciclo de Krebs también conocido como ciclo cítrico o de ácidos tricarbónicos es la vía final común para la oxidación de las moléculas energéticas: aminoácidos, ácidos grasos e hidratos de carbono, liberando energía en forma utilizable, todo este mecanismo oxidativo se divide en tres etapas de las cuales, el ciclo de Krebs es la segunda. (Owen et al., 2016)

En la primera etapa, los carbonos de estas macromoléculas dan lugar a moléculas de dos carbonos, e incluye las vías catabólicas de aminoácidos., la beta oxidación de grasos y glucólisis. La tercera etapa es la fosforilación oxidativa, en la cual el poder reductor de

NADH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y  $\text{FADH}_2$  (flavin adenín dinucleótido fosfato) generado se emplea para la síntesis de ATP(adenosin trifosfato). (Pérez, 2012)

La regulación del ciclo de Krebs se da por retroalimentación negativa, por unión alostérica del ATP, que es un producto de la vía y un indicador del nivel energético de la célula, entre las enzimas involucradas la de piruvato deshidrogenasa que sintetiza al acetyl-CoA necesario para la primera reacción del ciclo a piruvato, procedente de la glucólisis o del catabolismo de aminoácidos, al igual las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato, que catalizan las primeras tres reacciones del ciclo de Krebs, son inhibidas por altas concentraciones de ATP, esta regulación frena este ciclo degradativo cuando el nivel energético de la célula está equilibrado, algunas enzimas son reguladas negativamente cuando el nivel reductor de la célula es elevado. El mecanismo que lleva a cabo es a través de una inhibición competitiva por producto NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) de las enzimas que emplean  $\text{NAD}^+$  como sustrato. Así que regulan, entre otros, los complejos piruvato deshidrogenasa y citrato sintasa. (Pérez, 2012).



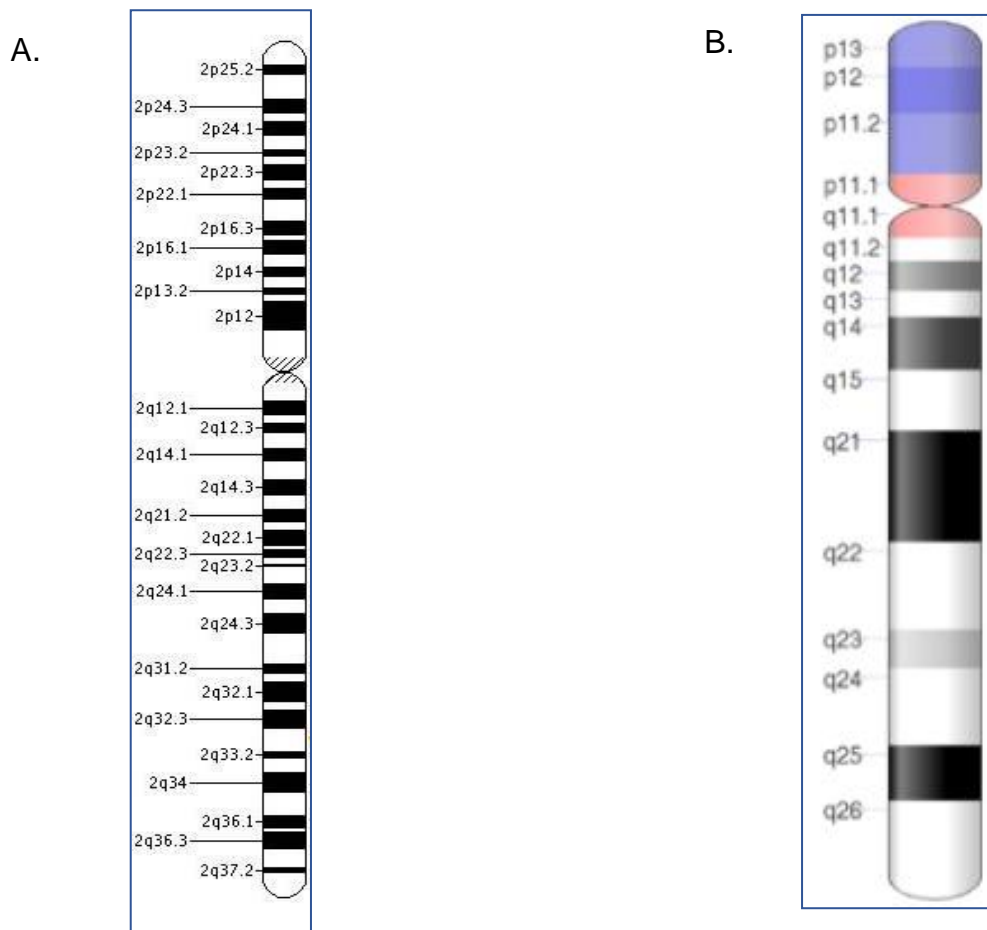
**Figura 5.** Regulación del ciclo de Krebs. La regulación se ejerce principalmente por la disponibilidad de sustratos, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> mitocondrial y la regulación alostérica ejercida sobre las enzimas citrato sintasa (1) isocitrato deshidrogenasa (2) y succinil-CoA (3). (Tomada de Blasco et.al; 2010)

### 1.4.2 Isocitrato Deshidrogenasa.

La enzima isocitrato deshidrogenasa participa en metabolismo de los carbohidratos en el ciclo de Krebs , que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar  $\alpha$ -cetoglutarato, la enzima isocitrato deshidrogenasa es dependiente de  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}^-$  , existen más de tres isoenzimas de IDH, y se ven relacionados con la supresión de apoptosis, estimulación de supervivencia y crecimiento celular, esto debido a que protegen a la célula y mitocondria de daño oxidativo a partir de la formación de radicales libres de oxígeno, por lo tanto las moléculas de IDH están relacionadas a la síntesis de energía del ciclo de Krebs, también contribuyen a la protección celular mediante la producción de  $\text{NADPH}$  y regulan la función de procesos dependientes de  $\alpha\text{-KG}$ . (Yasutake et al.,2003)

IDH1 cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalasuccionato utilizando exclusivamente  $\text{NADP}^+$  como aceptor de electrones, el oxalasuccionato es uno de los intermediarios de la reacción del isocitrato, la proteína tiene una longitud de 414 aminoácidos, se localiza en el citoplasma específicamente en el peroxisoma, se codifica en el cromosoma 2q33.3 (Persons et al.,2008)

IDH2 es una variante de la enzima IDH1, cataliza las reacciones de la descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccionato utilizando exclusivamente el  $\text{NADH}^+$  como aceptor de electrones, la proteína tiene una longitud de 452 aminoácidos, su localización es en la mitocondria, se codifica en el cromosoma 15q26.1 (Geisbrecht & Gould, 1999)



**Figura 6.** (A) Cromosoma 2q33.3 IDH1 y (B) Cromosoma 15q26.1 IDH2. (Tomada de Genetics home reference; 2015)

### 1.4.3 Mecanismo de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa

IDH tiene un rol importante en la generación de metabolitos y el flujo de electrones entre la mitocondria y el citosol. La biosíntesis de metabolitos en el ciclo de Krebs, IDH1/IDH2 representa la mejor vía celular para la generación de NADPH en tejido junto con la vía de las pentosas. La catalización de isocitrato deshidrogenasa en  $\alpha$ -KG por IDH1/IDH2 produce un equivalente por NADP y es un factor esencial en la reducción para los controles de mecanismos de daños al reducir el glutatión, todo esto conduce una pérdida reductiva de IDH1/IDH2 en función a las células cancerosas, lo que hace es leer el DNA dañado y el genoma inestable. (Nekrutenko et al., 1999)



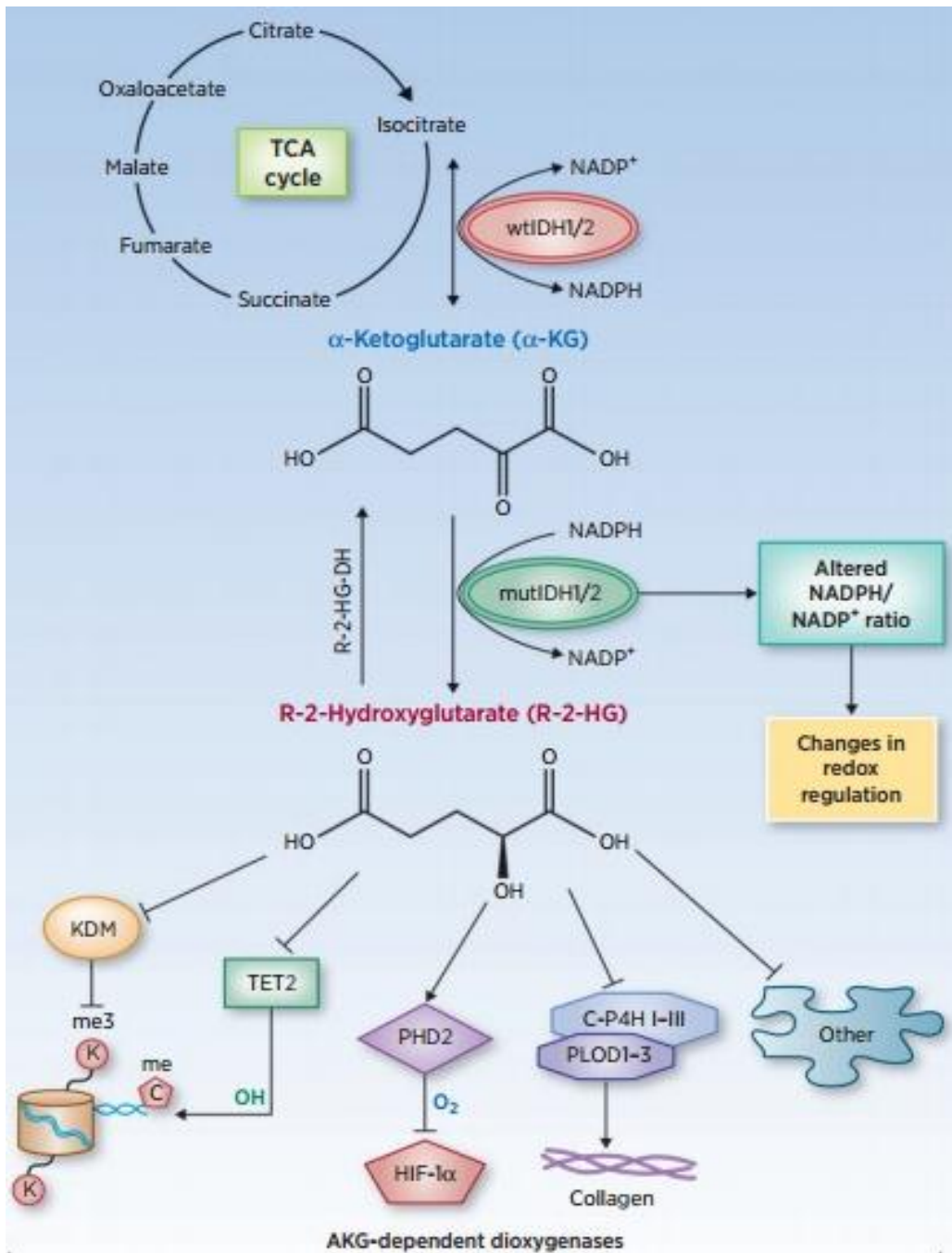
#### 1.4.4 Vía de señalización de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa mutada

Las mutaciones descritas actualmente de IDH abordan un panorama en el cual se ven involucrados diferentes mecanismos que alteran a la célula ocasionando un daño somático, en donde el sitio activo donde se encuentra la arginina se unirá con el isocitrato modifica su función específicamente en los codones R132 para IDH1 y R172, R140 para IDH2, lo que ocurre es una sustitución de aminoácidos, en el que se reducirá la formación de  $\alpha$ -KG y NADPH y se producirá 2- Hidroxiglutarato inhibiendo a las enzimas dioxigenasas. (Yan et al., 2009)

Las modificaciones epigenéticas causadas por el producto 2-Hidroxiglutarato por las mutaciones en el oncometabolito isocitrato deshidrogenasa dan como resultado diferentes procesos que tienen impacto en:

- Núcleo celular causando la inhibición de la histona lisina desmetilasa junto con TET2 involucrada en la maduración de Células Madre Hematopoyéticas, (Delhommeau et al., 2009) al igual que compactación de histonas de DNA que es resultado de la hipermetilación, produciendo un silenciamiento de genes que ayudan a la hematopoyesis. (Loenarz & Shofield, 2011)
- La degradación del Factor inducible a Hipoxia(HIF-1 $\alpha$ ), la enzima prolihidroxilasa es la responsable de regular la estabilización y activación del factor inducible a hipoxia que en condiciones normales de oxígeno es degradada por la enzima, en cambio en situaciones de hipoxia no ocurre la degradación de HIF, y por lo tanto se acumula dando como resultado la transcripción de genes relacionados con el crecimiento de la célula tumoral, invasión, angiogénesis y metástasis. (Chesnelong et al., 2014)
- Colágeno: Las alteraciones de este oncometabolito involucran al colágeno ocasionando el deterioro de la maduración lo que puede provocar metástasis. (Sasaki et al., 2012)
- Por otra parte, la mutación de IDH disminuye los niveles de NADPH el cual mantiene el balance oxidativo celular regulando a especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando se encuentra mutado los niveles de ROS aumentan provocando así un daño oxidativo, disminuyendo la supervivencia de la célula. (Zhang et al., 2013)

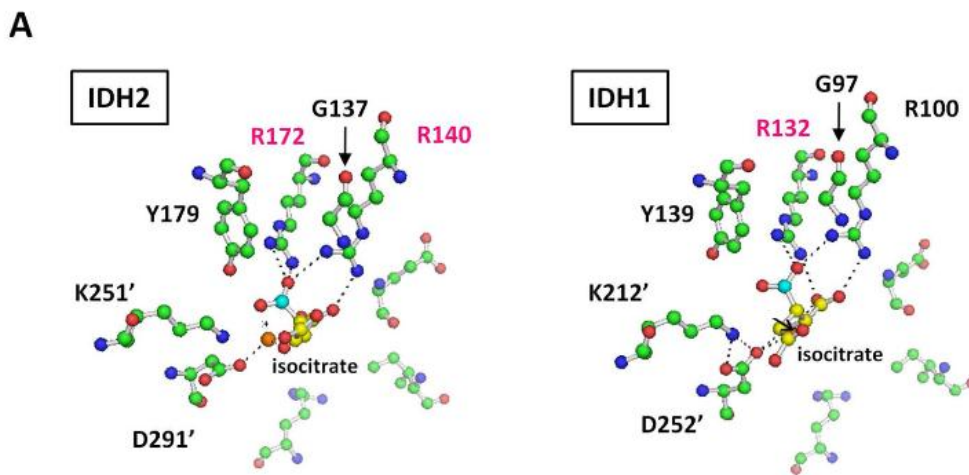
Como se puede observar en la figura 7 que ejemplifica el mecanismo molecular en la que se encuentran involucradas IDH1/IDH2 asociadas a tumorigenesis, la conversión del isocitrato en  $\alpha$ KG en pacientes sanos produciendo NADPH, en cambio cuando la enzima se encuentra mutada se genera el oncometabolito R-2 HG que consume el NADPH generado, (Owen et al., 2016) de igual forma se observa las modificaciones epigenéticas que involucran a los genes mencionados anteriormente.



**Figura 7.** Mecanismo molecular de la enzima isocitrato deshidrogenasa mutada.  
(Tomado de Clark et.al;2016)

### 1.4.5 Tipos de mutación de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa.

Las mutaciones reportadas en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda serán identificadas como ya se ha mencionado cuando el aminoácido de arginina es intercambiado al existir una modificación en la base nitrogenada dando como resultado una lectura diferente del triplete de aminoácidos, Sadudde y colaboradores en su artículo muestran las mutaciones más frecuentes de IDH<sup>48</sup>, como se observa en la tabla 3.



**Figura 8.** Estructura de IDH1/IDH2 en el cual se muestra en rosa el sitio activo de la arginina al que se unirá con el isocitrato. (Tomado de Ward et al; 2010)

**Tabla 5.** Mutaciones presentes en la enzima Isocitrato Deshidrogenasa.

<b>Mutación</b>	<b>Cambio de aminoácido</b>
IDH 1 R 132 H (395 G>A)	Arginina por Histidina
IDH 1 R 132 C (394 C >> T)	Arginina por Cisteína
IDH 1 V 178 I	Valina por Isoleucina
IDH 1 G 105 G (678 G > A)	Glicina por Glicina
IDH 2 R 172 M (515 G >T)	Arginina por Metionina
IDH2 R 172 K (515 G > A)	Arginina por Lisina
IDH2 R 140 Q (421 T > A)	Arginina por Glutamina
IDH2 R 120 K (421 G > A)	Arginina por Lisina

## 2. JUSTIFICACIÓN

La Leucemia Mieloide Aguda es una enfermedad heterogénea con un mal pronóstico para los pacientes que las presentan, en más de 40 años la tasa de sobrevida de los pacientes no ha cambiado ya que el tratamiento de inducción es muy amplio y no tiene un impacto favorable en los subtipos de LMA con excepción de LMA -M3, la ventaja que representa tener blancos terapéuticos para ciertos rearrreglos cromosómicos podría brindar un panorama más definido para la elección de tratamiento de dicha enfermedad.

El estudiar ciertas mutaciones genéticas de la enzima isocitrato deshidrogenasa nos vislumbrara una brecha de conocimiento en el que nos permitiremos conocer la frecuencia de este gen en población mexicana al detectarlo en los pacientes y con ello implementar un tratamiento dirigido hacia la mutación de IDH , en la actualidad existen fármacos que son utilizados como blanco terapéutico para estas mutaciones y se ha demostrado que la sobrevida de los pacientes se ve modificada ocasionando una respuesta de remisión completa.

El presente estudio pretende dar a conocer la frecuencia de las diferentes mutaciones de la enzima isocitrato deshidrogenasa en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo* del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”.

### **3. HIPÓTESIS**

Si se identifican las mutaciones de enzima IDH1/IDH2 en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda *de novo* entonces será posible determinar cuáles son las más frecuentes en los pacientes del Hospital General de México y con ello correlacionar con los datos clínicos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Identificar las mutaciones del gen isocitrato deshidrogenasa mediante las técnicas de genotipificación y MLPA en Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda *de novo* del Hospital General de México.

### 4.2 Objetivos Particulares

- Conocer la frecuencia de las mutaciones del gen IDH 1/IDH2 en pacientes con LMA.
- Correlacionar los datos clínicos con las mutaciones.



## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 Tipo de diseño y estudio.

Estudio experimental, retrospectivo, transversal y analítico.

### 5.2 Población y tamaño de muestra

La población estudiada fue del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”, con un total de 84 pacientes diagnosticados con leucemia mieloide aguda *de novo*, en un periodo de tiempo de 2014-2017.

#### 5.2.1 Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra fue de 44 pacientes se determinó en base a datos que fueron obtenido considerando el promedio de los ingresos actuales de casos por año de leucemia mieloide aguda *de novo* al laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital General de México, el tamaño de la muestra calculada fue de 50 pacientes en un periodo de Enero a Diciembre del 2017. Se utilizo un nivel de confianza 95%.

### 5.3 Criterios de inclusión

- Pacientes del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” diagnosticados con leucemia mieloide aguda *de novo*.
- Historial clínico completo.
- Pacientes mayores de 14 años.
- Hombres y Mujeres.
- Muestra *de novo*.

### 5.4 Criterios de exclusión

- Pacientes que presenten co-morbilidad con otro tipo de cáncer.

### 5.5 Criterios de eliminación

- Material genético insuficiente o de mala calidad.

## 5.6 Tabla 6. Variables experimentales

Variable	Definición conceptual	Tipo de Variable	Escala
<b>IDH 1 R 132 H (395 G&gt;A)</b>	Arginina por Histidina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH 1 R 132 C (394 C &gt; T)</b>	Arginina por Cisteína	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH 1 V 178 I</b>	Valina por Isoleucina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH 1 G 105 G (678 G &gt; A)</b>	Glicina por Glicina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH2 R 172 K (515 G &gt; A)</b>	Arginina por Metionina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH 2 R 172 M (515 G &gt;T)</b>	Arginina por Lisina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>IDH2 R 140 Q (421 G&gt;A)</b>	Arginina por Glutamina	Cualitativa dicotómica	Presente o Ausente
<b>Edad</b>	Edad que refiere el sujeto a la fecha de diagnostico	Cuantitativa Discontinua	Años cumplidos
<b>Hemoglobina</b>	Variable que evalúa el nivel de Hemoglobina en la sangre	Cuantitativa Continua	12-16 g/dL
<b>Leucocitos</b>	Variable que evalúa el nivel de leucocitos en la sangre	Cuantitativa Continua	4.5-10 x10 <sup>3</sup> µL
<b>Plaquetas</b>	Variable que evalúa el nivel de plaquetas en la sangre	Cuantitativa Continua	150-450 x 10 <sup>3</sup> µL

<b>Lactato Deshidrogenasa (LDH)</b>	Variable que evalúa el nivel de Lactato Deshidrogenasa en el suero	Cuantitativa Continua	98-192 UI/L
-------------------------------------	--	--------------------------	-------------

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

#### 6.1.1 Aspirado de Médula Ósea (AMO) o extracción de Sangre Periférica (SP).

Se realizó un aspirado de médula ósea o toma de muestra de sangre periférica para obtención de la sangre del paciente con diagnóstico confirmado de leucemia mieloide aguda *de Novo*.

### 6.2 Aislamiento de Leucocitos de AMO y SP

Las muestras obtenidas por aspirado de médula ósea o toma de sangre periférica se les realizó un procedimiento en el cual se emplean diferentes soluciones para el aislamiento de leucocitos.

Como primer paso se realizó un mezclado de una solución de PBS con la médula ósea o sangre periférica en una proporción de 1:1, se centrifugó por 5' a 2500rpm, se procedió a retirar la capa leucocitaria, posteriormente se añadió una solución hipertónica que permitió la lisis de eritrocitos en una proporción de 1:2, se incubaron por 10' a 4°C y se volvió a centrifugar por 5' a 2500 rpm, el sobrenadante se decantó, a el pellet leucocitario se le realizó un segundo lavado con PBS y se centrifugó por 5' a 2500rpm, posteriormente se empaquetaron las células  $1 \times 10^6$  en tubos eppendorf de 1.5µL adicionando 750 µL de reactivo de DNAzol<sup>®</sup> y se almacenaron en refrigerador de -80°C.

### 6.3 Extracción y Purificación del DNA genómico

La extracción del DNA se llevó a cabo con el reactivo de DNAzol<sup>®</sup>, por el método de Chomczynsky, se le realizaron lavados al DNA, el primer paso fue la adición de etanol absoluto 300 µL con el cual precipito en DNA, se homogenizó, decantó y se procedió a realizar un segundo lavado del DNA con etanol al 70%, se homogenizó se decantó y dejó secar 5' a temperatura ambiente (TA), posteriormente se añadió una solución de tris base con EDTA (TE) 1x.

#### 6.4 Cuantificación, determinación de la calidad y la integridad del material genético

La cuantificación de DNA se realizó con el espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) a una longitud de onda de 260/280, el DNA fue diluido con agua inyectable en una dilución de 1:500 y se corroboró su integridad en un gel de agarosa al 1% cargando 5 µL de DNA + 2µL de buffer de carga y 2 µL de TE 1X, la corrida de la cámara de electroforesis fue de 70 volts por 30', el DNA fue almacenado a -20° C.

#### 6.5 Genotipificación de Mutaciones

La técnica de Genotipificación consistió en la discriminación alélica para la detección de dos variantes de secuencia de un único nucleótido (SNPs), para IDH 1 R105H (678 G>A) e IDH2 R140 Q (421 G>A), las sondas utilizadas son complementarias para cada uno de los SNP's y poseen un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un reportero en el extremo 3', durante la fase exponencial de la reacción la DNA polimerasa rompe sonda(s) hibridadas con el DNA, separando el fluorocromo del reportero y emitiendo una fluorescencia que cada una de las sondas o de ambas, de las cuales la detección de VIC<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup> o ambas nos dio a conocer si el paciente es homocigoto para el wild type de IDH1/IDH2 o heterocigoto para mutación.

Los ensayos se realizaron en el equipo StepOne<sup>™</sup> (Applied BioSystems, Life Technologies) con el Kit de genotipificación TaqMan<sup>®</sup> Genotyping MasterMix (Applied-BioSystems, Life Technologies). Las reacciones para cada una de las sondas utilizadas para las mutaciones fueron las siguientes 1.0 µL de DNA genómico, 0.7 uL de sonda, 10 µL de MasterMix, en un volumen final de 20 µL para el control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

Sonda	Gen	Mutación
C_42648573_10	IDH 1	G105G (678 G>A)
C_163475619_10	IDH2	R140 Q (421 T>A)

**Tabla 7.** Sondas TaqMan<sup>®</sup> utilizadas para la identificación de las mutaciones.

## 6.6 MLPA

Técnica de Multiplex Ligation-dependent probe amplification o Amplificación dependiente de ligación por sondas multiplex (MLPA).

La amplificación múltiple de sondas ligadas o MLPA es una variante de PCR en la cual se puede amplificar diferentes secuencias de DNA en una misma reacción utilizando un solo par de cebadores, en condiciones de ciclos de temperatura diferentes.

Por esta técnica se pueden amplificar regiones génicas cercanas o adyacentes con la finalidad de determinar con certeza la dosis génica en muestras de DNA de pacientes afectados de deleciones o duplicaciones en estado de heterocigoto e homocigoto.

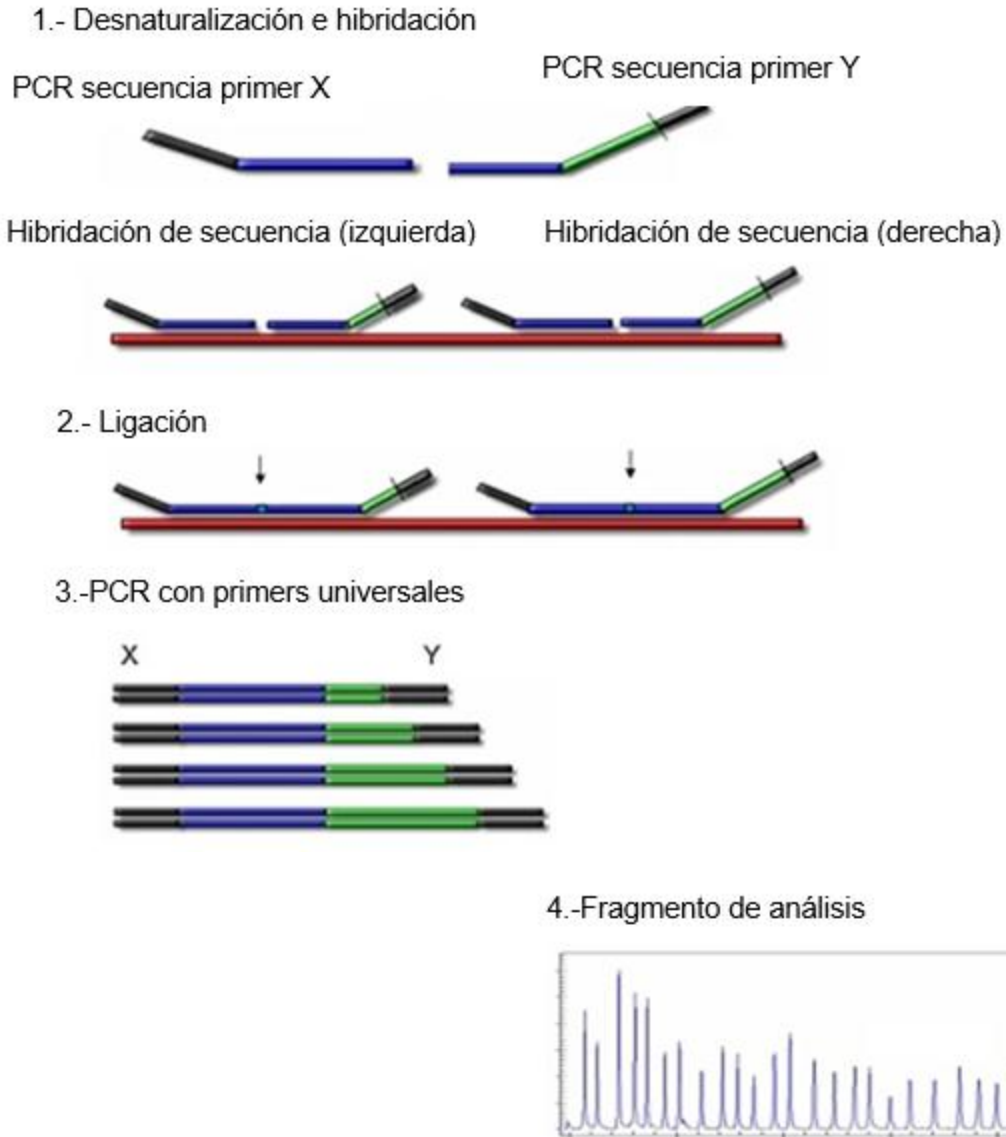
La técnica de MLPA permite el análisis mediante electroforesis capilar de hasta 45 sondas diferentes amplificando en una sola reacción, cada secuencia del DNA blanco es reconocida por una sonda conformada por dos mitades denominadas son 5' y 3', si existe complementariedad de las dos sondas con la muestra de DNA templado, se forma un enlace fosfodiéster entre ambas mediante la acción de una ligasa.

Los extremos de ambas sondas poseen una secuencia diseñada que es complementaria a un solo par de oligonucleótidos o cebadores universales que permiten amplificación por PCR, siempre y cuando las sondas 5' y 3' se hayan ligado.

Los cebadores universales permitirán la amplificación de todas las sondas bajo la mismas condiciones; los ensayos más recientes, incluyen un cebador universal marcado con una molécula fluorescente en el extremo 5' el cual permite la detección de los amplicones en un equipo de secuenciación automatizada, la distinción entre diferentes sondas ligadas y amplificadas correspondientes a cada una de las regiones blanco del DNA templado, se basa en el tamaño de pares de bases de cada sonda ligada y amplificada, como se observa en la figura 9.

Los ensayos de (MLPA) MRC-Holland<sup>®</sup> para la detección de las mutaciones de IDH1/IDH2 se realizaron en un termociclador convencional, con el kit P370-B1 BRAF-IDH1-IDH2, y para la detección de los amplicones se utilizó el equipo de secuenciación (ABY-3770XL) y el resultado obtenido se analizó en el software Coffalyser.net

\*Consultar anexo de Protocolo General de MLPA.



**Figura 9.** Esquema de MLPA. (MLPA MCR®-Holland)

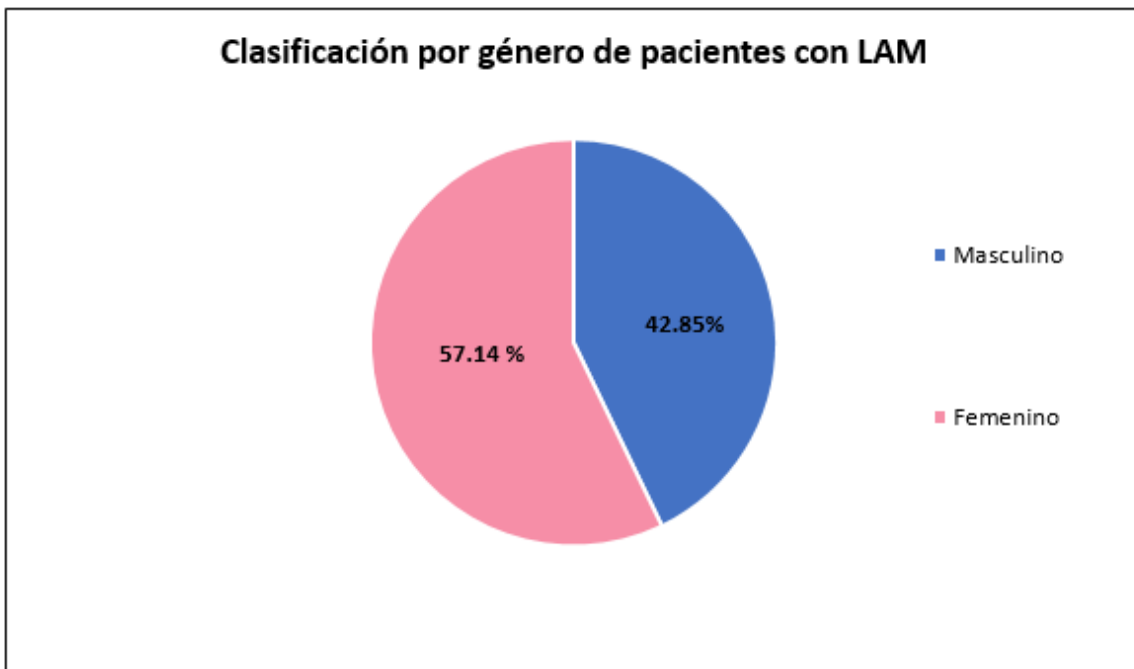
### 6.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para la obtención de medias y rangos de las diferentes variables numéricas. Para la diferencia de medias de las variables, se realizó la prueba t Student,  $p \leq 0.05$ , con un nivel de confianza del 95%.

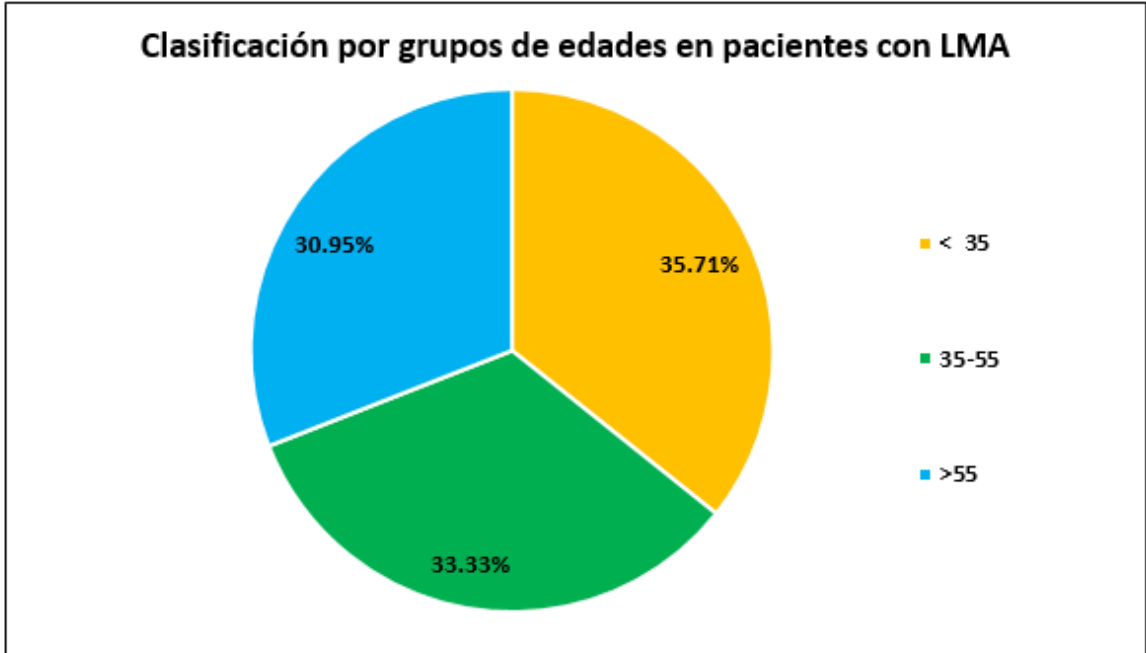
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características de la población.

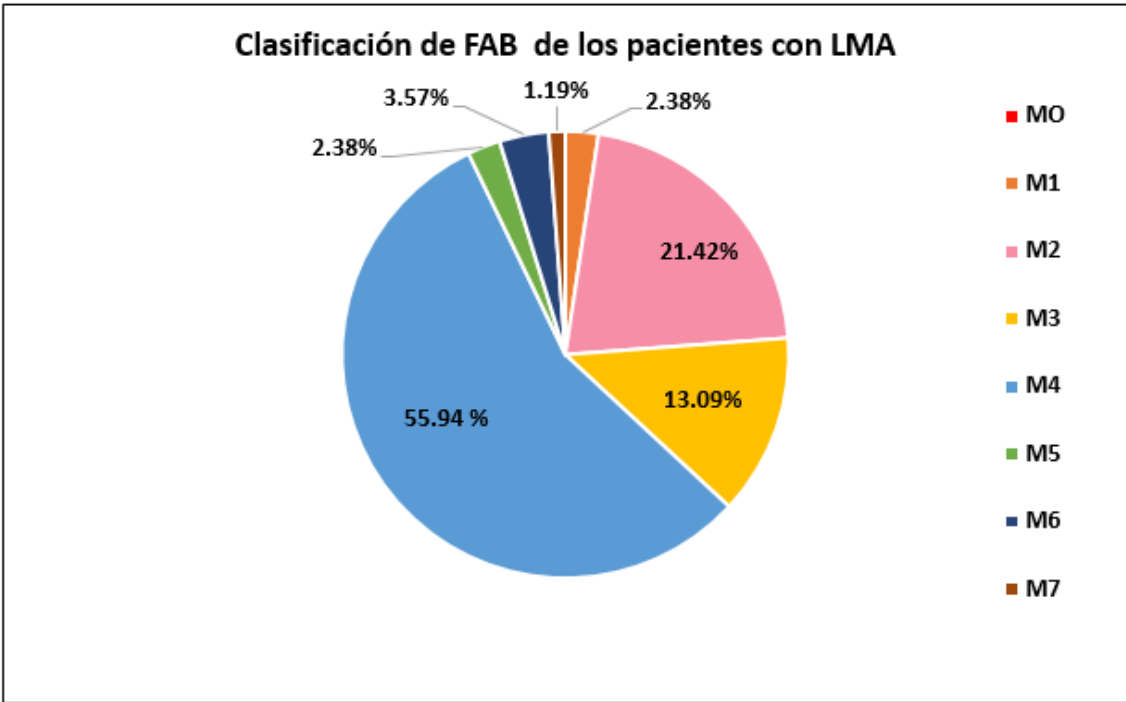
Se estudiaron 84 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda *de novo* en un periodo de 2014-2017 con expediente clínico completo de los cuales se obtuvo una frecuencia mayor del género femenino que corresponde  $n= 48(57.14\%)$ , del masculino se obtuvo  $n=36(42.85\%)$  como se observa en el gráfico 1, se dividió en tres grupos etarios el primero fue menor de 35 años de los cuales se obtuvo  $n=30(35.71\%)$ , el siguiente fue de 35-55 años con  $n=28(33.33\%)$ , el último grupo fue mayor a 55 años  $n= 26(30.95\%)$  como se observa en el gráfico 2.



**Gráfico 1.** Frecuencia de género en la población.



**Gráfico 2.** Frecuencia de edades en la población.



**Gráfico 3.** Clasificación de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda de Novo



El diagnóstico de leucemia mieloide aguda *de novo* se realizó con un análisis morfológico siguiendo los criterios de FAB de los cuales se encontró las siguientes variedades M1 n= 2 (2.38%), M2 n=18 (21.42%), M3n=11 (13.09%), M4 n=47 (55.94%), M5 n=2 (2.38%), M6 n=3(3.57%), morfológicamente no identificables solo con marcaje de anticuerpos monoclonales fueron las M7 n=1 (1.19%) y MO n=0 (0%) encontrando un mayor número de pacientes diagnosticados con LAM M4 como se observa en el gráfico 3.

Los datos clínicos que se obtuvieron a partir de los expedientes clínicos de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda fueron los siguientes leucocitos, hemoglobina, plaquetas, LDH, conteo de blastos y cariotipo como se muestra en la tabla 8, es importante destacar que todos los datos clínicos fueron tomados al diagnóstico de la patología.

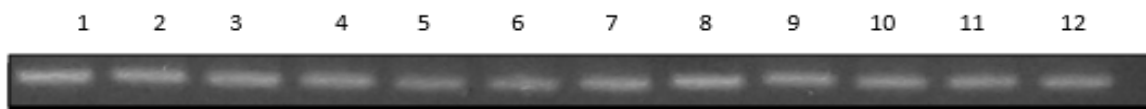
**Tabla 8.** Características Generales de los Pacientes.

Características de los pacientes (n=84)	n = (%)
Género	
Masculino	36 (42.85%)
Femenino	48 (57.14%)
Edad (años)	
Menor de 35 años	30 (35.71%)
35-55 años	28 (33.33%)
Mayor de 55 años	26 (30.95%)
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /uL)	Media (rango) 106.76 (0.2-344.3)
Hemoglobina (g/dL)	Media (rango) 7.97 (3.82-13.5)
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /uL)	Media (rango) 42.45 (3-228)
LDH (UI/L)	
Valor menor a 350 UI/L	38 (45.23%)
Valor mayor a 350 UI/L	40 (47.61%)
Variedades morfológicas. (FAB)	
M1 (sin diferenciación)	2 (2.38%)
M2 (con diferenciación)	18 (21.42%)
M3 (Promielocítica)	11 (13.09%)
M4 (Mielomonocítica)	47 (55.94%)
M5 (Monoblastica)	2 (2.38%)
M6 (Eritroblastica)	3 (3.57%)
Morfológicamente no identificables solo con marcaje con Ac Mo	
MO (indiferenciada)	0 (0%)
M7 (Megacarioblastica)	1 (1.19%)
Cuenta de blastos en MO al diagnostico	
<40 %	
40-60%	24 (28.57%)
>60%	7 (8.33%)
Cariotipo	42 (50%)
Citogenética normal	
Hiperdiploidia	42 (50%)
No crecimiento	1 (1.19%)
	41 (48.08%)

El conteo de blastos en médula ósea al diagnóstico se obtuvo lo siguiente menor de 40% de blastos n=24 (28.57%), 40-60% de blastos n=7 (8.33%) y mayor a 60% de blastos n=42 (50%). Los resultados que se obtuvieron de citogenética fueron los siguientes se encontró un cariotipo normal n=42 (50%), hiperploidia n=1 (1.19%), no crecimiento n=41 (48.08%) en los pacientes. Los pacientes a los cuales se les realizo citometría de flujo se observó mayor expresión en los antígenos CD33+, 34+,117+.

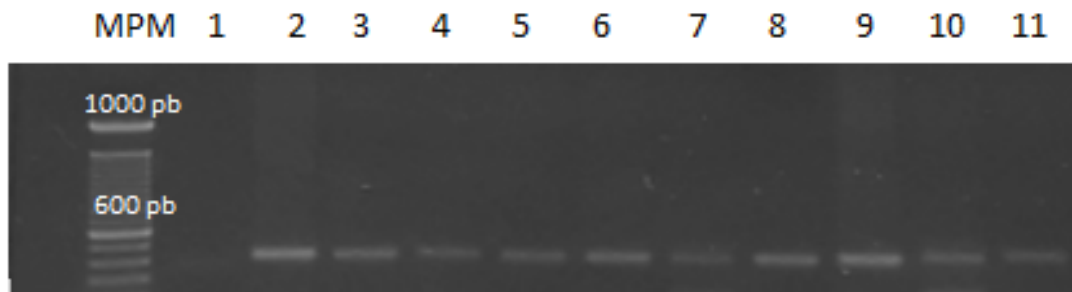
## 7.2 Cuantificación, Extracción de Material Genético y Análisis de Integridad de Muestras

El material genético se obtuvo de las muestras de Leucemia Mieloide Aguda de Novo Pacientes del Hospital General de México de las cuales a partir de su cuantificación se obtuvo una media de concentración 99.29 ng/ $\mu$ L y una proporción de 1.6, de igual manera se realizó una electroforesis de DNA genómico de 12 muestras como se observa en la figura 10 en la cual se puede verificar la integridad de la muestra ya que se observa una banda definida.



**Figura 10.** Electroforesis de DNA genómico de 12 pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*, en gel de agarosa al 1% obtenidas por el método de extracción de DNazol.

Se realizó una amplificación del gen constitutivo (GAPDH) para verificar la eficiencia del DNA extraído, obteniendo una banda de 440 pb.



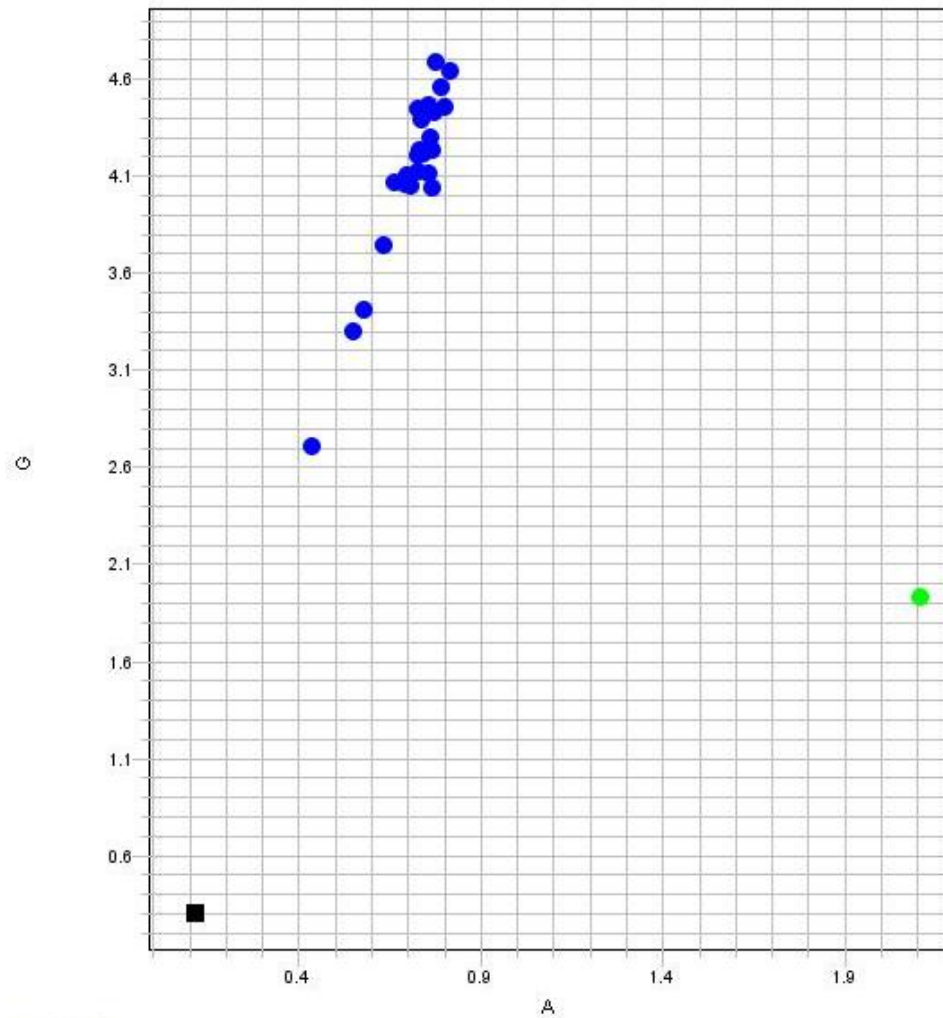
**Figura 11.** Gen constitutivo GAPDH (440pb) en 10 pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo*. Carril 1: Control negativo de la reacción. Carril 2-11: Pacientes. Gel de agarosa al 1.5%.

Para la identificación de las mutaciones se utilizaron los métodos de genotipificación y MLPA (amplificación dependiente de ligación por sondas multiplex).

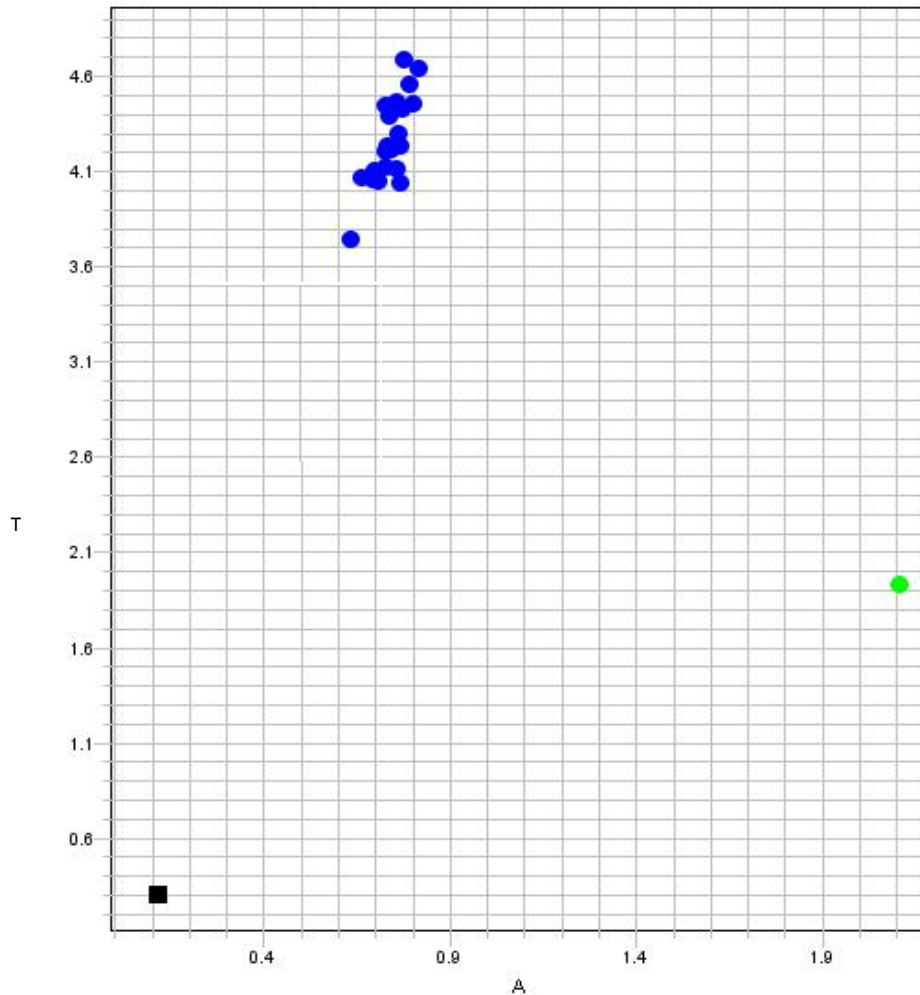
### **7.3 Genotipificación**

Se realizó un ensayo de genotipificación en el cual se identificaron las mutaciones para IDH 1 G105G (678 G>A) y para de IDH2 R140 Q (421 G>A). El total de pacientes analizados fue de 84 con Leucemia Mieloide Aguda de Novo, la frecuencia encontrada para estas variantes de mutaciones fue el mismo para IDH1 e IDH2 con un 1.2%, respectivamente.

Las Figuras 12 y 13 muestran el plot de discriminación alélica en el que indica el genotipo con base al software.



**Figura 12.** Plot de discriminación Alélica para la mutación IDH 1 G105G (678 G>A). El eje X representa el nivel de amplificación para el alelo A. El eje de las Y representa el nivel de amplificación para el alelo G. Los puntos en color azul representa a una paciente homocigoto sano, en verde heterocigoto.

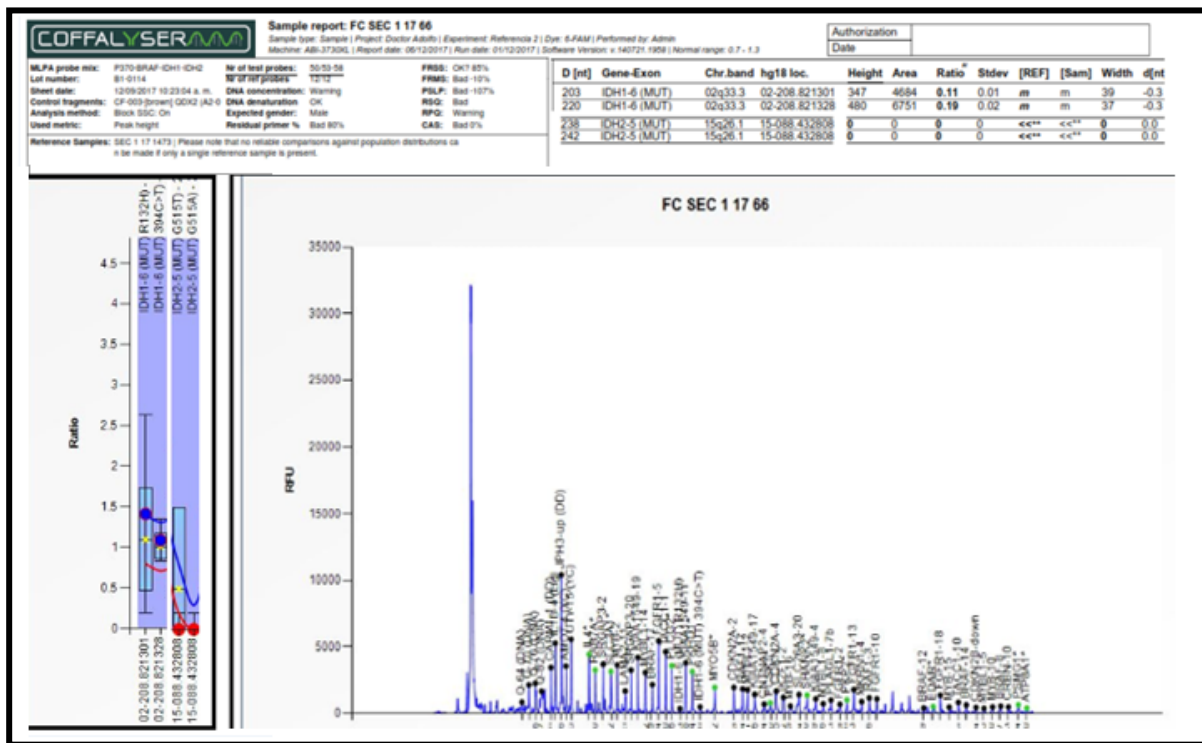


**Figura 13.** Plot de discriminación Alélica para la mutación de IDH2 R140 Q (421 T>A). El eje X representa el nivel de amplificación para el alelo T por lo tanto las el eje de las Y representa el nivel de amplificación para el alelo A. Los puntos en color azul representan a un paciente homocigoto sano, en verde heterocigoto.

## 7.4 MLPA

El ensayo de amplificación dependiente de ligación por sondas multiplex (MLPA) MRC-Holland para la detección de las mutaciones de IDH 1/2. El total de pacientes analizados fue de 37 con Leucemia Mieloide Aguda de Novo de los cuales se encontró una frecuencia para IDH 1 R132H del 3.6% e R132C del 2.4%, por otra parte la identificación de IDH2 para las mutaciones R172K (2.4%) y R172M fue de 0%

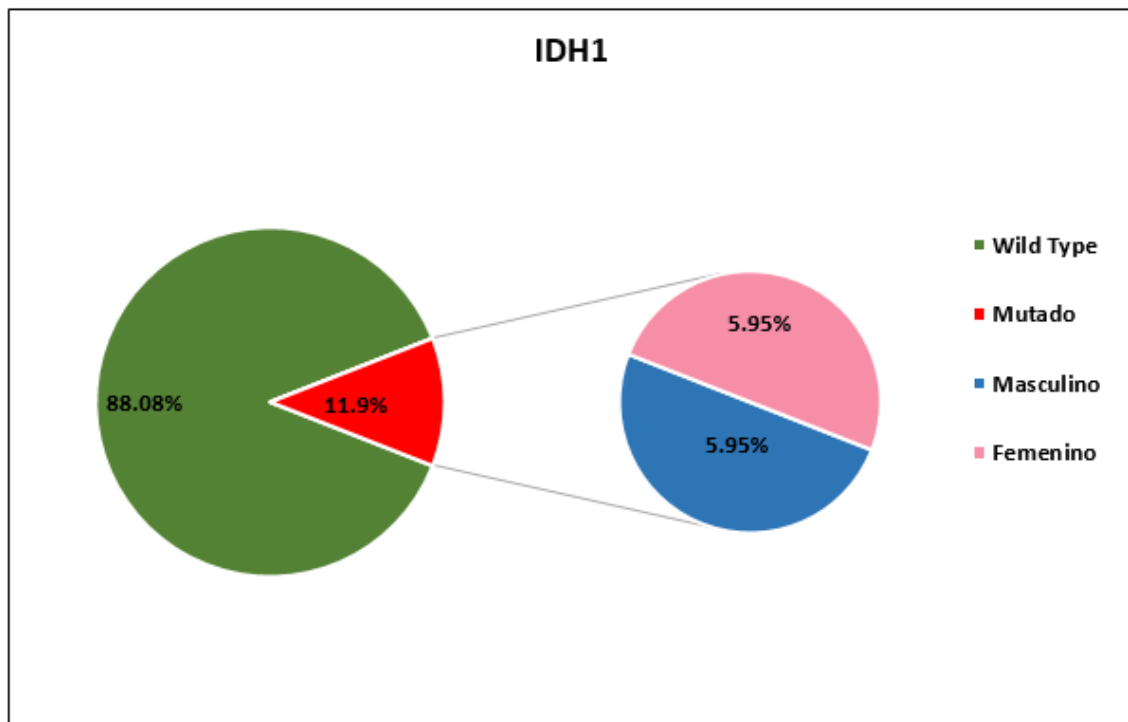
La figura que se muestra a continuación es el plot generado por el programa Coffalyser en el que se identifican las diferentes mutaciones.



**Figura 14.** Electroferograma generado por el programa Coffalyser MRC- Holland para la detección de las mutaciones de IDH1/2 en el se muestra al paciente LAM 10 se observa la presencia de mutaciones IDH 1 R132H (395 G>A) e R132C (394 C>T).

## 7.5 Frecuencia de las mutaciones en la población mexicana

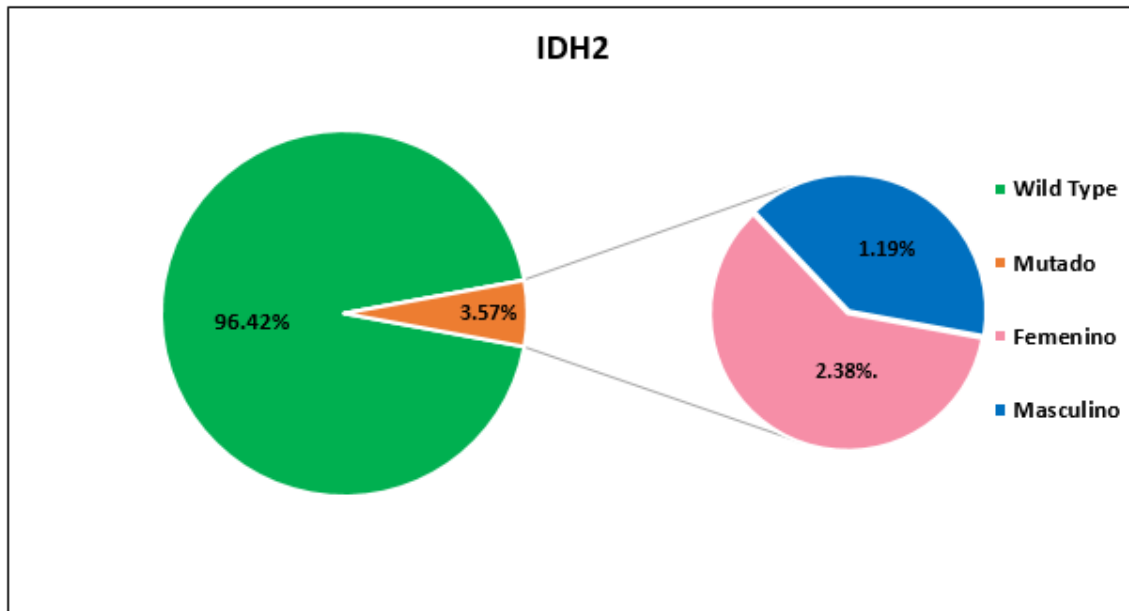
Se analizaron un total de 84 muestras de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda de los cuales presentaron mutaciones 13 pacientes, el gráfico 4 muestra la frecuencia por parte IDH1 son n=74 (88.08%) pacientes para wild type, el género femenino corresponde n=41 (48.80%) y masculino de n=33 (39.8%), en el caso de pacientes mutados fueron n=10 (11.9%) de los cuales el género femenino y masculino fue n=5 (5.95%) respectivamente.



**Gráfico 4.** Frecuencia por género de mutaciones IDH 1.



Para IDH2 la gráfica 5 muestra un total de n=81 (96.42%) pacientes para wild type de los cuales el género femenino fue de n=44 (52.38%) y masculino fue de n=37 (44.04%), en cuestión de las mutaciones el total fue de n=3 (3.57%) para género femenino fue de n=2 (2.38%) y para masculino fue de n=1 (1.19)



**Gráfico 5.** Frecuencia por género de mutaciones IDH 2.

De los 13 pacientes que presentaron la mutación los resultados dependiendo el tipo de mutación, género y variante de LMA son los siguientes:

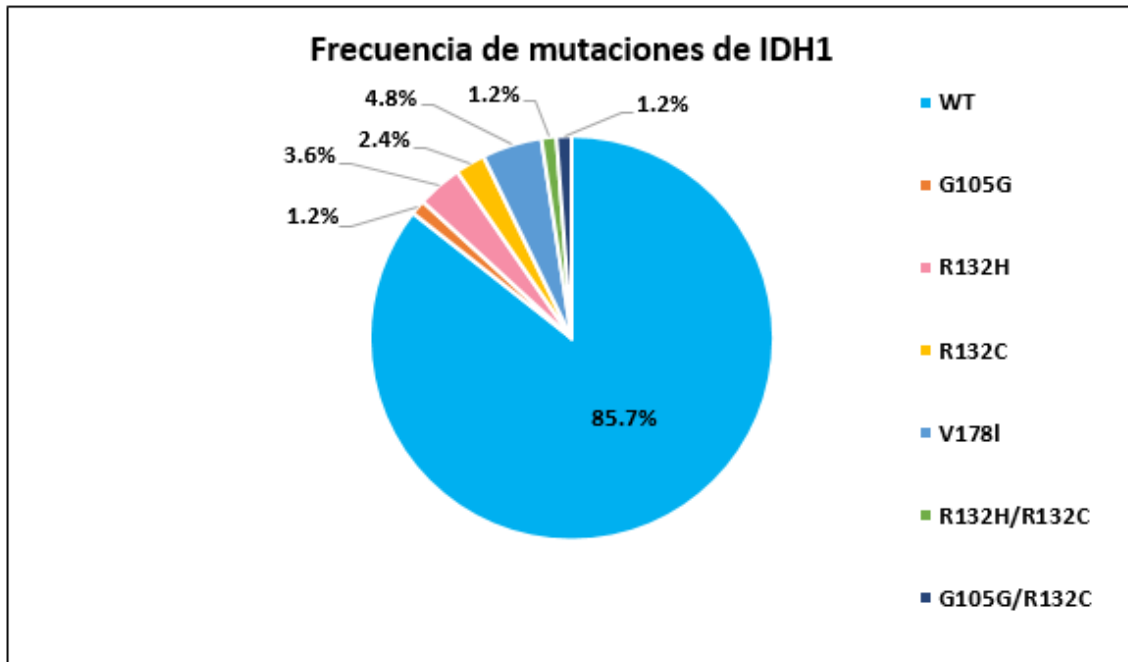
**Tabla9.** Pacientes que presentan los diferentes tipos de mutaciones de IDH1/IDH2 el género y variante de LMA.

Muestra	Mutación	Genero	Variante de LMA
LAM 03	IDH 1 V178I	Masculino	M4
LAM 09	IDH1 R132C IDH1 G105G	Femenino	M3
LAM 10	IDH1 R132C IDH1 R132H	Masculino	M4
LAM 20	IDH1 R132C	Femenino	M2
LAM 21	IDH 1 V178I IDH2 R172K	Masculino	M2
LAM 22	IDH 1 V178I	Femenino	M4
LAM 25	IDH 1 V178I	Femenino	M2
LAM 28	IDH1 R132H IDH2 R140Q	Femenino	M1
LAM 39	IDH1 R132H	Masculino	M2
LAM 49	IDH2 R172K	Femenino	M2
LAM 50	IDH1 G105G	Masculino	M4
LAM 54	IDH1 R132H	Femenino	M6
LAM 67	IDH1 R132C	Masculino	M5

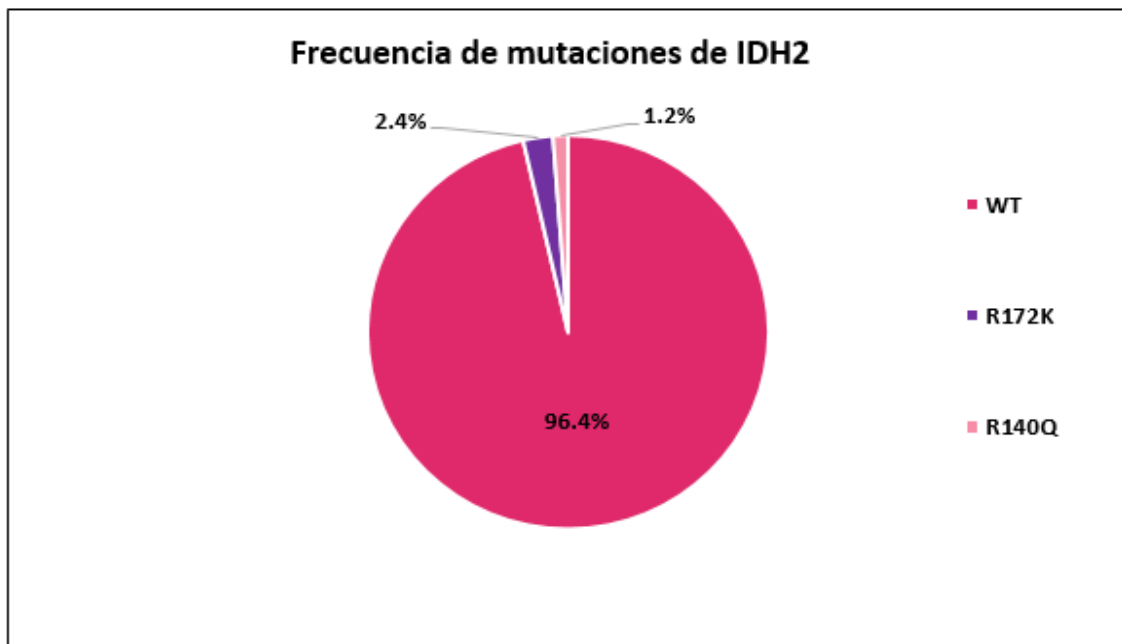
Pacientes que presentan los diferentes tipos de mutaciones de IDH1/2 el género y el tipo de variante de LMA. Abreviación LMA, Leucemia Mieloide Aguda; R, Arginina; H, Histidina; C, Cisteina; G, Glicina; V, Valina; I, Isoleucina; K, Lisina; M, Metionina; Q, Glutamina

Como se muestra en la tabla 9 hubo mayor frecuencia de mutaciones en pacientes del género femenino y el variante de LMA más frecuente fue la M2 seguido por M4, es importante mencionar que las mutaciones se presentaron en todos las variantes de LMA con excepción de M0

El objetivo principal de la investigación como ya se ha mencionado era identificar la frecuencia de las mutaciones de IDH1/IDH2 en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo* del Hospital General de México y en los siguientes gráficos se observan los resultados obtenidos:



**Gráfico 6.** Frecuencia de las mutaciones de IDH 1.



**Gráfico 7.** Frecuencia de las mutaciones de IDH 2.

En los gráficos 6 y 7 se muestran la frecuencia porcentual de las mutaciones de IDH1/IDH2, como se observa la presencia de las mutaciones de IDH 1 pueden estar solas o combinadas, la mutación mas frecuente sola fue V178I (4.8%), seguido por R132H (3.6%), R132C (2.4%), combinadas se obtuvo una frecuencia porcentual igual para R132H/R132C y G105G/R132C (1.2%). IDH2 se muestra una frecuencia porcentual para la mutación R172K (2.4%) y R140Q (1.2%).

Las características clínicas recabadas de los pacientes del gen isocitrato deshidrogenasa mutado (IDH 1), se muestran en la tabla 10, de los cuales se observó que pacientes femeninos y masculinos presentaron la mutación por igual que fue de n=5 (5.95%), en sus diferentes variedades morfológicas se encontró la presencia de la mutación en las variantes M1,M2,M3, M4,M5,M6, M7 con excepción de la M0, se debe destacar que se observó una mayor frecuencia en la variedad M2, de los pacientes que recibieron el esquema 3+7, n=9 (10.71%) presentaron la mutación, para el esquema mini 3+7, n=1 (1.19%), la respuesta de los pacientes fue la siguiente para respuesta completa y muerte en aplasia se presentó n=4 (4.76%) respectivamente, en remisión parcial y enfermedad refractaria fue de n=1 (1.19%), el pronóstico de los pacientes fue favorable n=4 (4.76%) y intermedio para n=6(7.14%).

Al analizar a los 10 pacientes wild type vs mutados con IDH1 y su relación con los parámetros clínicos los resultados son los siguientes en edad se observó (42.22 vs 45.85 edad media; p=0.642), leucocitos (117.71 vs 28.64 x 10<sup>3</sup>  $\mu$ L; p= 0.634), hemoglobina (9.63 vs 7.87 g/dL; p= 0.733), plaquetas (40 vs 46 x 10<sup>3</sup>  $\mu$ L; p=0.165), LDH (627 vs 358 UI/L; p=0.422).

**Tabla 10.** Características de pacientes con LMA con IDH1 wild type y mutado

Variable	No. Casos	IDH 1 <sup>WT</sup>	IDH1 <sup>MUT</sup>	p *
<b>No. De casos Totales</b>	84	74	10	
<b>No. Masculino/Femenino</b>	36/48	33/41	5/5	
<b>Edad, años</b>				
Media (rango)	42.7 (15-86)	42.22 (15-82)	45.85 (17-86)	0.642
<b>Hemoglobina, g/dL</b>				
Media (rango)	7.97(3.82-13.5)	9.63 (3.82-13.5)	7.87 (4.1-12.8)	0.733
<b>Leucocitos, x10<sup>3</sup>/uL</b>				
Media (rango)	106.76(0.2-344.3)	117.71 (0.2-344.3)	28.64 (1.35-156.8)	0.634
<b>Plaquetas, x10<sup>3</sup>/uL</b>				
Media (rango)	42.45 (3-228)	40 (3-198)	46 (5-228)	0.165
<b>LDH, U/L</b>				
Media (rango)	639.87 (89-3921)	627 (110-3921)	358 (89-766)	0.422
<b>Diagnóstico</b>	n	n (%)	n (%)	
MO	0	0 (0)	0 (0)	
M1	2	1 (1.19)	1 (1.19)	
M2	18	14 (16.66)	4 (4.76)	
M3	11	10 (11.90)	1 (1.19)	
M4	47	45 (53.57)	2 (2.38)	
M5	2	1 (1.19)	1 (1.19)	
M6	3	2 (2.38)	1 (1.19)	
M7	1	1 (1.19)	0 (0)	
<b>Esquema</b>				
3+7	75	66 (78.57)	9 (10.71)	
ARA C SC	6	6 (7.14)	0 (0)	
Mini 3+7	2	1 (1.19)	1 (1.19)	
2+7	1	1 (1.19)	0 (0)	
<b>Respuesta</b>				
Respuesta Completa	36	32 (38.09)	4 (4.76)	
Remisión Parcial	12	11 (13.09)	1 (1.19)	
Enfermedad Refractaria	9	8 (9.52)	1 (1.19)	
Muerte en Aplasia	24	20 (23.80)	4 (4.76)	
Muerte Causa Indeterminada	3	3 (3.57)	0 (0)	
<b>Pronóstico</b>				
Favorable				
Intermedio	47	43 (51.1)	4 (4.76)	
Adverso	29	23 (27.38)	6 (7.14)	
	8	8 (9.52)	0 (0)	

Indica correlación estadísticamente significativa p<0.05

Las características clínicas del gen isocitrato deshidrogenasa (IDH 2), se muestran en la tabla 11, se puede observar que existe mayor frecuencia de la mutación IDH2 en pacientes femeninos esta corresponde a n=2 (2.38%) y en masculino del n=1 (1.19%), las variedades morfológicas en las cuales se encontró presenta las mutaciones fue M1 y M2, siendo más frecuente la última con n=2 (2.38%), el esquema que se les administro a los pacientes fue el siguiente 3+7 fue de n=2(2.38%)y mini 3+7 a n=1(1.19%), su respuesta fue completa, refractaria y en aplasia de n=1 (1.19%) respectivamente, el pronóstico de los pacientes fue intermedio n=2 (2.38%) y favorable de n=1 (1.19%).

Al analizar a los 3 pacientes wild type vs mutados con IDH2 y su relación con los parámetros clínicos los resultados son los siguientes en edad se observó (42.22 vs 45.85 edad media; p=0.271), leucocitos (110.65 vs 11.23 x 10<sup>3</sup> µL; p= 0.426), hemoglobina (9.47 vs 7.97 g/dL; p= 0.993), plaquetas (40 vs 59 x 10<sup>3</sup> µL; p=0.527), LDH (611 vs 184 UI/L; p=0.292).

**Tabla 11.** Características de pacientes con LMA con IDH2 wild type y mutado

Variable	No. Casos	IDH 2 <sup>WT</sup>	IDH 2 <sup>MUT</sup>	p *
<b>No. De casos Totales</b>	84	81	3	
<b>No. Masculino/Femenino</b>	36/48	37/44	1/2	
<b>Edad, años</b>				
Media (rango)	42.7 (15-86)	42.22 (15-82)	45.85 (17-86)	0.271
<b>Hemoglobina, g/dL</b>				
Media (rango)	7.97(3.82-13.5)	9.47 (3.82-13.5)	7.97 (4.1-12.8)	0.993
<b>Leucocitos, x10<sup>3</sup>/uL</b>				
Media (rango)	106.76(0.2-344.3)	110.65(0.2-344.3)	11.23 (1.35-156.8)	0.426
<b>Plaquetas, x10<sup>3</sup>/uL</b>				
Media (rango)	42.45 (3-228)	40 (3-198)	59 (5-228)	0.527
<b>LDH, UI/L</b>				
Media (rango)	639.87 (89-3921)	611 (89-3921)	184 (118-260)	0.292
<b>Diagnóstico</b>	n	n(%)	n(%)	
MO	0	0 (0)	0 (0)	
M1	2	1 (1.19)	1 (1.19)	
M2	18	16 (19.04)	(2.38)	
M3	11	11 (13.09)	0 (0)	
M4	47	47 (55.95)	0 (0)	
M5	2	1 (2.38)	0 (0)	
M6	3	2 (3.57)	0 (0)	
M7	1	1 (1.19)	0 (0)	
<b>Esquema</b>				
3+7	75	73 (86.90)	(2.38)	
ARA C SC	6	6 (7.14)	0 (0)	
Mini 3+7	2	1 (1.19)	1 (1.19)	
2+7	1	1 (1.19)	0 (0)	
<b>Respuesta</b>				
Respuesta Completa	36	35 (41.66)	1 (1.19)	
Remisión Parcial	12	12 (14.28)	0 (0)	
Enfermedad Refractaria	9	8 (9.52)	1 (1.19)	
Muerte en Aplasia	24	23 (27.38)	1 (1.19)	
Muerte Causa Indeterminada	3	(3.57)	0 (0)	
<b>Pronostico</b>				
Favorable	47	46 (54.76)	1 (1.19)	
Intermedio	29	27 (32.14)	(2.38)	
Adverso	8	8 (9.52)	0 (0)	

\*Indica correlación estadísticamente significativa p<0.05

## 8. DISCUSIÓN

La Leucemia Mieloide Aguda es una patología hematológica heterogénea, más común en adultos esto representa alrededor de un 80% y en niños del 15 a 20%, en la cual que se encuentran involucrados diferentes genes y mecanismos que ayudan a que la evolución de la enfermedad sea de progresión rápida y agresiva para el paciente que la presenta.

Como ya se había mencionado es difícil encontrar un blanco terapéutico que ayude a una remisión completa, en jóvenes de 15-34 años se ha demostrado que la supervivencia es aproximadamente de 5 años después del diagnóstico, sin embargo en medida que la edad aumenta el índice de remisión disminuye 70% en adultos jóvenes, 50% en adultos maduros y tan solo del 25% en adultos mayores, aunque eso pueda estar relacionado con la presencia de comorbilidades, Leyton (2018), de acuerdo con datos obtenidos del Globocan se reportó que en el 2012 existe una tasa de mortalidad de pacientes en México de 3.7 por cada 100,000 habitantes, por lo cual la búsqueda de fármacos que ayuden a los pacientes que presenten esta patología independientemente de la edad o variedad de LMA que presenten, nos vislumbrara un panorama más homogéneo, en el que la medicina personalizada ayudara a que la eficacia de los tratamientos sea mayor y la respuesta a remisión completa sea efectiva.

### **Características de la población.**

Se analizaron un total de 84 pacientes con base en los resultados obtenidos el comportamiento de la población con leucemia mieloide aguda *de novo* es el siguiente la media de edad fue de 42.7 años, los datos obtenidos al ser comparados con la literatura son parecidos en el artículo de Leyton (2018) se menciona que la edad de diagnóstico es de 43 años, en México existe cierta discrepancia sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad de la enfermedad aunque se han realizado diferentes investigaciones locales y regionales y de ellos es recabada esta información.

De acuerdo con el género se presentó una incidencia mayor como se observa en la tabla 9 de pacientes femeninos con un porcentaje de 57.14% y masculino del 42.85% y en la literatura podemos encontrar que es más común en hombres que mujeres, su relación es aproximadamente de 1.4 (M/F), según los datos mundiales de GLOBOCAN en el 2012.

Como ya se sabe las pancitopenias con algo común en pacientes con leucemia mieloide aguda *de novo* las cuales pueden ser provocadas por enfermedades autoinunes o deficiencias en vitaminas Leyton (2018), pero es importante complementar el diagnóstico



con un aspirado de medula ósea y realización de un frotis para morfología el cual evitara un resultado erróneo.

Los datos clínicos recabados mostraron una media para leucocitos de 106.76, hemoglobina 7.97 y plaquetas de 42.45 aunque no es una característica definida que la presencia de leucemia mieloide aguda esté relacionada con pancitopenias en su artículo Leyton (2018) menciona que existe un relación de la evolución de la enfermedad hematológica con el síndrome mielodisplásico o leucemia granulocítica crónica aunque no es en todos los casos de LMA, se podrían justificar los niveles altos de leucocitos, ya que la toma de muestra fue al inicio de la enfermedad.

De acuerdo a la clasificación por morfología de FAB, los subtipos más frecuentes fueron M4 con 55.94% (47 casos), seguido por M2 con 21.42% (18 casos), M3 con 13.09% (11 casos), M6 con 3.57% (3 casos), M5 y M1 con 2.38% (2 casos), M7 con 1.19% (1 caso), Martínez-Tovar y colaboradores (2014) en su artículo leucemias agudas “ características clínicas y patrón estacional”, mencionan que el subtipo de LMA M4 es el más frecuente en México es importante tomar en cuenta la variedad de casos que se encontraron y que por excepción el único subtipo que no está dentro de la base de datos para ser analizado fue la M0, cabe señalar que algunos investigadores mencionan una mayor incidencia de leucemia promielocítica aguda en pacientes de origen latinoamericano, aunque en el presente estudio no fue así.

La siguiente característica general que se estudió en los pacientes con LMA fue el cariotipo, los resultados fueron los siguientes un cariotipo normal (42,50%), hiperploidia (1,1.19%), no crecimiento (41,48.08%), Bird y colaboradores (2002) en su artículo mencionan una frecuencia de 48% en pacientes con CN-LMA, 52% con hiperploidia, los datos no son concluyentes ya que existe un gran porcentaje de no crecimiento.

Al analizar todos los datos de manera general se observa que la enfermedad es heterogénea y que no existe ningún patrón definido el cual nos ayude a categorizar grupos y definir si existe relación entre cada una de las variables de estudio, por ellos se propuso estudiar las mutaciones presentes en LMA.

La presencia de las mutaciones de IDH descritas actualmente abordan un panorama en el cual se ven involucrados diferentes mecanismos que alteran a la célula ocasionando un daño somático, en donde el sitio activo donde se encuentra la arginina se unirá con el isocitrato modificando su función específicamente en los codones R132 para IDH1 y R172, R140 para IDH2, lo que ocurre es una sustitución de aminoácidos, en el que se

reducirá la formación de  $\alpha$ -KG, NADPH y se producirá R-2-HG el cual inhibe competitivamente a múltiples desoxigenasas dependientes de  $\alpha$ -KG, incluidos los reguladores epigenéticos clave como las histonas desmetilasas y las proteínas TET2.

### **Mutaciones de IDH1/IDH2.**

En el presente trabajo se identificó a partir de los métodos de genotipificación y MLPA las mutaciones de IDH1/IDH2, con un total de 13 casos como se observa en la tabla 10, para IDH 1 fue un total de n=10 (11.9%) de los cuales el género femenino y masculino fue n=5 (5.95%) respectivamente, de IDH2 fue un total de n=3 (3.57%) para género femenino fue de n=2 (2.38%) y para masculino fue de n=1 (1.19), estudios previos de Sadudde y colaboradores (2012) mencionan a países como Taiwan, China, EUA, Alemania, Canadá, Francia e Inglaterra con frecuencia de las mutaciones de IDH1 que oscila entre (2-14%) y para IDH2 (1-19%), cabe destacar que los primeros estudios realizados fueron por Mardis y colaboradores (2009) en los cuales se identificaron las mutaciones de IDH 1 en donde se estimó una frecuencia total de 8.5%, y para IDH2 fue 10.4%, los porcentajes al ser comparadas con población mexicana del Hospital General de México de IDH 1/IDH2 muestra discrepancias dependiendo la población de estudio, esto podría deberse a características de inclusión y exclusión de pacientes, al igual que la sensibilidad de los ensayos para la detección de mutaciones.

En las diferentes variantes morfológicas de LMA se encontraron la presencia de las mutaciones de IDH 1 en M1- M7 con excepción de la M0, se debe destacar que se observó una mayor frecuencia en la variedad M2, IDH2 presenta solo mutación en las variantes M1 y M2 siendo más frecuente la última, Sadudde y colaboradores (2012) mencionan en su artículo de igual manera mayor frecuencia en la variante M2 para IDH1 /IDH2.

Como ya se ha mencionado existen diferentes mutaciones identificadas en donde el sitio activo donde se encuentra la arginina se modificará Sadudde y colaboradores (2012) mencionan cambios por histidina (R132H), cisteína (R132C), serina (R132S), glicina (R132G) los porcentajes oscilan entre el (4 -1.5%), por otra parte Keyur<sup>52</sup> y colaboradores muestran modificaciones en (G105G) y (R140Q) con frecuencias de (5%), Ward P y colaboradores (2012) mencionan que mutaciones como V178I se encuentran presente pero no tiene ninguna actividad neomorfica en pacientes con LMA.

La frecuencia porcentual de las mutaciones de los pacientes del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” en los diferentes cambios de aminoácidos fueron las siguientes para IDH 1 las mutaciones se identificaron solas o combinadas, la mutación más frecuente sola fue V178I (4.8%), seguido por R132H (3.6%), R132C (2.4%), combinadas se obtuvo una frecuencia porcentual igual para R132H/R132C y G105G/R132C (1.2%). IDH2 se muestra una frecuencia porcentual para la mutación R172K (2.4%) y R140Q (1.2%).

En diferentes investigaciones se mencionan que la presencia de las mutaciones es excluyente una de la otra, aunque en nuestro estudio 4 pacientes mostraron la presencia de dos mutaciones.

Las mutaciones de IDH1 las cuales son R132H, R132C, R132H,G105G y de IDH2 R172K y R140Q presentan una actividad neomorfica generando la producción del oncometabolito R-2 Hidroxiglutarato, con excepción de V178I, la cual esta presente pero no genera la producción del oncometabolito.

La frecuencia de las mutaciones en los diferentes lugares donde se han realizado los estudios se ve modificada dependiendo el tipo de población, predomina en personas con cariotipo normal, Saducce<sup>48</sup> y colaboradores mencionan que la mutaciones de IDH se presentan en variedades LMA-M4 con un 27%, el estudio que nosotros realizamos existió mayor frecuencia en LMA-M2 con un 38% seguido por LMA-M4 con 31%.

Al analizar a los 13 pacientes wild type vs mutados con IDH1/IDH2 y su relación con los parámetros clínicos en la tabla 10 y 11, se observó que no existe correlación clínica entre los resultados, aunque la mayoría de pacientes que presentaban mutación mostraban valores menores en edad, hemoglobina, leucocitos, lactato deshidrogenasa (LDH) y plaquetas ligeramente aumentadas Saducce y colaboradores (2012) muestran un resultado parecido en los parámetros clínicos aunque al igual que nosotros ninguna correlación con los parámetros clínicos.

El rol oncometabolico de IDH mutado por lo cambios estructurales genera una actividad enzimatica neomorfica, ocasionando la producción del producto R-2-HG que al acumularse, da como resultado hipermetilacion del DNA, inhibición de HIF-1 $\alpha$  Factor inducible a Hipoxia , alteraciones en el colágeno, daño oxidativo, lo que suscita un proceso de leumogénesis

Se debe de tomar en cuenta que las mutaciones presentes en los pacientes con LMA son de mal pronóstico, por lo tanto la importancia implementar medicamentos como por ejemplo AG-120, Enasidenib, Ivosidenib (Celgene), que ayudan a inhibir la función de la enzima IDH1/IDH2 mutada, bloqueando la generación del oncometabolito y la hipermetilacion del DNA, provocando la diferenciación celular.

## 9. CONCLUSIONES

- Se identificaron las mutaciones del gen Isocitrato Deshidrogenasa mediante las técnicas de Genotipificación y MLPA en Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda del Hospital General de México
- Se obtuvieron las frecuencias de las mutaciones del gen IDH 1/ IDH2 en pacientes con LMA, los resultados de las mutaciones demostraron mutación para el gen IDH1 de 11.9%, estas pueden actuar solas o combinadas, la mutación más frecuente fue V178I 4.8% , seguido por R132H 3.6%, R132C 2.4%, combinadas se obtuvo una frecuencia porcentual igual para R132H/R132C y G105G/R132C 1.2%.  
  
IDH2 la frecuencia fue de encontramos la presencia de la mutación en el aminoácido R172K con una frecuencia de 2.4% y la mutación R140Q con una frecuencia de 1.2%, es el primer trabajo que presenta las frecuencias en población mexicana, no existen datos descritos a la fecha.
- Se realizó la correlación de los datos clínicos con las mutaciones del gen IDH 1/IDH2 de los cuales no se encontró una asociación clínica significativa, pero se obtiene un patrón de comportamiento en los pacientes que lo presentan.

## 10. REFERENCIAS

- Ahmedin , J., Rebecca , S., & Jiaquan , X. (2010). Cancer Statistics Cancer 60;277-30. *Cancer J Clin*, 60;277-30.
- Arana-Trejo, R. (2014). FLT3 gene internal tandem duplication (ITD) mutations in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 6(1), 6(1).
- Avarello . (1992). Evidence for an ancestral alphoid domain on the long arm of human chromosome 2 Human Genetics. *Human Genetics*, 89: 247-9.
- Beveridge, R.,et al. (2003). Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos . *An Med Interna*, 20: 257-268.
- Bittel , D., & Butler , M. (2005). Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology *Expert. Mol Med*, 7 (14): 1-20.
- Blasco, F. (2010). *Bioquímica. Conceptos esenciales*. Médica Panamericana.
- Buga, V., Gluck, A., & Arion, C.(2014). Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children15:291-5. *J Med Life*, 2(15):291-5.
- Buitrón-Santiago , N., Arteaga-Ortiz , L., Rosas-López , A., Aguayo , A., López-Karpovitch , X., & Crespo-Solís, E. ( 2008.). Acute myeloid leukemia in adults: experience at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Invest*, 62(2):100-108.
- Byrd, J., Mrózek, K., Dodge, R.,et al.(2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*, 100:4325-36.
- Candelaria , M., Luna-Ochoa , E., Labardino-Méndez , J., Herrera-Aguilar , A., Gutiérrez-Hernández , O., & Serrano Olvera , A. (2009). Virus y neoplasmas hematológicos. *Cancerología*, (4):217-225.
- Cassileth, P., Harrington, D., & Appelbaum FR,et al. (1998). Chemotherapy compared with autologous or allogenic bone marrow transplantation in the management Of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* , 339:1649-56.
- Chen, S.-J., Shen , Y., & Chen , Z. (2013). A panoramic view of acute myeloid leukemia45:586-7. *Nat Genet*, 8(45):586-7.
- Chesnelong , C., Chaumeil, M., Blough , M., Al-Najjar , M., & Stechishin , O. (2014). Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro-Oncology*, 16: 686–95.
- Civin , C., & Gore , S. (1993). Antigenic analysis of hematopoiesis. a review. *J Hematother*, 2:137-144.
- Crespo-Solís , E. (2010). Epidemiología de las leucemias agudas. 11(Supl 1):37-39. *Hematología*, 11(Supl 1):37-39.
- Dang, L., White, D., & Gross, S. e. (2009). Cancer-associated IDH Mutations Produce 2 Hydroxyglutarate. *Nature* , 462 (7274):739– 744.

- Delhommeau, F., Dupont, S., Del Valle, V., James, C., & al, e. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers 360:2289–301. *N Engl J Med*, 360:2289–301.
- Doherty, H., Estey, E., et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4):424-447.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., & Parkin, D. (2000). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. *Globocan*.
- Fortoul, T. (2013). *Histopatología y Biología Celular*. Guadalajara: Mc Graw- Hill.
- Geisbrecht, B., & Gould, S. (1999). The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 274(43): 30527-30533.
- Gómez-Guijosa, M., Gutiérrez-Aguirre, C., & Cantú-Rodríguez, O. (2009). Leucemia promielocítica aguda. Resultados del tratamiento en el Hospital Universitario de la UANL. *Medicina Universitaria*, 11(44):165-169.
- Grove, C. (2014). Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer 7:941-51. *Dis Model Mech*, 21 (7):941-51.
- Gutiérrez, M. (2014). *Síndromes Hematológicos y su relación con las enfermedades que produce*. Cd Mexico: Prado.
- Harmut, D., & Elihu, E. e. (2017). Diagnosis and management of AML in adults:ELN recommendations from and international expert panel. *Blood*, 29(4);424-447.
- Hoffman, R., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., & Silberstein, L. (2000). *Stem cell model of hematopoiesis*. Philadelphia, EE.UU: Hematology: Basic principles and practice.
- Huang, M., Ye, Y., Chen, S., Chai, J., Lu, J., et al. (1988). Use all- trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 65(70)2:567-72.
- Ivanova, N., Dimos, J., Schaniel, C., Hackney, J., & Moore, K. (2002). A stem cell molecular signature. *Science*, 298(5593):601-4.
- Kelly, L., & Gilliland, D. (2002). L.M. Kelly, D.G. Gilliland Genetics of myeloid leukemia. *Genomics Hum Genet*, 1(3):198-179.
- Keyur, P., Bedia, A., & et.al. (2011). Diagnostic Testing for IDH1 and IDH2 Variants in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 13:368-385.
- Laguna-Rangel, F. (2016). Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Elsevier*, 15(3):150-157.
- Leyto-Cruz, F. (2018). Leucemia Mieloide Aguda. *Hematología*, (1):24-40.
- Lichtman, M., & Liesveld, J. (2005). *Leucemia mielógena aguda*. Madrid: Marbán.
- Lo Coco, F., Diverio, D., Falini, B., Biondi, A., & Nervi, C. (1999). Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 94:12-22.
- Loenarz, C., & Schofield, C. (2011). Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends in biochemical sciences*, 36 :7-18.


- Lowenberg, B., Ossenkoppele, G., Van Putten, W., & al, e. (2010). High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 362(12):1235-1248.
- Mardis, E., Ding, L., Dooling, D., Larson, D., & al, e. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*, 361:1058-1066.
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., & al, e. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología*, (2):95-107.
- Merino, A. (2010). Clasificación de las Leucemias Agudas Mieloides. *Elsevier*, 3 (3):136-147.
- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., & al, e. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 20 :11–24.
- Mrózek, K., Marcucci, G., & al, e. (2012). Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 30(36):4515-4523.
- Nekrutenko, A., Hillis, D., Patton, J., & Bradley, R. (1999). Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Mol Biol Evol*, 15(12): 1674- 1684.
- Nichol, J., Assouline, S., & Miller, W. (2013). The etiology of acute leukemia. *Neoplastic Diseases of the Blood*, pp. 177.
- Othus, M., Kantarjian, H., & Petersdofs, S. e. (2014). Declining rates of the treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimen. *Leukemia*, 28 (2):289-292.
- Owen, C., Yen, K., & al, e. (2016). Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *American Association for Cancer Research*, 22(8): 1837–1842.
- Pérez, G. (2012). Ciclo de Krebs. Recuperado de <https://www.ciclodekrebs.com>.
- Persons, D., Jones, S., Zhang, X., Cheng-Ho, L. J., Leary, R., & al, e. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, (321):1807-1812. .
- Renneville, A., Roumier, C., & Biggio, V. e. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia. *A review of the literatura Leukemia*, 915-931.
- Rosenbauer, F., & Tenen, D. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, 7: 105-17.
- Ruiz, G. (2009). *Fundamentos de Hematología*. Medica Panamericana.
- Ruiz-Argüelles, G. (1997). Promyelocytic Leukemia in Mexican Mestizos. *Blood*, 89 (1):348-348.
- Ruiz-Argüelles, G., Garcés-Eisele, J., Alarcón-Urdaneta, C., Lutz-Presno, J., & Ruiz-Delgado, G. (Abril, 2012). Primary FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) mutations in Mexican mestizo patients with de novo acute myelogenous leukemia. *Cartel en XXXIV World Congress -ISH / LIII Congreso Nacional - AMEH*.



- Saddudde, C., Thongnoppakhun, W., et al. (2012). Molecular Alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH 1 and IDH 2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *Journal of Hematology and oncology*, (5):5.
- Santoyo, A., et al. (2014). Leucemia Agudas. *Med Inst Mex Seguro Soc*, 52(2):176-81.
- Sasaki, M., Knobbe, C., Itsumi, M., Elia, A., & Harris, I. (2012). D-2hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Gen Devel*, 26:2038-49.
- Takahashi, S. (2011). Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol*, 1(4):36.
- Tenen, D. (2003). Disruption of differentiation in human cancer AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3(2):89-201, 3(2):89-201.
- Tirado-Gómez, L., & Mohar-Betancourt, A. (2007). Epidemiología de las neoplasias hematológicas. *Cancerología*, (2):109-120.
- Ward, P., Cross, J., et al (2012). Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R (-) hydroxyglutarate producción. *Oncogen.*, 31(19): 2491-2498.
- Wognum, A., Eaves, A., & Thomas, T. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, 34: 461-47.
- Yan, H., Parsons, D., & Jin, G. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 60(8):765-7373.
- Yasutake, Y., Watanabe, S., Yao, M., Takada, Y., Fukunaga, N., & Tanaka, I. (2003). Crystal Structure of the Monomeric Isocitrate Dehydrogenase in the Presence of NADP+. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38): 36897-36904.
- Zhang, C., Moore, L., Li, X., et al. (2013). IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncology*, 15(9):1114-1126.

# 11. ANEXOS

## 11.1 Protocolo general de MLPA



www.mlpa.com

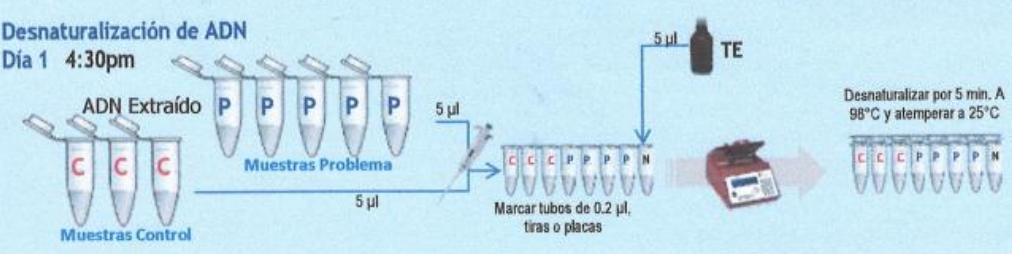
# MLPA<sup>®</sup>

(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

PROTOCOLO GENERAL EN UN TUBO

### Desnaturalización de ADN

**Día 1 4:30pm**



ADN Extraído Muestras Control Muestras Problema

5 µl 5 µl


5 µl TE

Desnaturalizar por 5 min. A 98°C y atemperar a 25°C

Marcar tubos de 0.2 µl, tiras o placas

### Hibridación

**Día 1**



Mezclaren en el vortex el buffer de MLPA y la sonda antes de utilizarlas

Buffer MLPA Mastermix

1.5 µl 1.5 µl

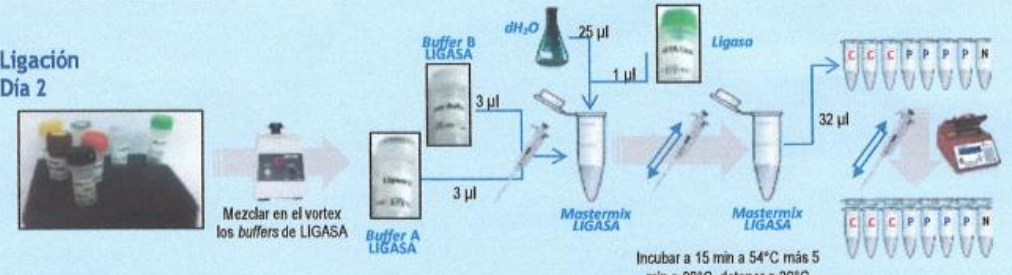
Mastermix

3 µl

Incubar 1 min a 95°C más 16-20 hrs. a 60°C, Detener a 54°C

### Ligación

**Día 2**



Mezclar en el vortex los buffers de LIGASA

Buffer A LIGASA Buffer B LIGASA

3 µl 3 µl

dH<sub>2</sub>O 25 µl Ligasa 1 µl


Mastermix LIGASA

32 µl

Incubar a 15 min a 54°C más 5 min a 98°C, detener a 20°C

### Reacción de PCR **NUEVO PROTOCOLO**

**Día 2**



Mezclar en el vortex el mastermix de PCR. Atemperar en la mano.

Polimerasa


0.5 µl 7.5 µl dH<sub>2</sub>O

Mastermix Polimerasa

10 µl

Continuar Termociclado

Retirar del termociclador y conservar a 4°C por una semana, para periodos más largos, congelar a -20°C en oscuridad



**Diagnóstico Innovación y Asesoría S.A. de C.V.**  
 La Quemada 226. Col Narvarte CP 03020, México D.F.  
 Tels: 01 55 5534 6824, 01 55 5534 71 12, 01 55 5534 7157, Fax: 01 55 5534 7398  
 E-mail: diasadecov@prodigy.net.mx

**E. Capilar**

### Observaciones

- ✓ Incluir siempre muestras de referencia, Muestras con un número de copias "normal" en la secuencia objetivo (personas normales)
- ✓ El procedimiento deberá de ser el mismo tanto para las muestras problema como para las muestras de referencia
- ✓ Se requieren múltiples muestras de referencia para cada corrimiento de MLPA para estimar la reproducibilidad de cada sonda de MLPA. Al menos 3 son necesarias por corrida y una mas por cada 7 muestras, se recomienda colocarlas al azar.
- ✓ Se recomienda incluir muestras positivas de preferencia procesadas igual que las demás muestras
- ✓ Se recomienda incluir control SIN ADN, MLPA sin muestra, solo agua o TE (Los fragmentos Q-control no requieren ligación para amplificar)
- ✓ ADN Comercial (Promega® Cat. Nr G1471 male & G1521 female DNA.)

### Preparación de la muestra

- ✓ 50-250 ng de ADN humano en 5ul, si es necesario concentrar con etanol.
- ✓ Diluir en TE a pH 8 a 8.5 (10 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA).
- ✓ NO REQUIERE un método de extracción de ADN especial.
- ✓ No debe haber alta concentración de sal. No utilizar los equipos Qiagen® EZ1, M6, M48 y M96
- ✓ Métodos probados:
  - Qiagen® Autopure LS (automático) y QIAamp DNA mini/midi/maxi kit (manuales)
  - Promega® DNA extraction Wizard (manual)
  - Sin sal (manual)
- ✓ MLPA® más sensible a contaminantes que la PCR normal como Guanidinio (Sal), Fenol, Etanol, Heparina, EDTA, Fe.
- ✓ Para Minimizar el efecto de los contaminantes solo compare muestras: Derivadas del mismo tipo de tejido, misma conservación y con el mismo método de extracción y concentración.

Conservar alicuotas de todas las muestras a 20°C en TE

### Recomendaciones

- ✓ Toda la reacción de MLPA® (Desnaturalización de ADN, Hibridación, Ligación y Amplificación) se realizan en un termociclador con tapa de temperatura controlada.
- ✓ Mezclar siempre en el vortex los buffers descongelados así como las sondas antes de utilizarlas
- ✓ Darle un spin siempre antes de usar los tubos de reactivo de MLPA®
- ✓ Nunca mezcle en el vortex soluciones que contengan enzimas, cuando se prepare el *mastermix* la enzima siempre deberá agregarse al final y el mezclado será realizado cuidadosamente utilizando la micropipeta
- ✓ Preparar entre 5-10% extra de *mastermix* para todas las reacciones para minimizar variación muestra a muestra
- ✓ Utilice pipetas multicanal cuando prepare muchas muestras

PROGRAMA TERMOCICLADOR	
1) Desnaturalización de ADN	
1. 98 °C	5 minutos
2. 25 °C	pausa
2) Reacción de Hibridación	
3. 95 °C	1 minute
4. 60 °C	pausa
3) Reacción de Ligación	
5. 54 °C	pausa
6. 54 °C	15 minutos
7. 98 °C	5 minutos
8. 20 °C	pausa
4) Reacción de PCR	
9. 35 ciclos:	
▪ 95 °C	30 segundos
▪ 60 °C	30 segundos
▪ 72 °C	60 segundos
10. 72 °C	20 minutos
11. 15 °C	pausa

CONFIGURACION	Beckman® <sup>1</sup>	ABI-3000 <sup>2</sup>	ABI-Prism 310
MLPA PCR Primer dye	Cy5	FAM	FAM
Capilares	33 cm	30 o 50 cm.	47 cm.
Mezcla de Inyección			
PCR reacción	0.7 µl	0.7 µl	0.75 ul + 0.75 ul dH <sub>2</sub> O
Size standard	0.2 µl Beck.D1-lab.600	0.2 µl LIZ o 0.3 µl TOX	0.5 ul
Formamida	32 µl	9 µl	13.5 ul
Aceite mineral	Una gota		
Ajustes iniciales		Capilares de 36 cm:	Filter set D
T° Capilar	50°C		
Desnaturalización	90°C por 120 seg.	80°C por 2 min y 4"	80°C por 2 min y 4"
Volt. Inyección	1.6 kV	1.6 kV	1.6 kV
T° Inyección	30 seg.	15 seg.	15 seg.
T° ejecución	60 min. a 4.8 kV.	1,800 seg.	
Voltaje de la corrida		15 kV.	
Polímero		POP4	POP4

1) CEQ-2000; CEQ-8000; CEQ-8800

2) ABI-Prism 3100, ABI-Prism 3100 Avant, ABI-3130, ABI-3130XL, ABI-3500, ABI-3730, ABI-3730XL



Diagnóstico Innovación y Asesoría S.A. de C.V.

La Quemada 226. Col Narvaite CP 03020, México D.F.

Tel: 01 55 5534 6824, 01 55 5534 71 12, 01 55 5534 7157, Fax: 01 55 5534 7398

E-mail: diasadecv@prodigy.net.mx



## La Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, AC.

Tiene el honor de entregar la presente

### CONSTANCIA

a:

Brenda Angélica Arratia Gutiérrez<sup>1</sup>, Irma Olarte Carrillo<sup>1</sup>, Anel Irais García Laguna<sup>1</sup>, Christian Omar Ramos Peñafiel<sup>1</sup>, Johanna Elizabeth Paredes Sánchez<sup>2</sup>, Horacio Del Olmo Téllez<sup>3</sup>, Gabriela Hernández Rivera<sup>3</sup>, Juan Collazo Jaloma<sup>4</sup>, Etta Rozen Fuller<sup>4</sup>, Juan Julio Kassack Ipiña<sup>2</sup>, Adolfo Martínez Tovar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hematología U204. Hospital General de México; <sup>2</sup> Unidad de Hospitalización. Servicio de Hematología. Hospital General de México. <sup>3</sup> Celgene México, S. de R.L. de C.V.; <sup>4</sup> Laboratorio de Hematología Especial. Servicio de Hematología. Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

### "Análisis de la frecuencia de los genes IDH1/IDH2 en pacientes con LMA"

Presentado en el "LIX" Congreso Anual de la Agrupación, evento realizado del 25 al 29 de abril de 2018, en Nuevo Vallarta, México

Atentamente,

**Dra. Adolfin Bergés García**  
Presidenta

**Dr. Carlos Martínez Murillo**  
Vocal de Acts. Académicas

Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología AC.

San Francisco No. 1125 Dept. 406 - Cal. Del Valle, Del. Benito Juárez, C.P. 07100 Ciudad de México.

Tel. + 52 (55) 5724 1112 • + 52 (55) 5724 1006

www.ameha.org • contact@ameha.org



## La Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, AC.

Tiene el honor de entregar la presente

### CONSTANCIA

a:

Irma Olarte Carrillo<sup>1</sup>, Brenda Angélica Arratia Gutiérrez<sup>1</sup>, Anel Irais García Laguna<sup>1</sup>, Christian Omar Ramos Peñafiel<sup>1</sup>, Johanna Elizabeth Paredes Sánchez<sup>1</sup>, Horacio Del Olmo Téllez<sup>2</sup>, Gabriela Hernández Rivera<sup>2</sup>, Juan Collazo Jaloma<sup>1</sup>, Etta Rozen Fuller<sup>1</sup>, Juan Julio Kassack Ipiña<sup>1</sup>, Adolfo Martínez Tovar<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación. Servicio de Hematología U204, Hospital General de México; <sup>2</sup> Celgene S. de R.L. de C.V.

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

**"Respuesta al tratamiento de quimioterapia (7+3) en pacientes con mutaciones en los genes IDH1/IDH2 en pacientes con LMA"**

Presentado en el "LIX" Congreso Anual de la Agrupación, evento realizado del 25 al 29 de abril de 2018, en Nuevo Vallarta, México

Atentamente,

**Dra. Adolfin Bergés García**  
Presidenta

**Dr. Carlos Martínez Murillo**  
Vocal de Acts. Académicas

#### Mesa Directiva

Dr. Luis Sánchez Alzola  
**Fundador**

Dra. Adolfin Bergés García  
**Presidenta**

Dr. Oscar Hernández Zamudio  
**Vicepresidente**

Dra. M. Antonieta Velaz Ruelas  
**Secretaria**

Dra. M. Patricia Dieguez Martínez  
**Tesorera**

Dr. Carlos Martínez Murillo  
**Vocal de Acts. Académicas**

Dra. M. Lilia de la Rosa Cano  
**Vocal de Membresía**

Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología AC.

San Francisco No. 1625 Dept. 406, Col. Del Valle, D.F. Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México.  
Tel. + 52 (00) 5524.1412 • + 52 (00) 5534.1054  
www.ameh.mx • contact@ameh.mx