



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE VARIANTES EN LOS GENES *IDH1* E *IDH2* EN PACIENTES
PARAGUAYOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA**

MARÍA PAZ MUJICA ARRÚA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Septiembre, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE VARIANTES EN LOS GENES *IDH1* E *IDH2* EN PACIENTES
PARAGUAYOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA**

MARÍA PAZ MUJICA ARRÚA

Tutor: PROF. DRA ANA ILDA AYALA LUGO, PhD, MSc.
Co-tutor: LIC. VALERIE JOLLY, MSc.

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Septiembre, 2021

Mujica Arrúa, María Paz

Estudio de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda/ María Paz Mujica Arrúa; Tutor: Ana Ilda Ayala Lugo; Co-Tutor: Lic. Valerie Jolly.- San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas; 2021.

xx, 81; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- UNA, IICS, FCQ; 2021

1. Leucemia mieloide aguda 2. Genes 3. Isocitrato deshidrogenasa 4. Mutación 5. Secuenciación por Sanger

CDD (ed. 18^a) 616.155
M298e

“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **PROF. DRA. ANA ILDA AYALA LUGO**, DOCENTE INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante María Paz Mujica Arrúa para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 29 días del mes de septiembre de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD, MSc.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA LIC. VALERIE JOLLY, DOCENTE INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante María Paz Mujica Arrúa para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 29 días del mes de septiembre de 2021.

Co-Tutora: Lic. Valerie Jolly, MSc.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Estudio de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante María Paz Mujica Arrúa para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. DRA. ANA ILDA AYALA LUGO**, considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 30 días del mes de septiembre de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.

Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO DE VARIANTES EN LOS GENES *IDH1* E *IDH2* EN PACIENTES
PARAGUAYOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

María Paz Mujica Arrúa

Aprobado el 15 de octubre de 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dra. Rosa Guillén Fretes, PhD., Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

BC. Anibal Espínola, MSc., Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

BC. Natalia Navarro, MSc., Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Lic. Gonzalo Manrique, MSc, Asociación Española Primera de Socorros Mutuos,
Montevideo, Uruguay

Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD, MSc.
Tutor

Prof. Dra. María Fátima Yubero de Servián
Directora de Postgrado FCQ



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIRECCIÓN DE POSTGRADO

ACTA DE EVALUACIÓN

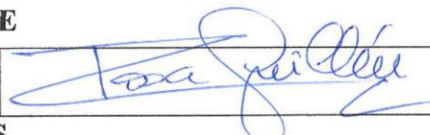
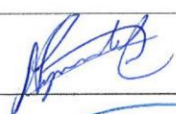
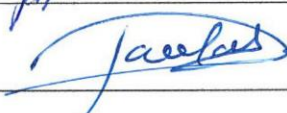
EVALUACIÓN DE	DEFENSA PÚBLICA DE TESIS
NÚMERO DE CREDITOS	S/N
PROGRAMA	Maestría en Ciencias Biomédicas

TÍTULO DE PROYECTO DE TESIS	Estudio de variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda.
------------------------------------	---

DICTAMEN:

APELLIDO Y NOMBRE	CALIFICACIÓN	
	NÚMERO	LETRAS
MUJICA ARRÚA, MARÍA PAZ	4	Cuatro

ACTA: MCB-097	FECHA: 15 de octubre del 2021
----------------------	--------------------------------------

PRESIDENTE	
Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes, PhD	
MIEMBROS	
Prof. B. C. Aníbal Francisco Espínola Cano, MSc.	
Prof. B. C. Nathalia Paola Navarro Trevisan, MSc.	

OBSERVACIÓN:

1. Participa de esta mesa examinadora el Lic. Gonzalo Raúl Manrique Arechavaleta, MSc, como evaluador internacional invitado, de manera remota desde el Laboratorio de Biología Molecular / Asociación Española Primera de Socorros Mutuos / Empresa Privada / Uruguay.

DEDICATORIA

A mis padres Aida y Ramón, pilares y motores de mi vida.

A mis hermanos José y Jaky

A mis sobrinos Marlon, Santino, Giovanni y Piero.

A toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, gracias por cada batalla vencida.

A mis padres Aida y Ramón, gracias por tanto amor, apoyo y confianza puesta en mí. Gracias por contenerme, sostenerme y nunca soltarme; las palabras no alcanzan para expresar lo eternamente agradecida que me siento. Ustedes saben lo que costó llegar, y sólo puedo decir que lo hice gracias a ustedes papá y mamá. Los amo incondicionalmente.

A mi hermano José y a Jaky, gracias por cada palabra de ánimo en los momentos difíciles y por cada celebración en cada logro; y a mis sobrinos quienes con su inocencia me ayudaron a continuar con cada batalla, gracias por llenar mi vida de luz.

A toda mi familia, que siempre están pendientes de mí y festejan conmigo cada logro.

A mis amigas y amigos, a cada uno gracias por su eterno apoyo y su cariño, son más que importantes en mi vida.

A cada profesor/a que me ayudó en las diferentes etapas de la maestría, que con paciencia y cariño me fueron guiando por el camino.

A la Dra. Ana Ayala, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por orientarme y permitirme culminar la maestría. A Lic. Valerie Jolly por la guía brindada. A Lady y Natalia por las enseñanzas con tanta paciencia y cariño en todo el camino de la maestría.

A todos los que componen la Maestría en Ciencias Biomédicas del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y la Facultad de Ciencias Químicas, gracias por la oportunidad brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de la maestría y el apoyo brindado.

Finalmente, a todos los que siempre estuvieron ahí, gracias por tanto amor: fue lo que me ayudó a continuar y hoy lograr una meta más.

ESTUDIO DE VARIANTES EN LOS GENES *IDH1* E *IDH2* EN PACIENTES PARAGUAYOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

María Paz Mujica Arrúa*, Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo**, Lic. Valerie Jolly**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda es una neoplasia fenotípica y genéticamente heterogénea, que se caracteriza por la presencia de diferentes anomalías genéticas y mutaciones que están implicadas en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes. Las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* han sido descritas entre las cinco mutaciones más recurrentes en pacientes con LMA. En este trabajo se estudiaron 50 pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA, para la detección de las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* e *IDH2R172* por las técnicas secuenciación por Sanger y *High Resolution Melting* (HRM), obteniendo un 30% de aparición de las variantes en la población de estudio, que corresponden al 4% para el *IDH1G105*, 10% para el *IDH1R132* y 18% para el *IDH2R140*. La variante *IDH2R172* no fue detectada en la población estudiada. También se describió la co-ocurrencia entre *NPM1* e *IDH1/2*, con un porcentaje del 28%, 12% entre las mutaciones *FLT3-ITD* e *IDH1/2* y 2% entre el re-arreglo de fusión *RUNX1-RUNX1T1* y una mutación en *IDH2*. Los datos de este trabajo presentan relevancia en el ámbito clínico, de diagnóstico y tratamiento en la leucemia mieloide aguda, además de ser el primer estudio de las variantes *IDH1/2* realizado en el Paraguay.

Palabras claves: Leucemia mieloide aguda, genes, isocitrato deshidrogenasa, mutación, secuenciación por Sanger

STUDY OF VARIANTS IN THE *IDH1* AND *IDH2* GENES IN PARAGUAYAN PATIENTS WITH CLINICAL DIAGNOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

María Paz Mujica Arrúa*, Dra. Ana Ilda Ayala Lugo**, Lic. Valerie Jolly**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

** Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia is a phenotypic and genetically heterogeneous neoplasm, characterized by the presence of different genetic abnormalities and mutations that are involved in the diagnosis and prognosis of patients. Variants in the *IDH1* and *IDH2* genes have been described among the five most recurrent mutations in patients with AML. In this work, 50 paraguayans patients with a clinical diagnosis of AML were studied for the detection of the *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* and *IDH2R172* variants by Sanger sequencing and High Resolution Melting (HRM) techniques, obtaining a 30% appearance of the variants in the study population, which correspond to 4% for *IDH1G105*, 10% for *IDH1R132* and 18% for *IDH2R140*. The *IDH2R172* variant was not detected in the studied population. The co-occurrence between NPM1 and *IDH1/2* was also described, with a percentage of 28%, 12% between the *FLT3-ITD* and *IDH1/2* mutations and 2% between the *RUNX1-RUNX1T1* fusion rearrangement and one mutation in *IDH2*. The data in this work are relevant in the clinical, diagnostic and treatment fields of acute myeloid leukemia, in addition to being the first study of *IDH1/2* variants carried out in Paraguay.

Keywords: Acute myeloid leukemia, genes, isocitrato dehydrogenase, mutation, Sanger Sequencing

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	2
1.1. Leucemia Mieloide Aguda.....	3
1.2. Genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	6
1.3. Detección de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	11
1.4. Co-ocurrencia de <i>IDH1/2</i> con otras mutaciones.....	13
1.5. Tratamiento aprobado para pacientes con LMA positivo para las variantes <i>IDH1/2</i>	14
1.6. Justificación del trabajo.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo General.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Diseño.....	19
3.2. Sujetos.....	19
3.3. Criterios de inclusión.....	19
3.4. Criterios de exclusión.....	19
3.5. Tipo de muestreo.....	20
3.6. Reclutamiento.....	20
3.7. Recolección de datos clínicos y demográficos.....	20
3.8. Variables.....	20
3.9. Análisis por técnicas moleculares de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> ...	22
3.9.1. Extracción del material genético.....	22
3.9.2. Cuantificación del ADN por método fluorométrico.....	23
3.9.3. Secuenciación por Sanger.....	23
3.9.4 Detección de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> mediante curvas de <i>melting</i> de alta resolución o <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	26
3.10. Descripción de la co-ocurrencia de variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> con otras mutaciones y re-arreglos génicos presentes en la LMA.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Características demográficas de los pacientes en estudio.....	35

4.2. Características clínicas al momento del diagnóstico.....	35
4.3. Detección de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	36
4.3.1. Detección de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> por la metodología de secuenciación por Sanger.....	36
4.3.2 Detección de las variantes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> por la metodología HRM.....	40
4.3.3. Optimización del ensayo de HRM.....	45
4.4. Comparación de la detección de las variantes <i>IDH1G105</i> e <i>IDH2R140</i> por secuenciación por Sanger y HRM.....	49
4.5. Frecuencia y co-ocurrencia de las variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> con otras mutaciones y/o re-arreglos de fusión.....	50
5. DISCUSIÓN.....	53
6. CONCLUSIÓN.....	68
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	70
8. ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> y sitio de unión de los cebadores de la secuenciación por Sanger.....	24
Figura 3.2. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> y sitio de unión de los cebadores del HRM.....	27
Figura 3.3. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> y sitio de unión de los cebadores del HRM optimizado.....	30
Figura 4.1. Electroferograma de la detección de la variante <i>IDH1G105</i>	38
Figura 4.2. Electroferograma de la detección de las variantes <i>IDH1R132</i>	39
Figura 4.3. . Electroferograma de la detección de las variantes <i>IDH2R140</i>	40
Figura 4.4. Curva de <i>melting</i> normalizada de la variante <i>IDH1G105</i>	42
Figura 4.5. Curva de <i>melting</i> normalizada de la variante <i>IDH1R132</i>	43
Figura 4.6. Curva de <i>melting</i> normalizada de la variante <i>IDH2R140</i>	45
Figura 4.7. Tc para la variante <i>IDH1G105</i>	46
Figura 4.8. Tc para la variante <i>IDH2R140</i>	46
Figura 4.9. Curva de <i>melting</i> normalizada de la variante <i>IDH1G105</i> en el ensayo de HRM optimizado.....	48
Figura 4.10. Curva de <i>melting</i> normalizada de la variante <i>IDH2R140</i> en el ensayo de HRM optimizado.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos adaptados de Panuzzo y cols. 2020; sobre variantes en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	10
Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para la Secuenciación por Sanger.....	23
Tabla 3. Programación de ciclado para <i>IDH1</i> , según el protocolo de Rakheja y cols., modificado.....	25
Tabla 4. Programación de ciclado para <i>IDH2</i>	25
Tabla 5. Características de los cebadores diseñados para el ensayo de HRM.....	26
Tabla 6. Condiciones de ciclado para HRM.....	28
Tabla 7. Características de los cebadores diseñados para el ensayo optimizado de HRM.....	29
Tabla 8. Condiciones de ciclado para <i>IDH1G105</i>	31
Tabla 9. Condiciones de ciclado para <i>IDH2R140</i>	31
Tabla 10. Condiciones de ciclado para <i>IDH1R132</i>	32
Tabla 11. Condiciones de ciclado de HRM para la detección de <i>IDH1G105</i>	32
Tabla 12. Condiciones de ciclado de HRM para la detección de <i>IDH2R140</i>	32
Tabla 13. Características clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico.....	35
Tabla 14. Resultados de Secuenciación por Sanger de los pacientes en estudio.....	37
Tabla 15. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante <i>IDH1G105</i>	41
Tabla 16. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante <i>IDH1G05</i>	42
Tabla 17. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante <i>IDH1R132</i>	43
Tabla 18. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante <i>IDH1R132</i>	43
Tabla 19. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante <i>IDH2R140</i>	44
Tabla 20. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante <i>IDH2R140</i>	45
Tabla 21. Resultados del HRM para la variante <i>IDH1G105</i>	47

Tabla 22. Resultados del HRM para la variante <i>IDH2R140</i>	49
Tabla 23. Resultados de secuenciación y HRM para la variante <i>IDH1G105</i>	50
Tabla 24. Resultados de secuenciación y HRM para la variante <i>IDH2R140</i>	50
Tabla 25. Co-ocurrencia de mutaciones y/o re-arreglos de fusión con las variantes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	51
Tabla 26. Resultados de las mutaciones en <i>IDH1/2</i> , <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i> de todos los pacientes en estudio.....	52

ABREVIATURAS

11q	Alteración en el brazo largo del cromosoma 11
2-HG	2-Hidroxiglutarato
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Citosina
CEPBA	Gen de CCAAT/proteína de unión potenciadora alfa
CGARN	Cancer Genome Atlas Research Network
c-KIT	Receptor del tipo tirosin-quinasa
CN-LMA	Leucemia mieloide aguda de cariotipo normal
CO ₂	Dióxido de carbono
Cys	Cisteína
ddNTPs	Dideoxinucleótidos
DNMT3A	Gen de la enzima ADN-metiltransferasa 3A
EEUU	Estados Unidos de América
ELN	European Leukemia Network
FCM-UNA	Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Asunción
FDA	Food and Drugs Administration
FLT3-ITD	Duplicaciones internas en tándem del gen FLT3
FLT3-TKD	Dominio de tirosin-quinasa del gen FLT3
Fw	Forward
G	Guanina
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HC	Hospital de Clínicas
His	Histidina
HRM	High resolution melting
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa 1
IDH1G105	Codón G105 del Gen IDH1
IDH1R132	Codón R132 del Gen IDH1
IDH2	Isocitrato deshidrogenasa 2
IDH2R140	Codón R140 del Gen IDH2

IDH2R172	Codón R172 del Gen IDH2
IICS-UNA	Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – Universidad Nacional de Asunción
inv(16)	Inversión del cromosoma 16 o MYH1-CBFB
inv(3)	Inversión del cromosoma 3
IPS	Instituto de Previsión Social
Leu	Leucina
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
Mg ²⁺	Catión Magnesio
mIDH1	Mutante IDH1
mIDH2	Mutante IDH2
mM	Milimolar
Mn ²⁺	Catión Manganeseo
Mut	Mutación
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NGS	Secuenciación de próxima generación
NPM1	Gen de la nucleofosmina 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pro	Prolina
R132C	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Cisteína
R132G	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Glicina
R132H	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Histidina
R132L	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Leucina
R132P	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Prolina
R132S	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 132 por Serina
R140G	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 140 por Glicina
R140L	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 140 por Leucina
R140Q	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 140 por Glutamina
R140W	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 140 por Triptófano
R172G	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 172 por Glicina
R172K	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 172 por Lisina

R172M	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 172 por Metionina
R172S	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 172 por Serina
R172W	Cambio del aminoácido Arginina en el codón 172 por Triptófano
RC	Remisión completa
Rv	Reverse
SEER	Vigilancia, epidemiología y resultados finales
Ser	Serina
SG	Supervivencia global
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
T	Tirosina
t(15;17)	Translocación entre los cromosomas 15 y 17 o PML-RARA
t(6;9)	Translocación entre los cromosomas 6 y 9
t(8;21)	Translocación entre los cromosomas 8 y 21 o RUNX1-RUNX1T1
Tc	Temperatura crítica
TCA	Ciclo del ácido cítrico
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
V1	Variante 1 del HRM
V2	Variante 2 del HRM
V3	Variante 3 del HRM
α -KG	Alfa-cetoglutarato
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

**ESTUDIO DE VARIANTES EN LOS GENES *IDH1* E *IDH2* EN PACIENTES
PARAGUAYOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA**

1. MARCO TEORICO

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leucemia Mieloide Aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un tipo de cáncer caracterizado por células hematopoyéticas poco diferenciadas o anormalmente diferenciadas (blastos) con proliferación clonal que infiltran tejidos como la médula ósea y sangre periférica, entre otros (1).

Es una enfermedad fenotípica y genéticamente heterogénea en la que ocurre una inhibición de la diferenciación de las células hematopoyéticas seguida de una acumulación de blastos en diversas etapas de maduración. Debido a la infiltración de los blastos en la médula ósea, se produce una eritropoyesis ineficaz (2), dando lugar a la disminución de los elementos hematopoyéticos normales (citopenias). Las citopenias muestran manifestaciones clínicas como anemia (fatiga y disnea), neutropenia (infecciones) y trombocitopenia (hemorragia). Estos signos y síntomas generalmente están presentes al momento del diagnóstico y son dominantes durante todo el tratamiento (3,4).

La LMA constituye el 31% del tipo de leucemia más común en adultos (5). El diagnóstico es poco frecuente antes de los 45 años, siendo el promedio de edad 68 años; es decir que la incidencia de aparición aumenta con la edad, y también lo hace la frecuencia de anomalías citogenéticas y moleculares de riesgo adverso (2,6,7). Es más frecuente entre los blancos no hispanos y a su vez los hombres tienen más predominio en comparación con las mujeres (proporción de 5:3) (2,6). Basado en los datos recolectados entre 2013 al 2018 por el National Cancer Institute la incidencia reportada a nivel mundial es de 4,3 por cada 100.000 habitantes por año y la tasa de muerte es de 2.8 por cada 100.000 habitantes (6). Según la Sociedad Americana de Cáncer, para el 2021 se estima el diagnóstico de 61.090 nuevos casos de leucemia y la muerte de 23.660 personas en EEUU (5).

Los estudios realizados en cuanto a la LMA, han demostrado que es una enfermedad

compleja y dinámica, con la presencia de múltiples mutaciones impulsoras adquiridas somáticamente, clones competidores coexistentes y una enfermedad que evoluciona con el tiempo (8–10). Puede presentar diferentes características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares (11), diferenciarla de otras formas de leucemia tiene implicaciones terapéuticas (12).

Para el diagnóstico se realizan citometría de flujo, morfología celular, análisis citogenéticos y moleculares, en donde el material utilizado es aspirado medular anticoagulado con EDTA. Se evalúan los antígenos o marcadores de superficie en las células leucémicas, y se requiere un recuento de blastos en sangre periférica o médula ósea del 20% o más para hacer el diagnóstico, excepto en casos con ciertas anomalías cromosómicas (12).

El 50-70% de los pacientes con LMA presentan anomalías cromosómicas no aleatorias o recurrentes (13); por lo tanto, el análisis citogenético sigue siendo obligatorio en la evaluación de sospecha de la LMA. Con el diagnóstico molecular, es posible la identificación de mutaciones somáticas recurrentes en genes como el *NPM1*, *FLT3*, *CEPBA* y *RUNX1*, entre otros, lo que ha convertido al análisis molecular en una herramienta importante para evaluar el pronóstico (14).

A partir de la información citogenética y molecular ha sido posible estratificar a los pacientes en distintos grupos según el pronóstico favorable, intermedio y adverso (15). Las translocaciones cromosómicas t(8;21), t(15;17) o inv (16) tienen un pronóstico favorable con una tasa de supervivencia global (SG) a 3 años de aproximadamente 66% y 33% en pacientes menores de 60 años y mayores de 60 años, respectivamente. Los pacientes con t(9;11), monosomía 5 o 7 y citogenética compleja tienen un riesgo desfavorable. Se observó también un alto riesgo de fracaso del tratamiento y muerte en personas con t(6; 9), inv (3) o cambios 11q. La presencia de mutaciones de c-KIT en pacientes con t(8;21) aumenta el riesgo de recaída y disminuye la SG (14).

Los pacientes de pronóstico intermedio, en su mayoría eran pacientes que presentaban cariotipo normal (CN-LMA), siendo el 45-50% de los pacientes con LMA, dentro de los cuales se observaba una variabilidad sustancial en el desenlace de los pacientes

(16). Sin embargo, gracias a la genética molecular que revolucionó la caracterización, clasificación y pronóstico de la LMA en las últimas décadas, fue posible estratificar también a los pacientes con cariotipo normal que presentaban alguna mutación (17).

Las mutaciones más comunes en estos pacientes aparecen en los genes *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *IDH1/2*. Aproximadamente entre el 50-60% de estos pacientes, se presentan mutaciones en el gen de la nucleofosmina 1 (*NPM1*), mutación somática que provoca la localización citoplasmática en vez de la nucleolar de la proteína (18), y se lo relaciona con un mejor pronóstico de supervivencia, cuando su presencia no co-ocurre con las mutaciones en el gen *FLT3* (4,16,19). Esta mutación se asocia con otras anomalías genéticas recurrentes como la *FLT3*-ITD (40%), *FLT3*-TKD (10% a 15%) y variantes en los genes *IDH* (25%) (18–20). Las mutaciones o variantes en los genes *IDH* son oncogénicas, se observan en el 15-20% de todos los casos de LMA y en el 25-30% de los pacientes con CN-LMA; y aparece con más frecuencia en personas mayores a 70 años (21). La otra mutación más frecuente en estos pacientes constituyen las repeticiones internas en tandem en el dominio yuxtamembrana del receptor de tirosin-quinasa (*FLT3*-ITD), con una frecuencia entre 30-45%, y por lo general está relacionado a un peor pronóstico (16,20).

Los estudios de genómica comparativa han demostrado que el número de mutaciones codificantes por genoma de la LMA es menor en comparación con la mayoría de los otros cánceres humanos, y se necesitan una o dos mutaciones cooperativas adicionales para generar el clon maligno fundador (8). La diversidad combinatoria que impulsa la heterogeneidad en el fenotipo y el resultado clínico de la LMA es enorme, y las asociaciones más frecuentes son *NPM1* + *DNMT3A*, *NPM1* + *IDH1*, *NPM1* + *FLT3*, *DNMT3A* + *IDH1* y *DNMT3A* + *FLT3* (22).

La importancia en la identificación de un panel de marcadores radica en lograr caracterizar la enfermedad y estratificar a los pacientes en los grupos de riesgo, lo que tiene implicancia en las estrategias de tratamiento, dada la disponibilidad de terapias dirigidas que mejoran los resultados en pacientes con características moleculares o citogenéticas relevantes (17,22–24).

Avances en el tratamiento de la LMA han resultado en una mejoría sustancial en las tasas de remisión completa (RC), lo que se traduce como ausencia de evidencia de leucemia después del tratamiento. Se espera que aproximadamente 60-70% de los adultos con LMA alcancen el estado de RC después de la terapia de inducción adecuada; y se puede esperar que más del 25% de los adultos con LMA (alrededor del 45% de los que logran RC) sobrevivan 3 años o más y se curen (6).

1.2. Genes *IDH1* e *IDH2*.

1.2.1. Características generales

En 2009, Mardis y cols. realizaron un análisis mutacional integrado mediante secuenciación e identificaron 12 mutaciones no sinónimas que posiblemente podrían ser relevantes en la patogénesis de la LMA, de las cuales 3 de ellas fueron recurrentes: *NPM1*, *NRAS* e *IDH1* (25), y posteriormente en 2012, Patel y colaboradores sugirieron que el efecto más favorable de las mutaciones *NPM1* estaban restringidas a los pacientes que presentaban co-ocurrencia de la *NPM1* con mutaciones en *IDH1* e *IDH2* (23).

Los genes *IDH1* e *IDH2* se localizan en los cromosomas 2q33 y 15q26 respectivamente; y codifican para las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 que catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG) y CO_2 , una reacción que requiere la presencia de un ion divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y del cofactor NADP^+ que se reduce a NADPH (26–29).

Las enzimas son estructuras homodiméricas asimétricas, ambas comparten una similitud estructural significativa, y cumplen un rol papel importante en el control celular del daño oxidativo a través de la generación de NADPH (28,30). Una de las diferencias fundamentales entre las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 es la ubicación celular de las mismas, donde la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 se localiza el citoplasma y el peroxisoma, y la enzima isocitrato deshidrogenasa 2 en la mitocondria (28,29).

Además de la síntesis de metabolitos centrales en el ciclo del ácido cítrico (TCA), las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 representan una de las rutas principales para la generación celular de NADPH en la mayoría de los tejidos. La cantidad de NADPH producida en la descarboxilación oxidativa, resulta esencial en los mecanismos de defensa celular contra el daño oxidativo a través de la reducción de glutatión y tiorredoxinas, así como la formación de catalasa activada (31).

Estas enzimas están involucradas también en diversos procesos celulares como la adaptación a la hipoxia, la desmetilación de histonas y la modificación del ADN. Además, muchas enzimas dependen de niveles suficientes de α -KG para múltiples procesos celulares, así como para la regulación epigenética. La enzima mutada convierte el α -KG a 2-hidroxiglutarato (2-HG), y se ha demostrado que el 2-HG es una molécula que actúa como inhibidor competitivo del α -KG, lo que resulta en la inhibición de TET2, otra enzima involucrada en la desmetilación del ADN (21,32).

Las mutaciones en genes que codifican a los reguladores epigenéticos, como lo son los genes *IDH1* e *IDH2*, por lo general se adquieren de manera temprana y están presentes en el clon fundador. Con frecuencia, estos mismos genes están mutados en personas de edad avanzada junto con la expansión clonal de la hematopoyesis, lo que conlleva a un mayor riesgo de desarrollo de cánceres hematológicos. Además, estas mutaciones pueden persistir después del tratamiento, lo que da lugar a una expansión clonal durante la remisión hematológica y, finalmente provoca una recaída de la enfermedad (8).

1.2.2. Variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*

Variantes en los genes *IDH* fueron reportados por primera vez en el cáncer colorrectal. Posteriormente se describieron en enfermedades como glioblastomas, LMA, síndromes mielodisplásicos, mielofibrosis, leucemia linfoblástica aguda, carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal, entre otros. (26,29,30,33–41).

La presencia de las variantes en estos genes produce alteraciones a nivel de los sitios activos de las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 que producen cambios en el

mecanismo de catálisis del sustrato produciendo una ganancia de función que, en las células leucémicas, cataliza la reducción del α -cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato en altos niveles. El 2-HG es un metabolito que se encuentra en niveles muy bajos en las células y tejidos normales (42). Sin embargo, en las células portadoras de las variantes, se produce un aumento y acúmulo del 2-HG, que se ha asociado al desarrollo de un proceso oncogénico debido a que inducen el bloqueo en la diferenciación celular, por medio de la inhibición de la actividad de la histona modificadora de la cromatina y las desmetilasas del ADN. Al inhibirse estos reguladores epigenéticos, se libera una “señal de hipermetilación”, lo que genera la alteración de la expresión de genes y por ende la célula pierde la capacidad de progresar a la célula diferenciada (21,29,31).

Las variantes descritas en los genes *IDH1* e *IDH2* son mutaciones somáticas heterocigotas. Estas variantes son con cambio de sentido (*missense*), donde ocurre la sustitución de un aminoácido; se trata de residuos de arginina conservados en el codón 132 en el exón 6 del gen *IDH1* y en los codones 140 o 172 en el exón 5 del gen *IDH2*. Pero también fue descrito un polimorfismo germinal de un solo nucleótido sinónimo (rs11554137) ubicado en el codón 105 en el exón 6 del gen *IDH1* (21).

1.2.3. Variantes de los genes *IDH1* e *IDH2* en LMA

Mediante los análisis de secuenciación masiva, Mardis y cols. en 2009 reportaron por primera vez variantes en los genes *IDH* en la LMA (25). Estudios de genómica posteriores demostraron que los genes *IDH1* e *IDH2* se encuentran entre los cinco genes mutados en forma recurrente en la LMA, evidenciando la importancia de incluir el estudio de estos genes en el diagnóstico de la LMA (43).

Variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* se observan en el 15 – 20% de los pacientes con LMA y aparecen con mayor frecuencia en pacientes que presentan cariotipo normal (44,45). Variantes en el gen *IDH1* se observaron entre el 7-14% de los casos, y variantes en el gen *IDH2* entre el 8-19% de los casos, con una frecuencia mayor en los pacientes con edad mayor a 70 años (1,21,46,47).

Entre las variantes más mayormente reportadas se encuentran la *IDH1R132*, *IDH2R140* y la *IDH2R172* (36,44,45,48). En el caso de la *IDH1*, el aminoácido Arginina 132 puede cambiar a Histidina, Cisteína o Glicina (49,50); en *IDH2*: en la Arginina 140 se ha reportado cambios a Triptófano y Glutamina, y en el caso de la Arginina 172 cambios a Lisina (44,45).

Se ha descrito también el polimorfismo germinal rs11554137, en el aminoácido Glicina 105 del *IDH1* (*IDH1G105*) sin cambios en el aminoácido. Esta variante se ha asociado a un factor pronóstico adverso para el desarrollo de la LMA (51–53).

En cuanto al pronóstico relacionado a variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*, varios estudios reportaron que pacientes con LMA de cariotipo normal que presentan tanto mutaciones en el gen *NPM1* y en el gen *IDH1* o *IDH2*, presentaron una mejor tasa de supervivencia general de 3 años que aquellos pacientes que tenían alguna mutación en la *NPM1* pero eran silvestres en relación a las variantes para los genes *IDH* (23). A pesar de estos reportes, las variantes en *IDH1* e *IDH2* siguen siendo indefinidos en cuanto al pronóstico de los pacientes; pero, si bien estas variantes no tienen una relevancia pronostica importante, han ganado importancia clínica debido al desarrollo de terapias dirigidas (54).

Un resumen de los datos actualizados sobre los genes *IDH1* e *IDH2*, en cuanto a la frecuencia de aparición y funciones relacionadas entre otras informaciones, se resumen en el cuadro siguiente:

Tabla 1. Datos adaptados de Panuzzo y cols. 2020; sobre variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* (55).

Genes mutados	Frecuencia en LMA (%)	Funciones, asociaciones, Impacto pronóstico y drogas específicas
<i>IDH1</i>	6-10	• Enzima involucrada en el ciclo TCA • Papel importante en el metabolismo de los lípidos • Implicado en la defensa celular del daño oxidativo. • Las variantes causan la acumulación de 2-HG que inhibe varias dioxigenasas involucradas en la regulación epigenética • Frecuente en CN-LMA • Asociado con mutaciones <i>NPM1</i> • Asociado con <i>FLT3</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>ASXL1</i>, <i>RUNX1</i>, mutaciones <i>NRAS</i> • Mutuamente excluyente con mutaciones <i>TET2</i> • Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas • Evento temprano en leucemogénesis • Impacto pronóstico dependiente del contexto • <i>Ivosidenib</i>: Inhibidor de isocitrato deshidrogenasa 1 aprobado por la FDA
<i>IDH2R140</i>	5-15	• Enzima involucrada en el ciclo TCA • Participa en la defensa celular del daño oxidativo • Las variantes causan la acumulación de 2-HG que inhibe varias dioxigenasas involucradas en la regulación epigenética • Frecuente en CN-LMA • La frecuencia aumenta con la edad asociada con mutaciones <i>NPM1</i> • Asociado con <i>FLT3</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>ASXL1</i>, <i>RUNX1</i>, mutaciones <i>NRAS</i> • Mutuamente excluyente con mutaciones <i>TET2</i> • Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas • Evento temprano en leucemogénesis • El impacto pronóstico podría ser más favorable que otras variantes de <i>IDH</i>.

		• <i>Enasidenib</i>: El inhibidor de isocitrato deshidrogenasa 2 aprobado por la FDA.
<i>IDH2R172</i>	1-4	• Enzima involucrada en el ciclo TCA • Participa en la defensa celular del daño oxidativo • Las variantes causan la acumulación de 2-HG que inhibe varias dioxigenasas involucradas en la regulación epigenética. • Frecuente en CN-LMA • La LMA con mutación <i>IDH2R172</i> (en ausencia de otras lesiones) puede representar una clase de enfermedad separada, asociada con una expresión de genes de microarrays y un perfil de expresión de microRNA distintos • Mutuamente excluyente con mutaciones <i>NPM1</i> • Asociado con <i>FLT3</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>ASXL1</i>, <i>RUNX1</i>, mutaciones <i>NRAS</i> • Mutuamente exclusivo con mutaciones <i>TET2</i> • No hay datos consistentes sobre el impacto pronóstico • Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas • Evento temprano en leucemogénesis • <i>Enasidenib</i>: El inhibidor de isocitrato deshidrogenasa 2 aprobado por la FDA.

1.3. Detección de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*

La primera técnica utilizada para la detección de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* fueron técnicas de secuenciación masiva, analizando paneles de mutaciones en la LMA (25). Posteriormente, estudios de las variantes han utilizado otras técnicas como secuenciamiento por Sanger, secuenciamiento de próxima generación o NGS (*Next Generation Sequencing*) y técnicas de *screening* como el *high resolution melting* (HRM) (44,45,56).

La secuenciación por Sanger es el "estándar de oro", debido a su precisión, robustez y

facilidad de uso, pese a ser laborioso y costoso (45,57,58). Sin embargo, existen otros métodos que presentan mayor sensibilidad para la detección de variantes y también podrían presentar ventajas respecto al costo.

La técnica de HRM se considera un método de *screening* fácil, rápido y sensible para el análisis de variantes (44). Permite realizar estudios de las diferencias en las temperaturas de *melting* o temperatura de fusión (T_m) entre las secuencias con la mutación y las secuencias del tipo silvestre, donde las diferencias en la temperatura de *melting* son ocasionadas por el cambio de una base en la secuencia. Varios estudios han comparado los resultados obtenidos por la técnica de HRM con el secuenciamiento por Sanger, obteniendo una concordancia de 99-100% (21,44,45).

1.3.1. Secuenciamiento por Sanger

La secuenciación por el método de Sanger consiste en el secuenciamiento de una cadena de ADN, mediante la incorporación de un dideoxinucleótidos (ddNTPs) en el extremo 3' (que impide la extensión de la cadena). Estos ddNTPs se encuentran marcados con un fluoróforo diferente por cada nucleótido (A, C, G, T), de manera a que éste pueda ser detectado e identificado (59). Los fragmentos de diferentes tamaños son separados por electroforesis capilar, y una detección automatizada permite la generación de un electroferograma para su posterior análisis (60). La precisión, robustez y facilidad de uso llevaron al método de secuenciación por Sanger a convertirse en la tecnología más utilizada para secuenciar ADN y sigue siendo el estándar de oro para la detección de mutaciones (58).

Para evaluar los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes con LMA, la secuenciación de Sanger es el método más utilizado actualmente, pese a su límite de detección bajo (-20%), además de tener la desventaja de necesitar equipos y reactivos costosos (47).

1.3.2. High Resolution Melting (HRM)

Los métodos de *screening* para genotipificación que se utilizan desde hace varios años incluyen métodos que utilizan sondas intercalantes para generar curvas de *melting* alelo específicas (61). El HRM es una metodología de escaneo de mutaciones que

permite un genotipado con alta sensibilidad y especificidad. Es un método de tubo cerrado, lo que indica que la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis posterior se realizan secuencialmente en el mismo tubo de reacción, lo que lo hace más conveniente que otras metodologías (62).

El *high resolution melting* o análisis por curvas de alta resolución es un método de *screening* que se basa en el análisis de las temperaturas de *melting*. La temperatura de *melting* (T_m) es la temperatura a la cual el 50% de los productos de PCR se encuentran en forma bicatenaria, y el otro 50% de las copias de ADN se encuentran en forma monocatenaria. Los métodos de HRM permiten detectar variaciones en la secuencia de un producto de PCR, mediante las variaciones observadas en la T_m (61). En esta técnica se generan perfiles de curvas de *melting* de ADN específicos y sensibles, y que se utilizan en la detección rutinaria de variantes conocidas, por ejemplo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (63).

En 2010, Pardanani y cols. detectaron las variantes en el gen *IDH1* en neoplasmas mieloproliferativos, utilizando la técnica de HRM (49). A partir de allí, varios autores han aplicado la técnica para detectar las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* e *IDH2R172* en pacientes con LMA (33,44,45,50).

Aunque la técnica HRM es muy útil debido a su rapidez, sensibilidad y bajo costo, es una técnica que necesita estandarización y debe ser confirmado por otros métodos como secuenciación, que es el método estándar para la detección de mutaciones (21,57); aun así, ya hubieron reportes de que el HRM es capaz de detectar variaciones que ya no son visibles en el secuenciamiento por Sanger (45).

1.4. Co-ocurrencia de *IDH1/2* con otras mutaciones.

Se han reportado la presencia de otros marcadores moleculares con las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*. Las mutaciones en el gen *NPM1* son las más comunes con las *IDH1R132* e *IDH2R140*, pero el *IDH2R172* es mutuamente excluyente con los demás marcadores conocidos (64).

Se ha reportado que en pacientes con LMA de cariotipo normal, las mutaciones en el gen *NPM1* ocurren simultáneamente con la *IDH1R132* en una frecuencia del 45-83%, y con la *IDH2R140* en el 25-61% de los casos (64). Papaemmanuil y cols. reportaron el odds ratio para co-mutación de la variante *IDH2R140* con *NPM1* igual a 3,6 ($p=5 \times 10^{-10}$) (65). En cuanto a la co-ocurrencia con la mutación en el gen *FLT3*-ITD, éstas ocurren con la variante *IDH1R132* en una frecuencia de 0-50% y en 17-30% con la variante *IDH2R140* (64).

Estudios de co-ocurrencia entre los genes *IDH1* e *IDH2* hacen mención de que estas variantes por lo general son mutuamente excluyentes entre sí (66–68); aunque fueron reportado co-ocurrencias de las variantes en el gen *IDH1*, como mencionan Patel y cols., que citan co-ocurrencia entre *IDH1G105* e *IDH1R132* en un 0,7% (1/146) (43) y Ravandi y cols. reportan la misma co-ocurrencia en un 1,17% (2/170).

1.5. Tratamiento aprobado para pacientes con LMA positivo para las variantes *IDH1/2*.

Se han introducido inhibidores orales que inhiben la forma mutante de la enzima y bloquean la producción de 2-HG. Entre estos se encuentra el *enasidenib*, que fue aprobado por la FDA en 2017 para su uso en pacientes que presenten LMA refractaria o en recaída, y que sean portadores de mutaciones en el gen *IDH2* (69,70). En el 2018, se aprobó *ivosidenib* para LMA refractaria o en recaída en pacientes portadores de mutaciones en el gen *IDH1*; y en el 2019 se aprobó *ivosidenib* para pacientes con LMA de novo, portadores de mutaciones en *IDH1* (70). Se han realizado también varias publicaciones que describen que la combinación de los medicamentos *ivosidenib* con *azacitidine* en pacientes con LMA de novo portadores de mutaciones en *IDH1* han presentado una mejoría sustancial (71). Varios otros medicamentos se encuentran en etapa de desarrollo para actuar a nivel de las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (72,73).

1.6. Justificación del trabajo

El presente proyecto tuvo como objetivo estudiar la presencia de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA en su mayoría positivos para la mutación *NPM1*, y determinar la frecuencia de las mismas en la población de estudio, generando así conocimientos no descritos en la población.

En el contexto actual de la LMA, la confirmación de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* es particularmente importante. Si bien no tienen una relevancia pronóstica, su importancia radica en la disponibilidad de terapias dirigidas que mejoran los resultados en pacientes con características moleculares o citogenéticas relevantes.

Por esto, la justificación del trabajo consistió en sentar las bases de información necesarias para el desarrollo de futuros protocolos clínicos de tratamiento en el país.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Pregunta de Investigación: ¿Cuál es la frecuencia de las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* e *IDH2R172* en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con LMA?

2.1 Objetivo general: Determinar la frecuencia de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar la presencia de las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* e *IDH2R172* en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA.
- Describir co-ocurrencia entre las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* y otras mutaciones y/o rearrreglos de fusión previamente estudiados en el laboratorio de Genética Molecular en pacientes con LMA.
- Describir las variables clínicas del paciente al momento del diagnóstico.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. Diseño:

El presente trabajo consistió en dos fases:

Fase 1: Con diseño observacional descriptivo transversal retrospectivo.

Fase 2; Con diseño observacional descriptivo transversal prospectivo

3.2. Sujetos

3.2.1. Población enfocada:

Pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA.

3.2.2. Población accesible:

Pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA, que acudieron al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS-UNA) durante el periodo 2012-2020.

3.3. Criterios de inclusión

- Pacientes paraguayos con edad mayor a 18 años.
- Pacientes con diagnóstico clínico de LMA.
- En la fase II, pacientes que aceptaron participar del estudio mediante firma del consentimiento informado.

3.4. Criterios de exclusión

- Muestras de pacientes que se encontraban en mal estado de conservación.
- Muestras con material genético degradado.
- Pacientes con LMA que presentan la mutación PMLRARA.

3.5. Tipo de muestreo:

No probabilístico de casos consecutivos.

3.6. Reclutamiento

El trabajo consistió en dos fases:

Fase 1 o fase retrospectiva, las muestras pertenecieron a la colección de muestras del Laboratorio de Genética Molecular. Las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, fueron incluidas en el estudio. Fueron priorizadas las muestras que presentaron mutaciones en el gen *NPM1*.

Fase 2 o fase prospectiva, pacientes con diagnóstico de LMA, que acudieron al Laboratorio de Genética Molecular en el periodo comprendido entre mayo 2019 - mayo 2020 para la realización de otros marcadores moleculares, fueron reclutados e incluidos en el estudio mediante firma del consentimiento informado.

3.7. Recolección de datos clínicos y demográficos

Los datos clínicos y demográficos fueron recolectados y registrados al momento del diagnóstico. Esto fue realizado por profesionales del Laboratorio de Genética Molecular, en colaboración con los médicos especialistas.

3.8. Variables

Las variables estudiadas fueron:

3.8.1. Datos clínicos y demográficos

3.8.1.1 Variables demográficas:

- ✓ Edad: Variable cuantitativa discreta. Corresponde al tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento.
- ✓ Sexo: Variable cualitativa nominal dicotómica. Corresponde a la condición orgánica, masculina o femenina.
- ✓ Procedencia: Variable cualitativa nominal. De donde proviene algo o alguien.

3.8.1.2 Variables clínicas:

- ✓ Recuento de glóbulos blancos: Variable cuantitativa continua. Consiste en la cantidad de glóbulos blancos o leucocitos presentes en la muestra de sangre de un paciente. Se mide en cantidad de glóbulos blancos/ μ L.
- ✓ Recuento de blastos: Variable cuantitativa continua. Consiste en la cantidad de blastos presentes en la muestra de sangre de un paciente. Se mide en porcentaje.
- ✓ Hemoglobina: Variable cuantitativa continua. Consiste en la cantidad cuantitativa de la hemoglobina presente en la muestra de sangre de un paciente. Se mide en g/dL.
- ✓ Plaquetas: Variable cuantitativa discreta. Consiste en la cantidad cuantitativa de plaquetas presente en la muestra de sangre de un paciente. Se mide en cantidad plaquetas/ μ L.

3.8.2 Variables analizadas por técnicas moleculares

- ✓ Variante IDH1G105. *IDH1G105* es un polimorfismo germinal de un solo nucleótido (SNP), conocido como SNP rs11554137 (GGC>GGT) en el exón 6 del gen *IDH1*, sin cambios en el aminoácido Glicina (G) (74). La variante fue analizada por secuenciación de Sanger y por la técnica de HRM según se explica en el apartado 3.9. Variable dicotómica (presencia o ausencia de la variante).
- ✓ Variante IDH1R132. *IDH1R132* es una variante en el exón 6 del gen *IDH1*, que genera los siguientes cambios: Arg132Cys (R132C) (CGT>TGT), Arg132His (R132H) (CGT>CAT), Arg132Ser (R132S) (CGT>AGT), Arg132Gly (R132G) (CGT>GGT), Arg132Pro (R132P) (CGT>CCT),

Arg132Leu (R132L) (CGT>CTT) (74). Las variantes fueron analizadas por secuenciación de Sanger y por la técnica de HRM según se explica en el apartado 3.9. Variable dicotómica (presencia o ausencia de la variante).

- ✓ Variante *IDH2R140*. *IDH2R140* es una variante en el exón 5 del gen *IDH2*, y que genera los siguientes cambios: Arg140Trp (R140W) (CGG>TGG), Arg140Gln (R140Q) (CGG>CAG), Arg140Leu (R140L) (CGG>CTG), Arg140Gly (R140G) (CGG>GGG) (74). Las variantes fueron analizadas por secuenciación de Sanger y por la técnica de HRM según se explica en el apartado 3.9. Variable dicotómica (presencia o ausencia de la variante).
- ✓ Variante *IDH2R172*. *IDH2R172* es una variante en el exón 4 del gen *IDH2*, y que genera los siguientes cambios: Arg172Lys (R172K) (AGG>AAG), Arg172Ser (R172S) (AGG>AGC), Arg172Met (R172M) (AGG>ATG), Arg172Gly (R172G) (AGG>GGG), Arg172Trp (R172W) (AGG>TGG) (74). La variante fue analizada por secuenciación de Sanger y por la técnica de HRM según se explica en el apartado 3.9. Variable dicotómica (presencia o ausencia de la variante).

3.9 Análisis por técnicas moleculares de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*

Las muestras correspondientes a la fase retrospectiva del estudio fueron seleccionadas de la colección de muestras del Laboratorio de Genética Molecular, de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión anteriormente mencionados.

En relación a las muestras de la fase prospectiva, fueron estudiadas muestras de aspirados medulares anticoagulados con EDTA.

3.9.1 Extracción del material genético

El material genético utilizado consistió en ácido desoxirribonucleico (ADN) que fue extraído mediante el kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue

conservado a -20°C.

3.9.2 Cuantificación del ADN por método fluorométrico

La cuantificación del ADN se realizó por fluorometría. Se utilizó el kit *Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen-EUA)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones fueron realizadas en el fluorómetro *Qubit® 2.0 (Invitrogen-EUA)*.

3.9.3 SECUENCIACIÓN POR SANGER

3.9.3.1 Pruebas in silico de cebadores para secuenciación.

Para realizar la secuenciación por el método de Sanger, se utilizó los cebadores publicados por Rakheja y cols (tabla 2) (75). A fin de verificar las secuencias, se utilizaron las herramientas bioinformáticas *Primer-BLAST*, *OligoAnalyzer* y *SnapGene Viewer* versión 5.1.3.1. La localización de las variantes en los exones 6 y 5 de los genes *IDH1* e *IDH2* respectivamente, y el lugar de unión de los cebadores utilizados para la secuenciación se grafican en la figura 3.1.

Tabla 2. Secuencia de cebadores utilizados para la Secuenciación por Sanger_(75)

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Tamaño del amplicón (pb)
IDH1 Forward	GCCAGTGCTAAACTTGGCAG	560
IDH1 Reverse	TCAATTTTCATACCTTGCTTAATGGG	
IDH2 Forward	GCAGACTCCAGAGCCCACAC	471
IDH2 Reverse	TGCCATCTTTTGGGGTGAAG	

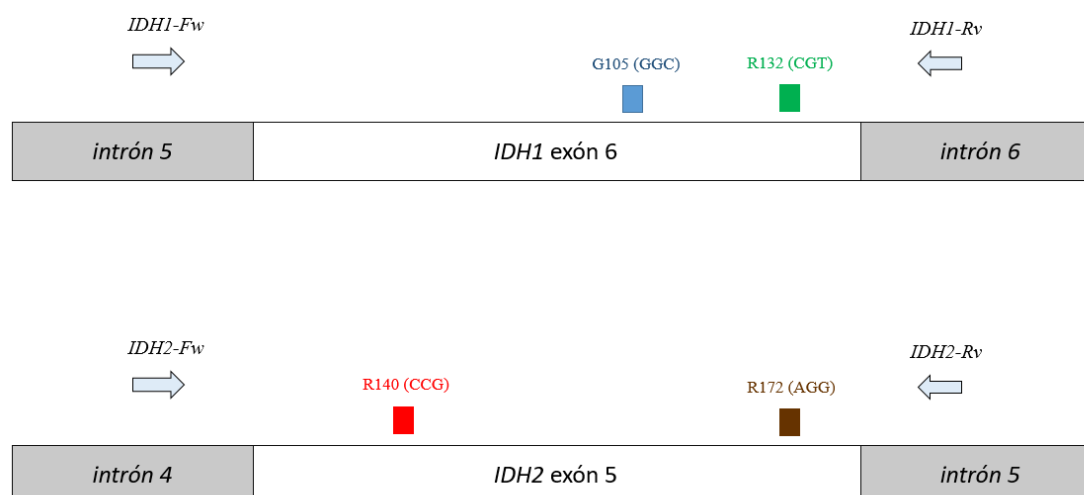


Figura 3.1. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes *IDH1* e *IDH2* y sitios de unión de los cebadores de la secuenciación por Sanger. El codón G105 está indicado como una caja azul, el codón R132 como una caja verde, el codón R140 como una caja roja y el codón R172 como una caja marrón. Se muestra también los lugares de unión de los primers forward (Fw) y reverse (Rv) para cada gen.

3.9.3.2 Amplificación de material genético por PCR convencional

Para detectar las variantes descritas en los genes *IDH1/2*, se realizó la amplificación de los exones 6 y 5 en los genes *IDH1* e *IDH2* respectivamente, siguiendo el protocolo descrito por Rakheja y cols. modificado (75). La localización de las variantes en los genes y el lugar de unión de los cebadores se grafican en la figura 3.1.

Para la preparación de la master mix se utilizaron los siguientes componentes: 5µL *10X PCR Buffer minus Mg* (*Invitrogen-EUA*); 1µL dNTPs 10mM (*Invitrogen-EUA*); 1,5µL *MgCl2* 50mM (*Invitrogen-EUA*); 0,8µL de los cebadores *IDH1-Fw* y *IDH1-Rv* 10µM y 0,9µL de los cebadores *IDH2-Fw* y *IDH2-Rv* 10µM (*Macrogen, Corea*); 0,2µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/µL (*Invitrogen-EUA*), 38,7 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas (*Invitrogen-EUA*) y 2 µL de DNA genómico 100 ng/µL. Para la amplificación se utilizó el Applied Biosystems™ Termociclador Veriti™. Las condiciones de ciclado de la PCR se observan en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Programación de ciclado para *IDH1*, según el protocolo de Rakheja y cols, modificado (75).

Programación de ciclado para <i>IDH1</i> .		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min.	1 ciclo
94°C	10 seg.	35 ciclos
52°C*	30 seg.	
72°C	30 seg.	
72°C	7min.	1 ciclo
4°C	∞	Final

*Temperatura de *annealing* modificado del protocolo original

Tabla 4. Programación de ciclado para *IDH2*.

Programación de ciclado para <i>IDH2</i> .		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min.	1 ciclo
94°C	10 seg.	35 ciclos
50°C	30 seg.	
72°C	30 seg.	
72°C	7min.	1 ciclo
4°C	∞	Final

3.9.3.3 Electroforesis en gel de Agarosa al 2%

Se observó el producto de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizaron 8 µL del producto amplificado y 2 µL de BlueJuice Gel Loading Buffer (*ThermoFisher Scientific – USA*). Los geles se revelaron con SYBR Gold 1x (*Invitrogen – USA*). La amplificación del exón 6 del gen *IDH1* y el exón 5 del gen *IDH2* se observaron como bandas de 560 y 471 respectivamente.

3.9.3.4 Secuenciación por Sanger

Para la secuenciación por Sanger, los productos de la amplificación de la PCR fueron remitidos a la compañía *Macrogen–Corea*, siguiendo sus indicaciones. Se secuenció el producto de la amplificación del exón 6 del gen *IDH1* con un tamaño de 560 pb, y el producto de la amplificación del exón 5 del gen *IDH2* con un tamaño de 471 pb. Se analizó la secuencia *Forward* (Fw) para el gen *IDH1* y la secuencia *Reverse* (Rv) para el gen *IDH2*.

Los cromatogramas fueron analizados mediante visualización de los picos y por el programa bioinformático *BioEdit* versión 7.2.5 (32/64-bit). Las secuencias completas

fueron alineadas con la secuencia silvestre para la búsqueda de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*.

3.9.4 Detección de las variantes en los genes en los genes *IDH1* e *IDH2* mediante curvas de *melting* de alta resolución o *High Resolution Melting* (HRM).

3.9.4.1 Ensayos de HRM

3.9.4.1.1 Diseño de cebadores para HRM y pruebas in silico

Se diseñaron 4 pares de cebadores, uno correspondiente a cada variante a analizar. Se utilizaron las herramientas informáticas *SnapGene Viewer* versión 5.1.3.1, *Primer3Plus*, *Primer-BLAST* y *OligoAnalyzer*. La secuencia de los cebadores se observan en la tabla 3. La localización de las variantes en los genes y el lugar de unión de los cebadores se grafican en la figura 3.2.

Las secuencias de los genes *IDH1* e *IDH2*, fueron obtenidas de la base de datos: *NCBI Reference Sequence: NG_023319.2* (76) y *NCBI Reference Sequence: NG_023302.1* (77). Se diseñaron los cebadores mediante los programas *SnapGene Viewer* versión 5.1.3.1 y *Primer3Plus*. Se utilizaron los programas *Primer-BLAST* y *OligoAnalyzer* para verificar las temperaturas de melting (T_m) obtenidas, el contenido de GC, la especificidad y complementariedad de los cebadores y la posible formación de horquillas con su valor de ΔG .

Tabla 5. Características de los cebadores diseñados para el ensayo de HRM,

Nombre	Secuencia 5'→3'	Longitud (en pb)	T_m (en °C)	Contenido de GC (en %)	Formación de horquillas	Formación de dímeros	Tamaño del amplión (pb)
<i>IDH1</i> G105 Fw	GCGTCAAATGTGCCACTATC	20	58,4	50	5	3	172
<i>IDH1</i> G105 Rv	GGTTTTACCCATCCACTCACA	21	59,4	47,62	3	0	
<i>IDH1</i> R132 Fw	GGCTTGTGAGTGGATGGGTAA	21	61,3	52,38	2	1	127

IDH1 R132 Rv	CAAGTTGGAAATTTCTGGGCCAT	23	61,1	43,48	8	3	179
IDH2 R140 Fw	TTGCTTGGGGTTCAAATTCT	20	54,3	40	4	2	
IDH2 R140 Rv	CTAGGCGTGGGATGTTTTTG	20	58,4	50	4	0	

Los datos presentados en la tabla se obtuvieron mediante las herramientas bioinformáticas *Primer-BLAST* y *OligoAnalyzer*.

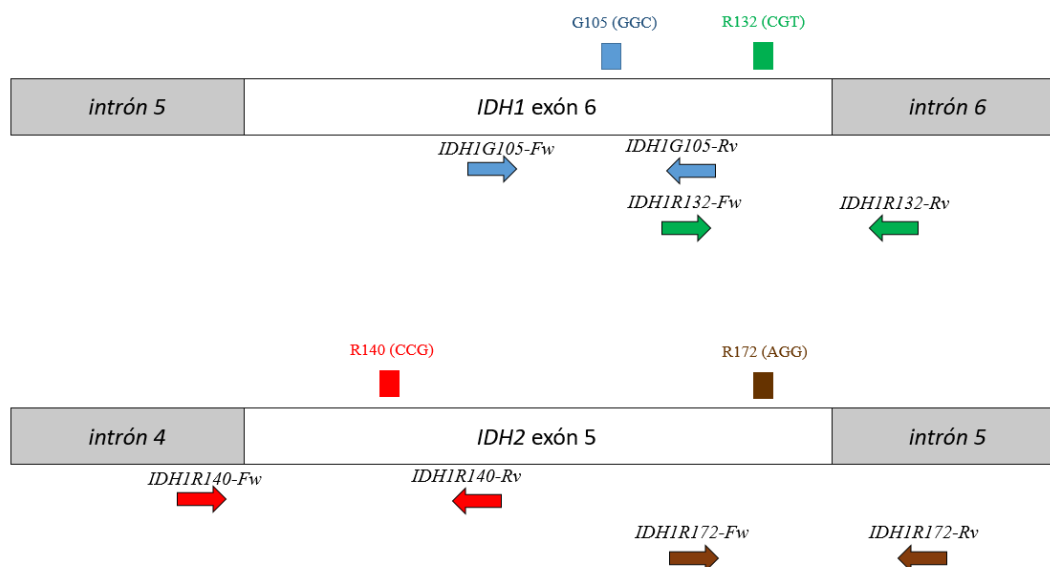


Figura 3.2. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes *IDH1* e *IDH2* y sitios de unión de los cebadores del HRM. El codón G105 está indicado como una caja azul, el codón R132 como una caja verde, el codón R140 como una caja roja y el codón R172 como una caja marrón. Se muestra también los lugares de unión de los cebadores *forward* (Fw) y *reverse* (Rv) para las variantes.

3.9.4.1.2 Ensayo de HRM para las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132* e *IDH2R140*

Se realizaron pruebas de HRM para la detección de las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132* e *IDH2R140*. Se utilizaron como controles positivos y controles negativos muestras de pacientes con resultados positivos y negativos por secuenciación. Se utilizó además controles no relacionados a LMA (pacientes que no presentaban diagnóstico clínico LMA). En todos los casos se utilizó también un blanco de reacción. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado. Los cebadores utilizados se observan en la tabla 5.

En el ensayo de HRM para la variante *IDH1G105* se analizaron 7 muestras: 1 muestra positiva por secuenciación para la variante y 6 muestras no relacionadas a la LMA.

En el ensayo de HRM para la variante *IDH1R132* se analizaron 7 muestras: 3 muestras positivas por secuenciación para la variante y 4 muestras no relacionadas a la LMA.

En el ensayo de HRM para la variante *IDH2R140* se analizaron 11 muestras: 3 muestras positivas por secuenciación para la variante, 3 muestras negativas por secuenciación para la variante y 5 muestras no relacionadas a la LMA.

Para la preparación de la master mix se utilizó un volumen final de 20 µL, como sigue: 10 µL de *Melt Doctor HRM Master Mix 2X (ThermoFisher-EUA)*; 0,4 µL de los cebadores *Fw* y *Rv* 5 µM (*MacroGen-Corea*); 8,2 µL de agua libre de DNAsas RNAsas (*Invitrogen-USA*) y 1 µL de DNA genómico 5 ng/µL. El ensayo se realizó en el equipo *Step One Plus Real Time PCR System* de *Applied Biosystem*. Las condiciones del ciclado se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante, basados en la master mix *Melt Doctor HRM*; que se describen en la tabla 6.

El análisis de los datos se realizó con el programa *High Resolution Melt Software v3.1*.

Tabla 6. Condiciones de ciclado para HRM.

Programación				
Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Velocidad de rampa
<i>Holding</i>	Activación de la enzima	95° C	10 min.	100%
Ciclos (45 ciclos)	Desnaturalización	95°C	15 seg.	100%
	Alineamiento/ Extensión	60 °C	1 min.	100%
Curva de <i>Melting</i> /Disociación	Desnaturalización	95°C	10 seg	100%
	Alineamiento	60°C	1 min	100%
	<i>High Resolution Melting</i>	95°C	15 seg	1%

3.9.4.2 Optimización del ensayo de HRM

Para la optimización del ensayo de HRM fueron diseñados nuevos cebadores y se realizó una PCR de enriquecimiento de mutantes mediante *COLD-PCR*.

3.9.4.2.1 Re-diseño de cebadores para HRM y pruebas in silico

Se diseñaron nuevos cebadores con la finalidad de obtener un amplificado de menor tamaño. La metodología utilizada fue descrita anteriormente en el punto 3.9.4.1.1. La secuencia se describe en la tabla 7 y la localización de las variantes y el lugar de unión de los cebadores se grafican en la figura 3.3.

Tabla 7. Características de los cebadores diseñados para el ensayo optimizado de HRM.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Longitud (en pb)	T _m (en °C)	Contenido de GC (en %)	Formación de horquillas	Formación de dímeros	Tamaño del amplión (pb)
IDH1 G105 Fw	GGAAATCACCAAATGGCACC A	21	59.38	47.62	4	4	88
IDH1 G105 Rv	ACAAGCCGGGGGATATTTT	19	56.67	47.37	4	1	
IDH1 R132 Fw	GGCTTGTGAGTGGATGGGTAA	21	60.00	52.38	2	1	90
IDH1 R132 Rv	GCAAAATCACATTATTGCCAA C	22	55.49	36.36	7	3	
IDH2 R140 Fw	TCAAGCTGAAGAAGATGTGG AA	22	57.64	40.91	4	0	93
IDH2 R140 Rv	TGTTTTTGCAGATGATGGGCT C	22	59.77	45.45	4	2	

Los datos presentados en la tabla se obtuvieron mediante las herramientas bioinformáticas *Primer-BLAST* y *OligoAnalyzer*.

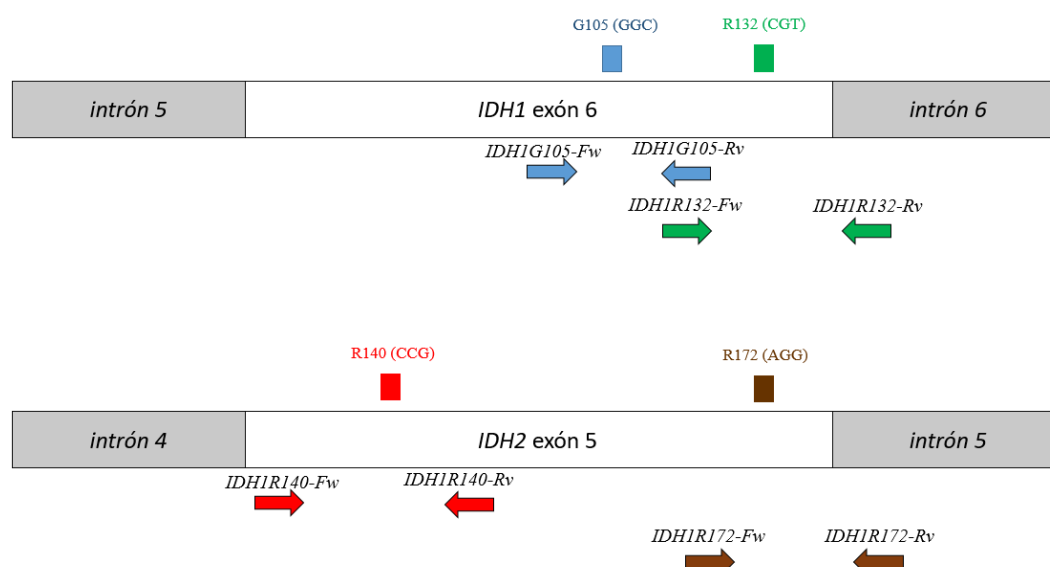


Figura 3.3. Localización de los codones G105, R132, R140 y R172 en los genes *IDH1* e *IDH2* y sitios de unión de los cebadores del HRM optimizado. El codón G105 está indicado como una caja azul, el codón R132 como una caja verde, el codón R140 como una caja roja y el codón R172 como una caja marrón. Se grafican los sitios de unión de los primers *forward* (Fw) y *reverse* (Rv) para variante.

3.9.4.2.2 PCR de enriquecimiento de mutantes o *COLD-PCR*

La PCR de enriquecimiento de mutantes consiste en la amplificación preferencial de los alelos minoritarios presentes en una muestra que contiene una mezcla de secuencias mutadas y secuencias silvestres. La amplificación preferencial se produce debido al uso de la temperatura crítica (T_c), que se define como la temperatura más baja a la cual se observa amplificación de las muestras positivas para la presencia de la variante (controles positivos), y no amplificación de las muestras que contengan sólo el alelo salvaje (controles negativos) (69).

Para encontrar la T_c , se identificó la T_m de cada producto de PCR. Posteriormente se utilizaron temperaturas de desnaturalización inferiores a la T_m encontrada en pasos sucesivos de $-0,5^\circ\text{C}$, hasta alcanzar una temperatura lo suficientemente baja como para que no se produzca más amplificación en la PCR. Para hallar la T_c de cada variante se utilizaron los cebadores citados en la tabla 7.

Las condiciones utilizadas para la definición de la T_c fueron: la preparación de la

master mix se realizó como sigue: 5 µL de 5X PCR Buffer minus Mg (*PROMEGA*); 0,5 µL dNTPs 10 mM (*Invitrogen-EUA*); 1,5 µL MgCl₂ 25 mM (*PROMEGA*); 0,75 µL de los cebadores Fw y Rv 10 µM (*Macrogen-Corea*); 0,125 µL de GoTaq DNA Polymerase (5U/µL) (*PROMEGA*); 15,38 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas (*Invitrogen –USA*) y 1 µL de DNA genómico 100 ng/µL. Las condiciones de ciclado de PCR se configuraron de acuerdo a lo recomendado por Li y cols para una Fast-COLD-PCR (78), y estas condiciones se citan en las siguientes tablas 8, 9 y 10.

Tabla 8. Condiciones de ciclado para *IDH1G105*

Condiciones de ciclado para <i>IDH1G105</i>		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min.	1 ciclo
55°C	30 seg	1 ciclo
72°C	1 min	1 ciclo
79,5-77°C	10 seg.	30 ciclos
55°C	30 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5min.	1 ciclo
4°C	∞	Final

Tabla 9. Condiciones de ciclado para *IDH2R140*

Condiciones de ciclado para <i>IDH2R140</i>		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min.	1 ciclo
55°C	30 seg	1 ciclo
72°C	1 min	1 ciclo
83-80,5°C	10 seg.	30 ciclos
55°C	30 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5min.	1 ciclo
4°C	∞	Final

Tabla 10. Condiciones de ciclado para *IDH1R132*

Condiciones de ciclado para <i>IDH1R132</i>		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min.	1 ciclo
55°C	30 seg	1 ciclo
72°C	1 min	1 ciclo
76,5-71°C	10 seg.	30 ciclos
55°C	30 seg.	
72°C	1 min.	
72°C	5min.	1 ciclo
4°C	∞	Final

3.9.4.2.3 Ensayo de HRM optimizado para *IDH1G105* e *IDH2R140*

El ensayo de HRM se optimizó para la detección de las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140* en las 50 muestras estudiadas. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Los cebadores utilizados en estos ensayos de HRM son los citados en la tabla 7.

La preparación de la master mix se realizó como sigue: 10 µL de *Melt Doctor* HRM Master Mix 2X (*ThermoFisher-EUA*); 0,4 µL de los cebadores *Fw* y *Rv* 5 µM (*Macrogen-Corea*); 8,2 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas (*Invitrogen – USA*) y 1 µL de DNA genómico 5 ng/µL. Las condiciones de ciclado para las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140* se citan en las tablas 11 y 12.

El análisis de los datos se realizó con el programa *High Resolution Melt Software v3.1*.

Tabla 11. Condiciones de ciclado de HRM para la detección de *IDH1G105*

Programación				
Etapas	Paso	Temperatura	Tiempo	Velocidad de rampa
<i>Holding</i>	Activación de la enzima	95° C	10 min.	100%
Ciclos (20 ciclos)	Desnaturalización	95°C	15 seg.	100%
	Alineamiento/Extensión	60 °C	1 min.	100%
Ciclos (35 ciclos)	Desnaturalización con Tc	78,5°C	15 seg.	100%
	Alineamiento/Extensión	60 °C	1 min.	100%
Curva de <i>Melting</i> /Disociación	Desnaturalización	95°C	10 seg	100%
	Alineamiento	60°C	1 min	100%
	<i>High Resolution Melting</i>	95°C	15 seg	1%

Tabla 12. Condiciones de ciclado de HRM para la detección de *IDH2R140*

Programación				
Etapas	Paso	Temperatura	Tiempo	Velocidad de rampa
<i>Holding</i>	Activación de la enzima	95° C	10 min.	100%
Ciclos (20 ciclos)	Desnaturalización	95°C	15 seg.	100%
	Alineamiento/Extensión	60 °C	1 min.	100%

Ciclos (35 ciclos)	Desnaturalización con Tc	81°C	15 seg.	100%
	Alineamiento/Extensión	60 °C	1 min.	100%
Curva de <i>Melting</i> /Disociación	Desnaturalización	95°C	10 seg	100%
	Alineamiento	60°C	1 min	100%
	<i>High Resolution Melting</i>	95°C	15 eg	1%

3.9.4.2.4 Comparación de la detección de las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140* por secuenciación por Sanger y HRM

Los resultados obtenidos en la Secuenciación por Sanger y el HRM fueron comparados para la detección de las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140*.

3.10 Descripción de la co-ocurrencia de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* con otras mutaciones y re-arreglos génicos presentes en la LMA.

Para estudiar la co-ocurrencia de mutaciones en la población estudiada, fueron utilizados los datos de mutaciones en los genes *NPM1* y *FLT3-ITD* y de los re-arreglos de fusión *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* previamente analizados en el Laboratorio de Genética Molecular del IICS-UNA.

Las mutaciones en el gen *NPM1*, fueron analizados mediante la técnica PCR en tiempo real, siguiendo el protocolo descrito por Gorello y cols (79). Esta técnica permite la identificación de 3 variantes la A, B y D que consisten en inserciones de 4 nucleótidos en las posiciones 956 (Mutante A) y 959 (Mutante B y D) en el exón 12 del gen *NPM1* (79).

Para el estudio de la mutación *FLT3-ITD*, que consiste en duplicaciones en tándem, se utilizó la técnica PCR convencional con análisis en gel de agarosa al 3,5% (80).

Los re-arreglos de fusión *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* fueron analizados mediante la técnica de nested-PCR descrita por Van Dongen y cols (81).

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

Durante el periodo del 2012 al 2020 se recolectaron 50 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LMA.

4.1 Características demográficas de los pacientes en estudio

El 42% (21/50) de los pacientes incluidos en el presente estudio procedieron del Hospital Central Dr. Emilio Cubas del Instituto de Previsión Social (IPS), el 54% (27/50) del Departamento de Hematología Adultos del Hospital de Clínicas (HC) de la Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional de Asunción (FCM-UNA) y el 4% (2/50) de otros centros médicos.

En relación al sexo, el 54% (27/50) de los pacientes fueron del sexo masculino y el 46% (23/50) del sexo femenino. La relación hombre/mujer fue de 1,17/1. La mediana de la edad de los pacientes fue de 57 años (rango de 18 a 85 años). No se observó diferencia significativa en la mediana de edad entre hombres y mujeres, siendo 57 años (18-85) y 57 años (21 a 78 años) respectivamente.

4.2 Características clínicas al momento del diagnóstico.

Las características clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico.

Características clínicas n=24	Mediana (rango)
Recuento de glóbulos blancos ($\times 10^9/L$)	25,2 (0,31-175,2)
Recuento de plaquetas ($\times 10^9/L$)	50 (10-224)
Hemoglobina, g/dL	8 (4-13)
Blastos en médula ósea (%)	80 (40-100)

4.3 Detección de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*.

4.3.1 Detección de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* por la metodología de secuenciación por Sanger

En el presente estudio fueron analizadas 50 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LMA, por la metodología de Secuenciación por Sanger (*Macrogen – Corea*). Se detectó la presencia de variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en el 30% (15/50) de las muestras estudiadas. El 12% (6/50) para el gen *IDH1* y 18% (9/50) para el gen *IDH2*. Se observó una co-ocurrencia entre las variantes *IDH1G105* e *IDH1R132* del gen *IDH1* en una muestra, correspondiente al 2% (1/50) (tabla 14).

Tabla 14. Resultados de Secuenciación por Sanger de los pacientes en estudio.

Paciente	SEXO	EDAD	Variantes en IDH1		Variantes en IDH2	
			Secuenciación IDH1G105	Secuenciación IDH1R132	Secuenciación IDH2R140	Secuenciación IDH2R172
1	F	77	WT	WT	WT	WT
2	M	50	WT	WT	WT	WT
3	M	18	WT	WT	WT	WT
4	F	64	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
5	M	27	WT	WT	CCG>CAG (R140L)	WT
6	F	55	WT	WT	WT	WT
7	F	73	WT	CGT>TGT (R132C)	WT	WT
8	M	48	WT	WT	WT	WT
9	M	68	WT	WT	WT	WT
10	F	46	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
11	M	64	WT	WT	WT	WT
12	M	SD	WT	WT	WT	WT
13	F	59	WT	WT	WT	WT
14	M	57	WT	WT	WT	WT
15	M	61	WT	WT	CCG>CAG (R140L)	WT
16	M	85	WT	WT	WT	WT
17	M	43	WT	CGT>CAT (R132H)	WT	WT
18	F	68	WT	WT	WT	WT
19	F	SD	WT	WT	WT	WT
20	F	46	WT	WT	WT	WT
21	M	57	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
22	F	28	SNP rs 11554137	CGT>CAT (R132H)	WT	WT
23	F	21	WT	WT	WT	WT
24	M	62	SNP rs 11554137	WT	WT	WT
25	F	67	WT	CGT>AGT (R132S)	WT	WT
26	M	36	WT	WT	WT	WT
27	F	57	WT	WT	WT	WT
28	M	58	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
29	M	57	WT	WT	WT	WT
30	F	27	WT	WT	WT	WT
31	M	33	WT	WT	WT	WT
32	M	84	WT	WT	WT	WT
33	F	SD	WT	WT	WT	WT
34	F	SD	WT	WT	WT	WT
35	F	63	WT	WT	WT	WT
36	F	50	WT	WT	WT	WT
37	M	60	WT	CGT>GGT (R132G)	WT	WT
38	M	19	WT	WT	WT	WT
39	M	26	WT	WT	WT	WT
40	F	41	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
41	F	47	WT	WT	WT	WT
42	F	47	WT	WT	WT	WT
43	F	78	WT	WT	WT	WT
44	M	71	WT	WT	WT	WT
45	M	47	WT	WT	WT	WT
46	F	71	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT
47	M	61	WT	WT	WT	WT
48	M	80	WT	WT	WT	WT
49	M	66	WT	WT	WT	WT
50	M	77	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT

SD: Sin Datos

4.3.1.1 Detección de la variante *IDH1G105*

En el 4% (2/50) de los pacientes estudiados se observó una variante sinónima en el codón 105 del gen *IDH1* (*IDH1G105*), que consistió en el cambio de una citosina por una timina en la posición 22607 del gen *IDH1* ([GGC]>[GGT]), denominada SNP rs11554137 (82). En ambos pacientes en donde se observó esta variante se puede inferir, por el electroferograma, que la variante se encuentra en heterocigosis (Fig. 4.1).

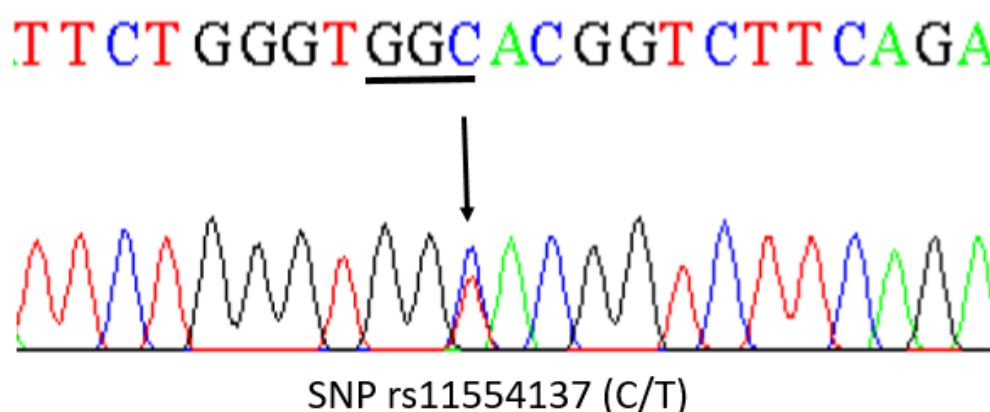


Figura 4.1. Electroferograma de la detección de la variante *IDH1G105*. El codón de la *IDH1G105* en el que ocurre un cambio de C>T, sin cambio en el aminoácido. SNP= Polimorfismo de un solo nucleótido. A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina.

4.3.1.2 Detección de la variante *IDH1R132*

En el 10% (5/50) de los pacientes estudiados se detectó las variantes *IDH1R132*. Dos pacientes presentaron la conversión de CGT>CAT, que resultó en la sustitución de la arginina por histidina (R132H); un paciente presentó la conversión CGT>TGT, resultando en la sustitución de arginina por cisteína (R132C); otro paciente presentó la conversión CGT>AGT, resultando en la sustitución de arginina por serina (R132S) y otro paciente presentó la conversión CGT>GGT, resultando en la sustitución de arginina por glicina (R132G) (Fig. 4.2). Las variantes detectadas consistieron en mutaciones heterocigotas como es posible observar en la figura 4.2, presentando en todos los casos el alelo silvestre y el alelo correspondiente a la mutación. Otras variantes reportadas R132P y R132L no fueron detectadas.

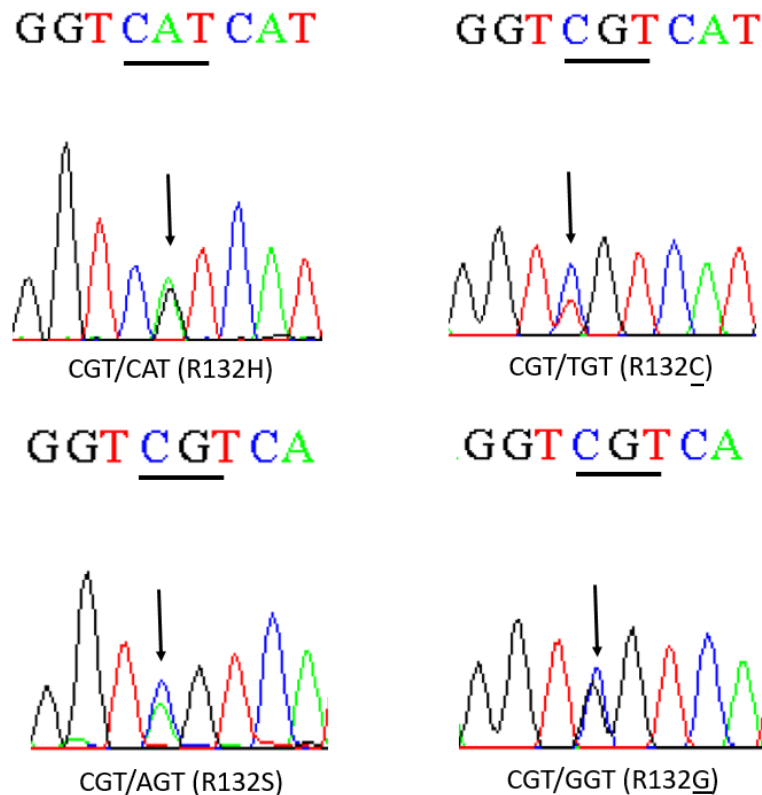


Figura 4.2. Electroferograma de la detección de las variantes *IDH1R132*. Se detectaron 4 cambios para la variante *IDH1R132*: el cambio R132H, CGT a CAT; el cambio R132C, CGT a TGT; el cambio R132S, CGT a AGT y el cambio R132G, CGT a GGT. A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, T=Timina, R=Arginina, H=Histidina, C=Cisteína, S=Serina y G=Glicina.

4.3.1.3 Detección de la variante *IDH2R140*

En el 18% (9/50) de los pacientes estudiados se detectó la variante *IDH2R140*. Se analizaron las secuencias *reverse* del gen *IDH2*. Siete pacientes presentaron la conversión de CCG>CTG, que resultó en la sustitución de la arginina por glutamina (R140Q) y dos pacientes presentaron la conversión CCG>CAG, resultando en la sustitución de arginina por leucina (R140L) (Fig. 4.3).

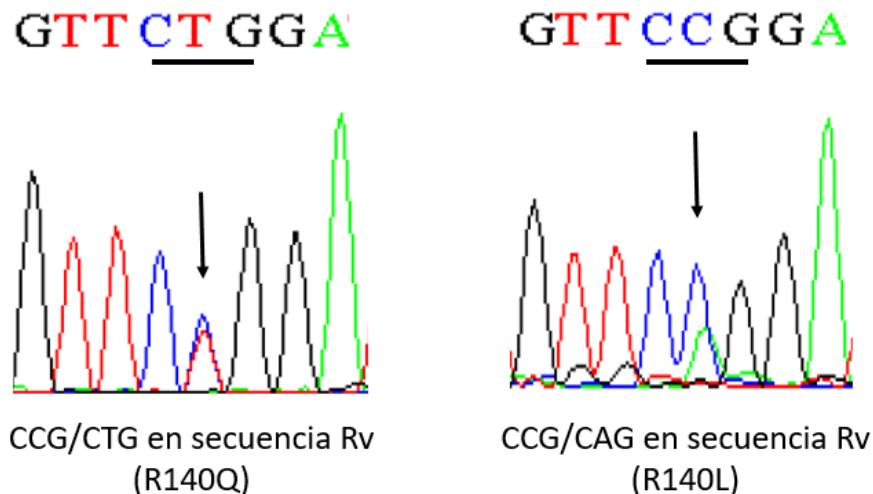


Figura 4.3. Electroferograma de la detección de las variantes *IDH2R140*. La arginina del codón 140 del gen *IDH2* corresponde a CCG en la secuencia Fw, y a CCG en la secuencia Rv. El codón de la variante se encuentra subrayado y la variante se indica con una flecha. El cambio de nucleótido y aminoácido en cada caso se menciona debajo de cada imagen. Se detectaron 2 cambios para la variante *IDH2R140*: el cambio R140Q, CCG a CTG en la secuencia *reverse* y el cambio R140L, CCG a CAG en la secuencia **reverse**. A=Adenina, C=Citosina, G=Guanina, T=Timina, R=Arginina, Q=Glutamina y L=Leucina.

4.3.1.4 Variante *IDH2R172*

La variante *IDH2R172* no fue detectada en la población estudiada.

4.3.2 Detección de las variantes *IDH1* e *IDH2* por la metodología HRM.

Para la implementación y estandarización de la detección de las variantes por la técnica de HRM se realizaron pruebas para las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132* e *IDH2R140*. Se realizó una amplificación por PCR en tiempo real de los fragmentos pertenecientes al exón 6 del gen *IDH1* y al exón 5 del gen *IDH2*; luego se llevó a cabo el análisis de HRM. Para el primer ensayo de prueba de HRM se utilizaron los cebadores citados en tabla 5.

El análisis post-PCR se realizó en un rango de temperatura de 60°C a 95°C para exón 6 del *IDH1* y el exón 5 del *IDH2*. Se normalizaron las lecturas de fluorescencia y el análisis de las curvas de melting se llevó a cabo mediante el software *High Resolution*

Melt Software v3.1. Se establecieron valores uniformes de fluorescencia al inicio (pre-melting) y al final (post-melting). En el análisis se generó un gráfico (*Aligned Melt Curve*) donde las muestras quedan agrupadas en función de sus curvas de melting.

Para la detección de la variante *IDH1G105*, fueron analizadas 7 muestras. Se analizó 1 control positivo heterocigoto estudiado por secuenciación y 6 muestras no relacionadas a LMA que no fueron secuenciadas. Los resultados se presentan en la tabla 15. Se observó el agrupamiento de las curvas de *melting* en 3 grupos. El grupo 1 y 3, que corresponde a las curvas en color rojo y verde respectivamente (fig. 4.4), son las muestras no relacionados que se clasificaron en dos variantes, la variante 1 y la variante V3 (V1 y V3). En control positivo fue agrupado en la variante V2, curva de color azul. Este control fue identificado en la secuenciación por Sanger como el SNP rs11554137, y se presentó en heterocigosis para la variante *IDH1G105* (Fig. 4.4).

Los resultados de este ensayo para la variante *IDH1G105* se presentan en la tabla 16.

Tabla 15. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante *IDH1G105*.

N° de muestra	Paciente	Tipo .de control	Variante obtenida por HRM	Temperatura de melting (°C)
1	Paciente 24	Control positivo: SNP rs11554137: (C>T) (heterocigosis)	V2	Tm=79,1°C
2	Paciente NR 2	Control no relacionado a LMA	V1	Tm=79,5°C
3	Paciente NR 4	Control no relacionado a LMA	V1	Tm=79,5°C
4	Paciente NR 7	Control no relacionado a LMA	V1	Tm=79,5°C
5	Paciente NR 1	Control no relacionado a LMA	V3	Tm=79,3°C
6	Paciente NR 3	Control no relacionado a LMA	V3	Tm=79,3°C
7	Paciente NR 6	Control no relacionado a LMA	V3	Tm=79,3°C

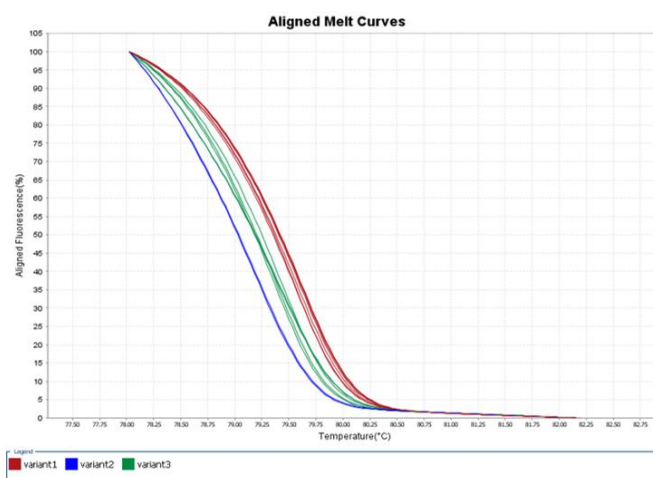


Figura 4.4. Curvas de *melting* normalizadas de la variante *IDH1G105*. Se observan las curvas de *melting*, clasificadas en 3 variantes para la variante *IDH1G105*. La variante V1 corresponde a la curva color roja, la variante V2 corresponde a la curva color azul y la variante V3 corresponde a la curva color verde.

Tabla 16. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante *IDH1G105*.

Variante obtenida por HRM	Temperatura de <i>melting</i> (Tm)	Muestras (N=7)
V1	79,5 °C	42,8% (3/7)
V2	79,1 °C	14,3% (1/7)
V3	79,3°C	42,8% (3/7)

Para la detección de la variante *IDH1R132*, fueron analizadas 7 muestras. Se analizaron 3 controles positivos heterocigotos estudiados por secuenciación y 4 muestras no relacionadas a LMA que no fueron secuenciadas. Los resultados se presentan en la tabla 17. Se observó el agrupamiento de las curvas de *melting* en 2 grupos. El grupo 1, que corresponde a las curvas en color rojo (fig. 4.5), son las muestras no relacionadas que se clasificaron en la variante V1. Los controles positivos fueron agrupados en la variante V2, curva de color azul. Estos controles fueron identificados en la secuenciación por Sanger como variantes heterocigotas para *IDH1R132* (Fig. 4.5).

Los resultados de este ensayo para la variante *IDH1G105* se presentan en la tabla 18.

Tabla 17. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante *IDH1R132*.

N° de muestra	Paciente	Tipo de control	Variante obtenida por HRM	Temperatura de melting (°C)
1	Paciente 7	Control positivo: R132C: (CGT>TGT) (heterocigosis)	V2	Tm=75,9°C
2	Paciente 17	Control positivo: R132H: (CGT>CAT) (heterocigosis)	V2	Tm=75,9°C
3	Paciente 37	Control positivo: R132G: (CGT>GGT) (heterocigosis)	V2	Tm=76,0°C
4	Paciente NR 1	Control no relacionado a LMA	V1	Tm= 79,5°C
5	Paciente NR 2	Control no relacionado a LMA	V1	Tm= 79,5°C
6	Paciente NR 6	Control no relacionado a LMA	V1	Tm= 79,5°C
7	Paciente NR 7	Control no relacionado a LMA	V1	Tm= 79,5°C

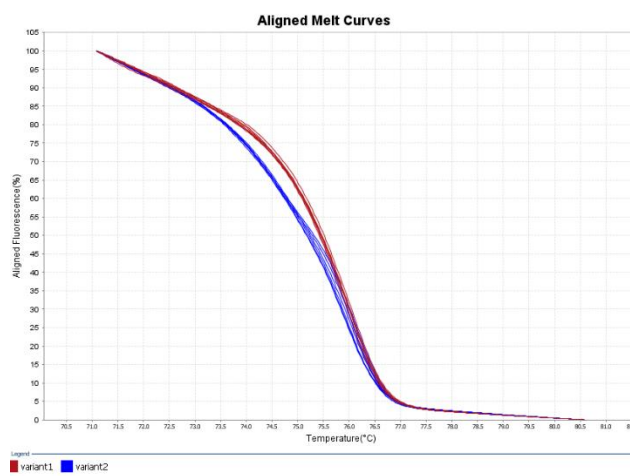


Figura 4.5. Curvas de *melting* normalizadas de la variante *IDH1R132*. Se observan las curvas de *melting*, clasificadas en 2 variantes para la variante *IDH1R132*. La variante V1 corresponde a la curva color roja y la variante V2 corresponde a la curva color azul.

Tabla 18. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante *IDH1R132*.

Variante obtenida por HRM	Temperatura de <i>melting</i> (Tm)	Muestras (N=7)
V1	79,5 °C	42,8% (3/7)
V2	75,9-76,0 °C	57,1% (4/7)

Para la detección de la variante *IDH2R140*, fueron analizadas 11 muestras. Se analizaron 3 controles positivos heterocigotos estudiados por secuenciación, 3

controles negativos estudiados por secuenciación y 5 muestras no relacionadas a LMA que no fueron secuenciadas. Los resultados se presentan en la tabla 19. Se observó el agrupamiento de las curvas de *melting* en 3 grupos. Las muestras clasificadas como variante V1 son las curvas en color rojo (fig. 4.6), y se corresponde a las muestras identificadas con alelo salvaje por secuenciación por Sanger y a una muestra no relacionada a la LMA. La variante V2, que son las curvas en color azul (fig. 4.6), se corresponde a 4 de las 5 muestras no relacionadas a la LMA. Los controles positivos fueron agrupados en la variante V3, curva de color verde. Estos controles fueron identificados en la secuenciación por Sanger como variantes heterocigotas para *IDH2R140* (Fig. 4.6).

Los resultados de este ensayo para la variante *IDH1G105* se presentan en la tabla 20.

Tabla 19. Datos y resultados obtenidos en el ensayo de prueba de HRM para la variante *IDH2R140*.

N° de muestra	Paciente	Tipo de control	Variante obtenida por HRM	Temperatura de melting (°C)
1	Paciente 4	Control Positivo: R140Q: (CGG>CAG) (heterocigosis)	V3	Tm= 81,9 °C
2	Paciente 15	Control Positivo: R140L: (CGG>CTG) (heterocigosis)	V3	Tm= 81,8 °C
3	Paciente 28	Control Positivo: R140Q: (CGG>CAG) (heterocigosis)	V3	Tm= 81,8 °C
4	Paciente 9	Control negativo	V1	Tm= 82,0°C
5	Paciente17	Control negativo	V1	Tm= 82,0°C
6	Paciente 38	Control negativo	V1	Tm= 82,0°C
7	Paciente NR 1	Control no relacionado a LMA	V1	Tm= 82,0°C
8	Paciente NR 2	Control no relacionado a LMA	V2	Tm= 81,8°C
9	Paciente NR 3	Control no relacionado a LMA	V2	Tm= 81,8°C
10	Paciente NR 4	Control no relacionado a LMA	V2	Tm= 81,8°C
11	Paciente NR 5	Control no relacionado a LMA	V2	Tm= 81,8°C

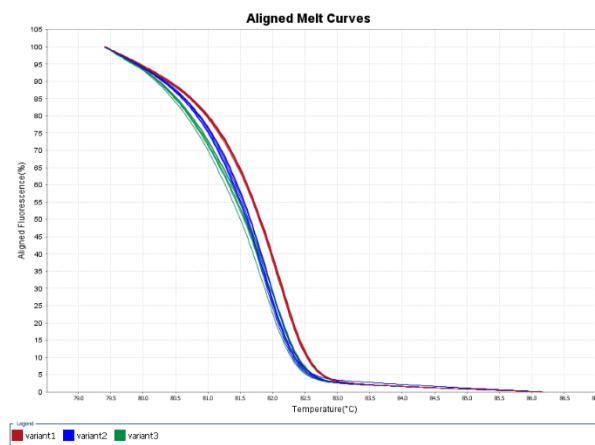


Figura 4.6. Curvas de *melting* normalizadas de la variante *IDH2R140*. Se observan las curvas de *melting*, clasificadas en 3 variantes para la variante *IDH2R140*. La variante V1 corresponde a la curva color roja, la variante V2 corresponde a la curva color azul y la variante V3 corresponde a la curva color verde.

Tabla 20. Resultados en porcentaje del ensayo de HRM para la variante *IDH2R140*.

Variante obtenida por HRM	Temperatura de <i>melting</i> (T _m)	Muestras (N=11)
V1	82,0 °C	36,4% (4/11)
V2	81,8 °C	36,4% (4/11)
V3	81,8-81,9°C	27,3% (3/11)

4.3.3 Optimización del ensayo de HRM

La optimización del ensayo de HRM consistió en: a) el diseño de nuevos cebadores a fin de obtener fragmentos más cortos que pudieran ser mejor analizados en el HRM y b) la aplicación de una PCR de enriquecimiento de mutantes o Fast-COLD-PCR.

La optimización del ensayo se aplicó únicamente a las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140*. La variante *IDH1R132* no fue estudiada debido a que no se obtuvo amplificación con los cebadores diseñados para la optimización del HRM. La variante *IDH2R172* tampoco fue estudiada debido a que esta variante no fue identificada por secuenciación por lo que no podía utilizarse como control positivo.

Para la realización de la Fast-COLD-PCR se llevó a cabo la búsqueda de la temperatura crítica (T_c) para cada variante mediante el uso de diferentes temperaturas de

desnaturalización. Para definir la Tc de la variante *IDH1G105* se utilizó un rango de temperatura que abarcaba de 79,5 a 77°C. A la temperatura de 78,5°C, se observó amplificación únicamente en el control positivo, por lo que se fijó ésta temperatura como la Tc para *IDH1G105* (Fig. 4.7).

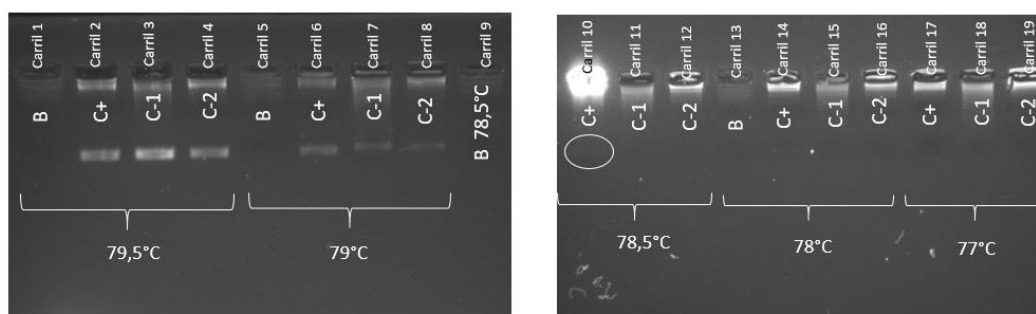


Figura 4.7. Tc para la variante *IDH1G105*. Se probaron diferentes temperaturas de desnaturalización para obtener la menor temperatura a la cual amplificaban los controles positivos y no los controles negativos. Se estudió un rango de temperatura que abarcaba de 79,5 a 77°C. Se fijó como Tc para *IDH1G105* una temperatura de 78,5°C. Carriles 1, 5, 9 y 13: Blancos de reacción. Carriles 2, 6, 10, 14 y 17: controles positivos (muestras de pacientes que presentaban la variante *IDH1G105*). Carriles 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 18 y 19: controles negativos (muestras de pacientes que presentaban secuencia silvestre o *wild type* según secuenciación por Sanger).

Para definir la Tc de la variante *IDH2R140* se estudió un rango de temperatura que abarcaba de 83 a 80,5°C. A la temperatura de 81°C, se observó amplificación sólo en los controles positivos, por lo que se consideró a ésta temperatura como la Tc para *IDH2R140* (Fig. 4.8).

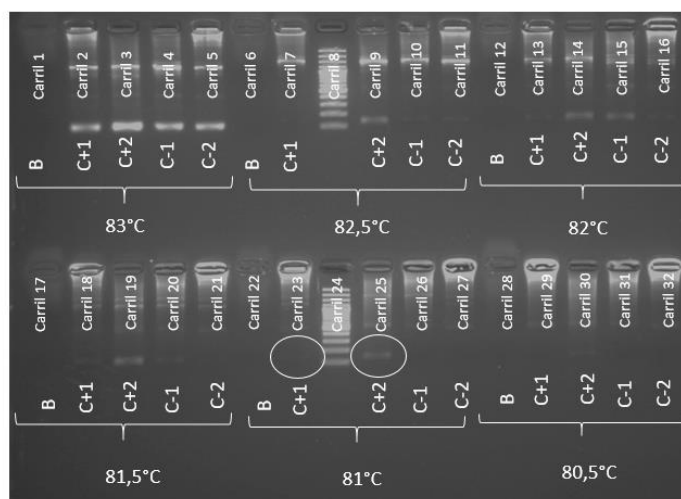


Figura 4.8. Tc para la variante *IDH2R140*. Estudio de diferentes temperaturas de desnaturalización para definir la Tc. Se consideró como Tc para *IDH2R140* una temperatura de 81°C. Carriles 1, 6, 12, 17, 22 y 28: Blancos de reacción. Carriles 2, 3, 7, 9, 13, 14, 18, 19, 23, 25, 29, 30: controles positivos

(muestras de pacientes que presentaban la variante *IDH2R140*). Carriles 4, 5, 10, 11, 15, 16, 20, 21, 26, 27, 30, 31: controles negativos (muestras de pacientes que presentaban secuencia silvestre o *wild type* según secuenciación por Sanger). Carriles 8 y 24: Marcador de peso molecular.

4.3.3.1 PCR de enriquecimiento y HRM

En la optimización del HRM, se analizó el 100% (50/50) de las muestras tanto para *IDH1G105* como para *IDH2R140*.

4.3.3.1.1 Estudio de la variante *IDH1G105*

En el ensayo de HRM, el análisis de las curvas de *melting* agrupó las muestras en dos grupos (fig. 4.9). El 96% (48/50) de las muestras estudiadas fueron clasificadas como V1 y el 4% (2/50) como V2 (tabla 21). El grupo de muestras que pertenecen a la variante V1 (en rojo figura 4.9) correspondieron a muestras que fueron identificadas como el alelo salvaje por secuenciamiento de Sanger. El grupo de muestras que pertenecen a la variante V2 (en azul figura 4.9) correspondieron a muestras que por el secuenciamiento de Sanger fueron identificadas como las variantes heterocigotas para *IDH1G105* o positivas para la presencia del SNP rs11554137 (Fig. 4.9).

Tabla 21. Resultados del HRM para la variante *IDH1G105*.

Variante obtenida por HRM	Temperatura de <i>melting</i> (T _m)	Muestras (N=50)
V1	77,3 – 77,8 °C	48 (96%)
V2	77,2 °C	2 (4%)

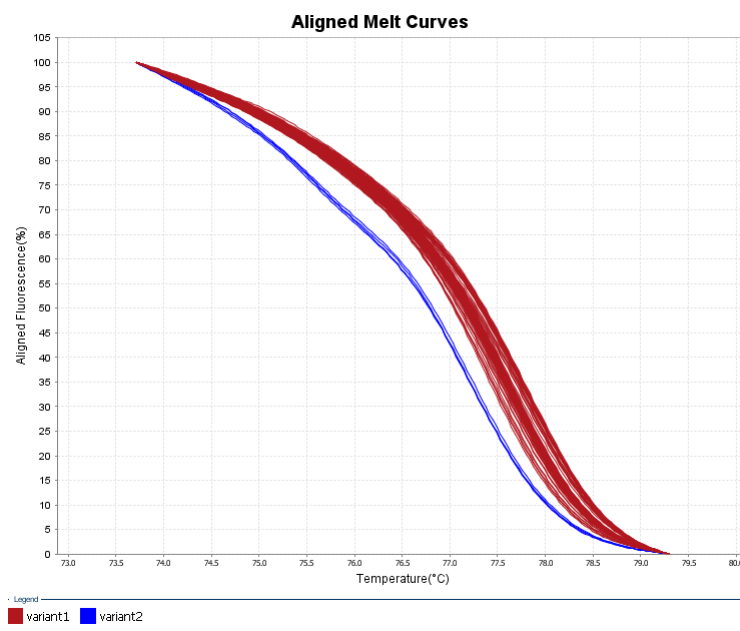


Figura 4.9. Curvas de *melting* normalizadas para la variante *IDH1G105* en el ensayo de HRM optimizado. Se observan las curvas de disociación, clasificadas en 2 variantes para la variante *IDH1G105*. La variante V1 corresponde a la curva color roja y la variante V2 corresponde a la curva color azul.

4.3.3.1.2 Estudio de la variante *IDH2R140*

En el ensayo del HRM, el análisis de las curvas de *melting* clasificó a las muestras en tres grupos. El 22% (11/50) se clasificó como V1, el 72% (36/50) como V2 y el 6% (3/50) como V3 (tabla 22 y fig.4.10). La muestras que clasificaron como V1 fueron identificadas por secuenciación por Sanger como: 6 muestras con el alelo correspondiente al cambio R140Q (CGG>CAG), 1 muestra con el alelo correspondiente al cambio R140L (CGG>CTG) y 4 muestras con el alelo salvaje (CGG). En la variante V2 se clasificaron 36 muestras, que por secuenciación por Sanger fueron identificadas como: 1 muestra con el alelo R140L (CGG>CTG) y 35 muestras con el alelo salvaje. En variante V3 se clasificaron 3 muestras que por secuenciación por Sanger fueron identificadas como: 1 muestra con el alelo correspondiente al cambio R140Q (CGG>CAG) y 2 muestras con el alelo salvaje. El gráfico del HRM se puede observar en la figura 4.10.

Tabla 22. Resultados del HRM para la variante *IDH2R140*.

Variante obtenida por HRM	Temperatura de <i>melting</i> (T _m)	Muestras (N=50)
V1	78,8 – 79,1 °C	11 (22%)
V2	79,0 – 79,6 °C	36 (72%)
V3	78,6 – 78,7 °C	3 (6%)

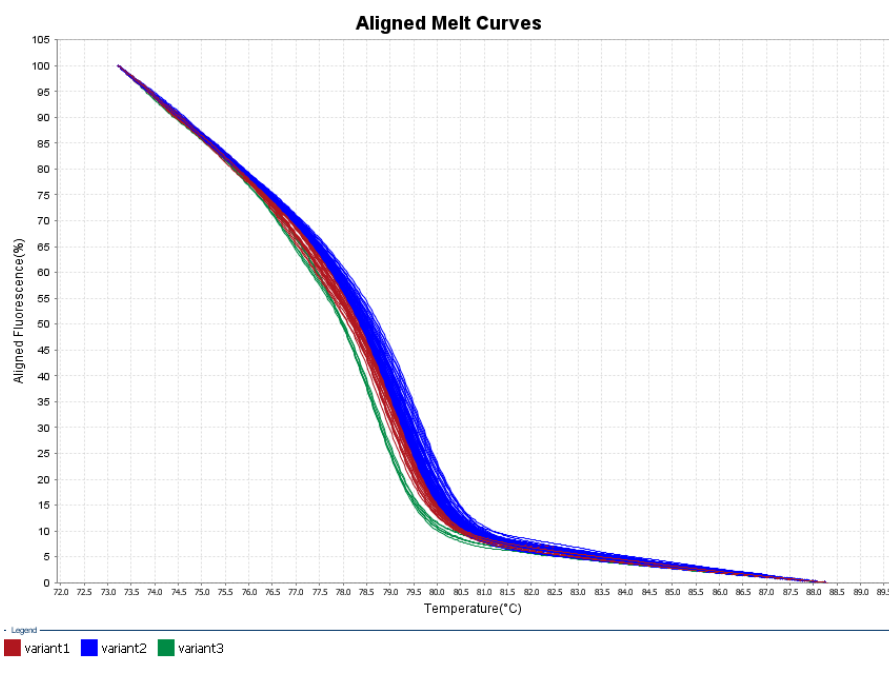


Figura 4.10. Curvas de *melting* normalizadas para la variante *IDH2R140* en el ensayo de HRM optimizado. Se observan las curvas de disociación, clasificadas en 3 variantes para la variante *IDH2R140*. La variante V1 corresponde a la curva color roja, la variante V2 corresponde a la curva color azul y la variante V3 corresponde a la curva color verde.

4.4 Comparación de la detección de las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140* por secuenciación por Sanger y HRM.

Al evaluar los resultados obtenidos para la detección de las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140* por los dos métodos utilizados se observó que en la detección de la variante *IDH1G105*, las muestras positivas en la secuenciación se clasificaban en un único grupo en el ensayo de HRM (tabla 23). Sin embargo, para la detección de la variante *IDH2R140*, las muestras positivas por secuenciación para las variantes R140Q (CGG>CAG), R140L (CGG>CTG) y las muestras con el alelo salvaje (CGG) se clasificaban en diferentes grupos (tabla 24). La variante R140Q se agrupaba como V1

y V3, la variante R140L se agrupaba como V1 y V2 y el alelo salvaje agrupaba en los 3 grupos, V1, V2 y V3.

Tabla 23. Resultados de secuenciación y HRM para la variante *IDH1G105*.

Variante obtenida por HRM	N° de muestras total (HRM)	Variante obtenida por secuenciación	N° de muestras (por secuenciación)	Cambio
V1	48	Alelo salvaje	48	GGC
V2	2	SNP rs11554137	2	GGC>GGT

Tabla 24. Resultados de secuenciación y HRM para la variante *IDH2R140*.

Variante obtenida por HRM	N° de muestras total (HRM)	Variante obtenida por secuenciación	N° de muestras (por secuenciación)	Cambio
V1	11	R140Q	6	CGG>CAG
		R140L	1	CGG>CTG
		Alelo salvaje	4	CGG
V2	36	R140L	1	CGG>CTG
		Alelo salvaje	35	CGG
V3	3	R140Q	1	CGG>CAG
		Alelo salvaje	2	CGG

4.5 Frecuencia y co-ocurrencia de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* con otras mutaciones y/o re-arreglos de fusión

Se estudió la co-ocurrencia de las variantes descritas en los genes *IDH1* e *IDH2* con mutaciones en los genes *NPM1*, *FLT3* y re-arreglos génicos *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* previamente estudiados en el Laboratorio de Genética Molecular.

4.5.1 Co-ocurrencia con mutaciones en el gen *NPM1*

En el presente estudio, 33/50 (66%) muestras de pacientes eran positivas para mutaciones en el gen *NPM1*. Se observó que 14/15 (93%) de las muestras que fueron positivas para alguna variante en los genes *IDH1* e *IDH2*, también eran portadoras de mutaciones en el gen *NPM1*. Un paciente 1/15 (6,6%) presentaba el genotipo *IDH1G105/NPM1^{mut}*, 4/15 (26,6%) presentaban el genotipo *IDH1R132/NPM1^{mut}* y

9/15 (60%) presentaban *IDH2R140/NPM1^{mut}*. Una muestra 1/15 (6,6%) que fue positivo para ambas variantes del *IDH1*, fue negativo para *NPM1* (Tabla 25).

4.5.2 Co-ocurrencia con *FLT3*-ITD

De los 50 pacientes en estudio, el 32% (16/50) presentaron la mutación *FLT3*-ITD, observándose que el 12% (6/50) de los pacientes presentaban también alguna variante en los genes *IDH1/2*. Dos pacientes (4%) presentaba *IDH1G105/FLT3*-ITD; un paciente (2%) presentaba *IDH1R132/FLT3*-ITD; y cuatro pacientes (8%) presentaban *IDH2R140/FLT3*-ITD (Tabla 25).

4.5.3 Co-ocurrencia con re-arreglos de fusión

Al analizar la co-ocurrencia de los re-arreglos *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* con las variantes en los genes *IDH1/2*, se observó que el 2% (1/50) de los pacientes presentaba *IDH2R140/RUNX1-RUNX1T1*, sin embargo no se encontró ninguna co-ocurrencia con el re-arreglo de fusión *CBFB-MYH11* (Tabla 25).

Tabla 25. Co-ocurrencia de mutaciones y/o re-arreglos de fusión con las variantes *IDH1* e *IDH2*.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>																																																		
<i>CBFB-MYH11</i>																																																		
<i>FLT3</i> -ITD																																																		
<i>NPM1</i>																																																		
<i>IDH1G105</i>																																																		
<i>IDH1R132</i>																																																		
<i>IDH2R140</i>																																																		
<i>IDH2R172</i>																																																		

Todos los resultados obtenidos en la detección de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*, comparados con las mutaciones en *NPM1* y *FLT3*-ITD se pueden observar en la tabla 26.

Tabla 26. Resultados de las mutaciones en *IDH1/2*, *NPM1* y *FLT3-ITD* de todos los pacientes en estudio.

Paciente	SEXO	EDAD	Variantes en <i>IDH1</i>		Variantes en <i>IDH2</i>		<i>FLT3-ITD</i>	<i>NPM1</i>
			Secuenciación <i>IDH1G105</i>	Secuenciación <i>IDH1R132</i>	Secuenciación <i>IDH2R140</i>	Secuenciación <i>IDH2R172</i>		
1	F	77	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT A
2	M	50	WT	WT	WT	WT	WT	WT
3	M	18	WT	WT	WT	WT	WT	WT
4	F	64	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	WT	MUT A
5	M	27	WT	WT	CCG>CAG (R140L)	WT	POSITIVO	MUT A
6	F	55	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
7	F	73	WT	CGT>TGT (R132C)	WT	WT	WT	MUT A
8	M	48	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
9	M	68	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
10	F	46	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	POSITIVO	MUT D
11	M	64	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT B
12	M	SD	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT A
13	F	59	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
14	M	57	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
15	M	61	WT	WT	CCG>CAG (R140L)	WT	WT	MUT A
16	M	85	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
17	M	43	WT	CGT>CAT (R132H)	WT	WT	WT	MUT A
18	F	68	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	WT
19	F	SD	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
20	F	46	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
21	M	57	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	POSITIVO	MUT A
22	F	28	SNP rs11554137	CGT>CAT (R132H)	WT	WT	POSITIVO	WT
23	F	21	WT	WT	WT	WT	WT	WT
24	M	62	SNP rs11554137	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT D
25	F	67	WT	CGT>AGT (R132S)	WT	WT	WT	MUT A
26	M	36	WT	WT	WT	WT	WT	WT
27	F	57	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	WT
28	M	58	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	WT	MUT A
29	M	57	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	WT
30	F	27	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
31	M	33	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
32	M	84	WT	WT	WT	WT	WT	WT
33	F	SD	WT	WT	WT	WT	WT	WT
34	F	SD	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	WT
35	F	63	WT	WT	WT	WT	WT	WT
36	F	50	WT	WT	WT	WT	WT	WT
37	M	60	WT	CGT>GGT (R132G)	WT	WT	WT	MUT A
38	M	19	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
39	M	26	WT	WT	WT	WT	WT	WT
40	F	41	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	POSITIVO	MUT A
41	F	47	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
42	F	47	WT	WT	WT	WT	WT	MUT A
43	F	78	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT A
44	M	71	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT A
45	M	47	WT	WT	WT	WT	WT	WT
46	F	71	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	WT	MUT A
47	M	61	WT	WT	WT	WT	POSITIVO	MUT A
48	M	80	WT	WT	WT	WT	WT	WT
49	M	66	WT	WT	WT	WT	WT	WT
50	M	77	WT	WT	CCG>CTG (R140Q)	WT	WT	MUT A

SD: Sin Datos

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La LMA es una patología genéticamente heterogénea, que afecta principalmente a adultos mayores y que se estratifica según la evolución clínica y pronóstica. La disponibilidad de plataformas de secuenciación en los últimos años ha permitido identificar marcadores moleculares, como por ejemplo mutaciones somáticas recurrentes en los pacientes con cariotipo normal, entre los que se citan la *IDH1* e *IDH2* (52,83,84). No obstante, en el país no se han reportado estudios que describan la presencia de estas mutaciones; por tanto, el objetivo del presente estudio fue describir por primera vez la detección y frecuencia de estas mutaciones en la población estudiada. Para la realización de este trabajo, se recolectaron 50 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LMA.

Respecto a la edad de los pacientes, la mediana al momento del diagnóstico fue de 57 años, similar a lo publicado por Patel y cols., quienes en 2011 reportaron a la mediana de la edad como 55 años en una cohorte de 199 pacientes (85). Estos datos difieren de las publicaciones recientes respecto a LMA, como la de Daver y cols. en 2020, que describe a la mediana de la edad como 67 años (7). Según lo publicado en Vigilancia, epidemiología y resultados finales 2021 (SEER 2021) del Instituto Nacional de Cáncer de los EEUU, la mediana de la edad en la LMA es de 68 años (6). Montalbran-Bravo y cols. compararon las edades de los pacientes que presentaban el gen *wild type* y pacientes que presentaban la mutación en los genes *IDH*, encontrando que los últimos eran típicamente mayores, con una mediana de edad de 67 años (86).

La presencia de las variantes en los genes *IDH1* y *IDH2* fue asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas; y estas mutaciones son eventos tempranos en leucemogénesis (8). En la población estudiada, los pacientes que presentaban alguna variante para los genes *IDH1* o *IDH2*, también tenían una mediana de edad de 57 años, lo que es menor a lo reportado a nivel mundial en la literatura, pero en Latinoamérica existe una tendencia de aparición de la enfermedad a edades menores de lo reportado a nivel mundial (87).

En cuanto al sexo, en este trabajo se observó una leve predominancia del sexo masculino, observando una proporción de hombre/mujer de 1,17/1; coincidiendo con varias publicaciones actualizadas respecto a la enfermedad (6,7,88).

En la población estudiada se observó en la mayoría de los casos, un aumento en el recuento de los glóbulos blancos, siendo la mediana un valor de $25,2 \times 10^9/L$. Sin embargo se observó valores disminuidos en el recuento de plaquetas, siendo la mediana $50 \times 10^9/L$; y en el valor de la Hemoglobina, mediana de 8g/dL; lo que conlleva al paciente a presentar trombocitopenia y anemia, que se describen en la bibliografía como manifestaciones clínicas de la LMA (3,4). Además se observó que la mediana en el porcentaje de blastos en medula ósea fue alrededor de 80% (40-100%).

Debido a que no se cuentan con datos sobre la detección de los genes *IDH1* e *IDH2* en la LMA a nivel país, y que esto tiene un impacto a nivel del tratamiento de los pacientes, aunque el tratamiento aún no está disponible en el país, el objetivo del presente estudio fue determinar mediante técnicas moleculares la presencia y frecuencia de las variantes en una cohorte de pacientes paraguayos con diagnóstico clínico de LMA, con la finalidad de sentar las bases necesarias para la aplicación de futuros protocolos de tratamiento en el país.

Las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* son mutaciones que se caracterizan por su presencia en pacientes con LMA con cariotipo normal (CN), presentándose en un 25-30% de los casos de CN-LMA. Estas variantes presentan también una frecuente asociación con mutaciones en los genes *NPM1* y *FLT3* (89,90). Debido a esta asociación, entre los genes *NPM1* e *IDH1/2* (15,55,91), y a fin de obtener muestras positivas que sirvan como controles positivos para la realización de las diferentes técnicas, para la realización de este estudio se seleccionaron preferentemente muestras *NPM1* positivas; siendo el 66% (33/50) de las muestras estudiadas, positivas para alguna mutación en el gen *NPM1*. Por este motivo, consideramos que la población en estudio presenta un sesgo de reclutamiento, por lo cual los resultados obtenidos son

analizados teniendo en cuenta esta limitación y no pueden ser extrapolados a una población de pacientes con LMA.

Las variantes *IDH1G105*, *IDH1R132*, *IDH2R140* e *IDH2R172* fueron estudiadas por dos metodologías, la secuenciación de Sanger y HRM.

Mediante la secuenciación por Sanger, se observó una frecuencia del 30% para las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2*. La frecuencia observada fue de 12% y 18% para variantes en *IDH1* e *IDH2* respectivamente. La variante *IDH1G105* se encontró en 4% de la población estudiada, la variante *IDH1R132* en 10% y la variante *IDH2R140* en 18%. La variante *IDH2R172* no fue detectada en la población estudiada.

La variante *IDH1G105* se detectó en el 4% de la población. Estudios previos reportan que esta variante se encuentra entre 10-16% de pacientes con LMA (51,52,85,92). El motivo por el cual en este trabajo se detectó una frecuencia menor puede deberse a la selección priorizada de pacientes *NPM1+*, aunque Ho y cols. reportaron no haber encontrado diferencias entre la presencia o ausencia de esta variante al compararla con muestras *NPM1+*; sin embargo reportaron encontrar un mayor porcentaje de co-ocurrencia entre la variante *IDH1G105* y la mutación *FLT3-ITD* (53). En este estudio, los dos pacientes que presentaron la variante *IDH1G105* también presentaron la mutación *FLT3-ITD*. En un metaanálisis realizado por Xu y cols. en el 2017, los resultados sugieren que este SNP podría contribuir a un pronóstico adverso, similar a la mutación *FLT3-ITD* (93).

La variante *IDH1G105* es un polimorfismo germinal de un solo nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*). Al secuenciar el gen, se puede observar tres posibilidades: homocigosis para la variante, homocigosis para el alelo salvaje o heterocigosis para la variante y el alelo salvaje (94). Mediante los resultados obtenidos en la secuenciación por Sanger, en este estudio fue posible identificar dos pacientes en heterocigosis para la variante.

En relación a la variante *IDH1R132*, en una revisión publicada por Panuzzo y cols. en 2020, se describe que la frecuencia de esta variante en pacientes con LMA es del 6-10% (55). En el presente estudio se observó una frecuencia del 10%. Sin embargo, debe considerarse que el sesgo de reclutamiento de muestras positivas para *NPM1* podría superestimar esta frecuencia observada, considerando que existen trabajos que reportan una alta co-ocurrencia de esta variante con mutaciones en el gen *NPM1* (31,90). En el presente estudio 4/5 de los pacientes que presentaban esta variante se observó una co-ocurrencia con mutaciones en el gen *NPM1*.

En relación al tipo de variante *IDH1R132*, en el presente estudio se observaron 4 tipos que son CGT>CAT (R132H), CGT>TGT (R132C), CGT>AGT (R132S) y CGT>GGT (R132G). La variante que presentó mayor frecuencia fue la R132H (CGT>CAT), que se presentó en 2/5 pacientes, que concuerda con Abbas y cols., quienes mencionan que R132H fue la mutación más frecuente en el gen *IDH1* (68). Estos cambios se observaron en heterocigosis, lo que coincide con lo reportado en la bibliografía, que menciona que esta variante se trata de una mutación somática que por lo general se presenta en heterocigosis con el alelo *wild type* (21), y además la detección del alelo mutado podría depender de la cantidad de blastos presentes en la muestra; aunque Salem y cols. no encontraron diferencias significativas en la cantidad de blastos entre pacientes positivos y negativos para la variante *IDH1R132* (95).

Respecto a las variantes encontradas en el gen *IDH2*, la variante *IDH2R140* se detectó en el 18% de los pacientes. Panuzzo y cols. en 2020 describen que esta variante se encuentra presente entre 5-15% de los pacientes con LMA (55). El alto valor en el porcentaje encontrado en este estudio, puede deberse al sesgo introducido con las muestras *NPM1+*, porque las bibliografías citan la alta frecuencia de co-ocurrencia de la variante *IDH2R140* con mutaciones en el gen *NPM1* (31,64); además, Medeiros y cols. en su publicación hacen relación a la mayor probabilidad de que la variante *IDH2R140* se acompañe de la mutación *NPM1* que otras mutaciones en *IDH2* (21).

Las sustituciones observadas para la variante *IDH2R140* corresponden a los cambios CGG>CAG (R140Q) en un 14% y CGG>CTG (R140L) en un 4%, lo que se

corresponde a la bibliografía que menciona a la sustitución R140Q como más frecuente entre las variantes que se presentan en los genes *IDH2* (21).

Las variantes *IDH1R132* e *IDH2R140* son mutaciones somáticas que por lo general se presentan en heterocigosis en la LMA (44), lo que también fue posible observar en este estudio mediante la secuenciación por Sanger.

Finalmente, la variante *IDH2R172* no se detectó en la población de estudio. Pero, según mencionan Liu y cols., ellos no registraron co-ocurrencia de esta variante *IDH2R172* con la mutación *NPM1*, lo cual podría ser un motivo por el que no se detectó en este trabajo (96). La variante *IDH2R172* es mutuamente excluyente con la mutación *NPM1* (odds ratio para co-mutación igual a 0,06; $p=4 \times 10^{-5}$), y esta variante puede describirse como un subgrupo de las LMA con una frecuencia de 1% (65). La ausencia de la detección de esta variante puede deberse a su baja frecuencia de aparición y a la cantidad de pacientes positivos para *NPM1*, por lo cual podría ser necesario en estudios posteriores aumentar el tamaño muestral sin priorizar pacientes que presenten mutaciones en *NPM1*.

La Secuenciación por Sanger se considera el “estándar de oro” para identificar mutaciones debido a su precisión, robustez y facilidad de uso; lo que llevó a convertirse en la tecnología más común utilizada para secuenciar ADN (58). En este estudio resultó un método de fácil manejo; sin embargo, es una técnica que presenta un sensibilidad relativamente baja con una detección del 10% para mutaciones homocigotas y un 20% para mutaciones heterocigotas (44,57). Esta característica para el estudio de muestras de pacientes con LMA, donde existe una mezcla de células (clon leucémico y células normales), podría influir el resultado. Otra limitación del uso de esta tecnología es que al no encontrarse disponible en el país, las muestras deben ser enviadas al extranjero (MacroGen-Corea), lo que se constituye como una limitación para su aplicación en la rutina de estudio de pacientes con LMA, donde la obtención de un resultado rápido y preciso es de vital importancia para el diagnóstico y tratamiento del paciente (56).

Entre las limitaciones del estudio de las muestras por secuenciación se encuentra que, debido al costo y al tiempo necesario para el término de la tesis, solamente fue secuenciada una hebra de ADN. El estudio de las dos hebras para la identificación de las variantes se preve que sea realizado como perspectivas de continuación del proyecto, a fin de que puedan complementar los datos y definir la sensibilidad del ensayo.

Pichler y cols. mencionan que la secuenciación de Sanger no puede considerarse el estándar de oro con respecto a su sensibilidad diagnóstica en muestras donde la carga alélica de mutaciones puede ser inferior al 50% (97); y Gorniak y cols. con sus resultados demostraron que la sensibilidad diagnóstica calculada y la especificidad para la secuenciación de Sanger fueron 50-66% y 100%, respectivamente (45). En cuanto a las LMA, observar una baja cantidad de blastos indicaría una hemodilución del clon leucémico con los clones normales, lo que dificultaría la detección de las mutaciones; y aquellos pacientes que presenten menor a 50% de blastos, podría perderse la detección de las variantes en la secuenciación (45). En este trabajo, 4 pacientes presentaban cantidad de blastos menor al 50%, los cuales en su totalidad se identificaron como *wild type* en la secuenciación.

En este estudio también se analizaron las variantes en los genes *IDH1/2* por la metodología HRM. El HRM se describe como un método de *screening* rápido, sensible y rentable para la genotipificación y el análisis mutacional (21,44,45).

Los primers utilizados en los ensayos de HRM fueron diseñados en el laboratorio. Para el HRM se recomienda que el largo del amplicón debe ir entre 80 a 250 pb, porque la amplificación es ineficiente cuanto más largo sea el amplicón; que la longitud de los primers sea de aproximadamente 20 pb, la T_m de los mismos se recomienda que este entre 58 a 60 °C, el porcentaje de GC se encuentre entre el 30 – 80 % en cada primer, y que el extremo 3' no debe contener más de 3G/C en los últimos 5 nucleótidos, pero recordando que el contenido GC en el extremo 3' debe ser estable para que se produzca la polimerización. Además, las repeticiones deben tratar de evitarse, y de no ser posible evitarlas, no debería haber más de 4 Gs seguidas. Al diseñar los primers también se

debe tener en cuenta evitar la formación de horquillas o los homodímeros o heterodímeros de primers debido a que esto puede causar una baja amplificación del producto deseado (98). Todos estos parámetros fueron tenidos en cuenta para el diseño de los primers citados en la tabla 5 y 7.

El ensayo de prueba del HRM para la variante *IDH1G105* con el primer diseño de primers permitió la identificación de tres grupos: la variante V1 que corresponde al identificado en la secuenciación por Sanger como una muestra en heterocigosis para la variante *IDH1G105*, y las variantes V2 y V3, ambas correspondientes a muestras no relacionadas a la LMA. Estas muestras no relacionadas no fueron secuenciadas, aunque al tratarse de pacientes sin signos ni síntomas relacionados a la enfermedad, se consideran muestras negativas y el uso de estas muestras permite verificar la sensibilidad del ensayo para identificar las variantes. Pero además, en el ensayo es necesario la inclusión de muestras negativas secuenciadas, por lo que este ensayo fue descartado para quitar conclusiones respecto a la clasificación de la variante.

Se pueden observar tres posibilidades: homocigosis para el alelo *wild type*, homocigosis para la variante *IDH1G105* y heterocigosis para la variante; y en el HRM esto podría identificarse mediante la clasificación en diferentes agrupamientos o variantes. Esto es posible también debido a que este SNP, al tratarse de un polimorfismo germinal, el 100% del genoma en la muestra debe presentar el genotipo de la variante si se trata de una variante en homocigosis, o el 50% si se trata de la variante en heterocigosis; porque en este caso no hay un clon leucémico del cual depende la presencia de la variante.

En cuanto a la prueba del ensayo de HRM para el *IDH1R132*, se obtuvieron 2 grupos: la variante V1 correspondiente a las muestras no relacionadas a la LMA que no fueron secuenciadas, y la variante V2 correspondiente a las muestras positivas por secuenciación para la variante. Las 3 muestras positivas para *IDH1R132* presentaban diferentes sustituciones de bases en la secuencia: CGT>CAT (R132H), CGT>TGT (R132C) y CGT>GGT (R132G); sin embargo, el HRM no fue capaz de distinguir entre estas sustituciones, es decir no hubo diferencias en el agrupamiento de las variantes

del HRM en estas muestras, similar a lo publicado por Patel y cols., quienes mencionan que aunque detectaron las variantes R132H y R132C, el uso del fluoróforo intercalante en el análisis de HRM no permite distinguir entre ellas, motivo por el cual los autores recomiendan el uso de sondas específicas para distinguir entre cada sustitución (44).

En cuanto al ensayo de prueba del HRM para la variante *IDH2R140*, se analizaron muestras positivas por secuenciación de dos diferentes cambios de base en la secuencia, junto con controles que fueron negativos por secuenciación para la variante y controles no relacionados a la LMA que no fueron secuenciadas. En esta prueba, las muestras se agruparon en 3 variantes en el HRM, un grupo correspondía a las variantes *IDH2R140*, otro grupo correspondía a los secuenciados como *wild type* en la secuenciación y el otro grupo correspondía a las muestras no relacionadas a la LMA. Las diferentes sustituciones de bases en la variante *IDH2R140* tampoco pudieron ser identificadas por HRM. El motivo por el cual no es posible identificarlas consideramos podría deberse al algoritmo que utiliza el software del HRM para clasificar a las variantes que utiliza parámetros relacionados con temperaturas de *melting* y formas de las curvas (*silhouette*) para la clasificación de variantes y agrupamiento de las curvas normalizadas. Estos parámetros que utiliza son desconocidos y no disponibles al público, por lo que para identificar el tipo de sustituciones deben ser utilizadas sondas específicas al tipo de variante.

Para la variante *IDH2R172* no fue posible realizar el ensayo de HRM porque al no ser detectado en la secuenciación, no se contaba con controles positivos para esta variante.

En cuanto a las posibles condiciones experimentales que podrían influir en un ensayo de HRM, se describe que éstas fueron las mismas para todas las muestras, aplicándose el mismo método de extracción, dilución y amplificación por PCR para todas las muestras, por lo que los factores que podría influir si estos métodos fueran diferentes se descartan. Pero, teniendo en cuenta que la resuspensión final del ADN en la extracción se realiza en un buffer de resuspensión que pertenece al kit y se desconoce la composición del mismo, es posible que el contenido del mismo (por ejemplo sales) puedan interferir en el ensayo de HRM, tratándose de un ensayo muy sensible a estas

condiciones (63).

Aunque la técnica de HRM es capaz de detectar pequeñas variaciones en la temperatura de *melting* debido a cambios de una base en la secuencia, las variantes analizadas son mutaciones que por lo general se presentan en heterocigosis en la LMA, por lo que una mayor cantidad de alelos *wild type* podrían interferir en la detección de las variantes, además de que la cantidad de alelos mutados también puede verse influenciada por la cantidad de blastos presentes en cada muestra (99). Por ello, a fin de optimizar el ensayo de HRM, se realizaron los siguientes cambios: 1) se diseñaron nuevos pares de cebadores con un tamaño de amplicón menor, y 2) se utilizó una PCR de enriquecimiento de mutantes o Fast-COLD-PCR.

Para lograr una mayor eficiencia de detección en el HRM se diseñaron nuevos pares de cebadores con un tamaño de amplicón más pequeño debido a que el tamaño del amplicón influye en la detección de variantes (63). Los nuevos cebadores diseñados se utilizaron para las variantes *IDH1G105* e *IDH2R140*. Para el caso de la variante *IDH1G105*, se consiguió disminuir a 88 pb; y para la variante *IDH2R140*, se disminuyó a 93 pb. Los cebadores diseñados para la variante *IDH1R132* no funcionaron por lo que más ensayos deberían realizarse.

A el diseño de nuevos cebadores para la optimización del HRM, se sumó la utilización de una PCR de enriquecimiento de mutantes o COLD-PCR, porque consideramos que es un método sencillo para aumentar la sensibilidad de detección de una mutación sin aumentar la complejidad y el costo de los experimentos (100). Además, teniendo en cuenta la carga alélica de una muestra, si una muestra presenta una mutación heterocigota, y además la muestra presenta una baja carga alélica, esto interferiría en una correcta detección de la variante; por ello una optimización sería la utilización de una PCR de enriquecimiento de mutantes.

La PCR de enriquecimiento de mutantes o COLD-PCR consiste en la amplificación selectiva de las hebras de ADN que contienen la mutación, mediante la utilización de una temperatura crítica o T_c (78,101). Cambiando un solo parámetro de la PCR como

la temperatura de desnaturalización, podría aumentar potencialmente la sensibilidad del ensayo de detección de mutaciones hasta 100 veces (100). La COLD-PCR que se utilice puede ser una Full-COLD-PCR o una Fast-COLD-PCR, dependiendo del cambio de base o el tipo de mutación que se desea enriquecer. Una Fast-COLD-PCR consiste en una amplificación preferencial de las mutaciones cuando es realizada en la T_c , y discrimina fuertemente hacia el alelo de T_m inferior, que consiste en cambios de una sola base y estos cambios son G:C a A:T; que son los casos en la que una Fast-COLD-PCR puede conseguir un enriquecimiento de las mutaciones hasta 100 veces más (78,101). Como los cambios de base en las variantes analizadas en este estudio consistía en cambios de G:C a A:T, en este estudio se utilizó la Fast-COLD-PCR.

Para hallar la T_c , se hicieron amplificaciones mediante una PCR convencional siguiendo el protocolo para una Fast-COLD-PCR de Li y cols (78), para lo cual se utilizó la T_m aproximada de 79,5° para la *IDH1G105* y la T_m aproximada de 82°C para la *IDH2R140*, y se probaron diferentes temperaturas de desnaturalización, descendiendo en 0,5°C hasta encontrar la temperatura en la cual sólo se observaran amplificaciones en los controles positivos (muestras con la variante) y no en los controles negativos (muestras con secuencia *wild type*). Esta temperatura crítica debe hallarse de forma empírica, por lo que no puede ser definido solamente mediante cálculos, lo que hace a la técnica engorrosa y laboriosa. Finalmente, la T_c hallada para la variante *IDH1G105* fue de 78,5°C y para *IDH2R140* fue de 81°C.

En el ensayo de HRM optimizado para la variante *IDH1G105*, las muestras analizadas se clasificaron en dos grupos: el 96% (48/50) como V1 (variante 1), que corresponde a muestras en donde se identificó en la secuenciación como homocigoto para el alelo *wild type* y el 4% (2/50) se clasificó como V2 (variante 2), que corresponde a las muestras identificadas como heterocigotas para el SNP rs11554137 por secuenciación.

Al comparar el primer ensayo de HRM y la optimización del mismo mediante el uso de una PCR de enriquecimiento, se observó que en la optimización fue posible la correcta clasificación de las muestras, demostrando que el uso de una T_c como temperatura de desnaturalización es útil para diferenciar entre muestras positivas y

negativas para la variante, aun tratándose de un polimorfismo germinal, en el cual se presupone que tanto las células leucémicas y células no leucémicas presentan el polimorfismo.

La frecuencia de aparición del alelo mutado en homocigosis de la variante *IDH1G105* es de 0,06. Según la bibliografía consultada, el genotipo de la variante en 18345 alelos estudiados globalmente, sólo 740 se observaron en homocigosis, por lo que es poco probable que una cohorte de pacientes pequeña, como es la población estudiada, se detecte un homocigoto para la variante (102).

En cuanto al estudio de la variante *IDH2R140* en el ensayo optimizado del HRM, se obtuvieron tres agrupamientos de las muestras analizadas. Los positivos por secuenciación se clasificaron el 78% como V1, el 11% como V2 y el 11% restante como V3. En cuanto a los negativos por secuenciación se clasificaron el 9,7% como V1, el 85,4% como V2 y el 4,9% como V3. Esta variante es una mutación somática que por lo general se presenta en heterocigosis, y es dependiente de la cantidad de células leucémicas presentes en la muestra, por lo que su detección puede verse influenciada por la cantidad de alelos salvajes, es decir, a la presencia de células no leucémicas presentes en la muestra. Por este motivo se consideró que el uso de la Tc sería de utilidad para la detección de la variante; sin embargo, comparando los resultados del HRM con la secuenciación por Sanger, no hubo coincidencia.

Además, considerando que las muestras positivas se trataban de dos diferentes cambios de base: R140Q y R140L, se esperaba que estas muestras se clasificaran también en diferentes curvas, pero como el HRM es un análisis con un fluoróforo intercalante (SYTO 9) y no una sonda que permita diferenciar entre estas muestras, se descarta la posibilidad de diferentes curvas debido a diferentes cambios de base.

La eficiencia de detección de variantes en la técnica de HRM depende de muchos factores como pipeteo, concentración de sales, calidad y cantidad de ADN, presencia de contaminantes como alcoholes, la master mix, el tipo de fluoróforo utilizado, la pureza, calidad y cantidad de primers a utilizar, entre otros factores (63). Además, la

bibliografía menciona que cantidades inconsistentes de ADN pueden causar una desviación de la curva, dando lugar a resultados falsos positivos; y una amplificación deficiente de la muestra puede producir curvas de disociación aberrantes (62). Sin embargo y a pesar de los factores mencionados, un ensayo de HRM resulta en un método de genotipado bastante sensible, rápido y de bajo costo (45).

Otra limitación en cuanto a los ensayos de HRM, es que se desconoce la concentración de los componentes de la mix comercial, debido a que estos datos no se encuentran declarados en el inserto del mismo; y teniendo en cuenta la PCR de enriquecimiento, para hallar la T_c de las variantes se utilizó una concentración de 1,5 mM de $MgCl_2$, y posibles diferencias entre ésta y la concentración real en la mix comercial podrían ser responsables de no obtener la clasificación deseada en el HRM. Por lo general, las mixes comerciales presentan una concentración mayor de $MgCl_2$; y mayores concentraciones de $MgCl_2$ disminuyen la temperatura de *melting* de un amplicón, punto que es importante en los ensayos de HRM y la agrupación final de las muestras (103,104). Por todo esto, lo ideal sería que la búsqueda de la T_c se realice con la misma mix que se estaría realizando el ensayo de HRM, para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos en el HRM.

El HRM, en contraposición con la Secuenciación por Sanger, en este trabajo se consideró muy laborioso para estandarizar, dependiente de muchos factores, además de ser una técnica que requiere de mucho entrenamiento previo para realizar una correcta lectura de los resultados.

Como perspectivas para futuros trabajos en la optimización en los ensayos de HRM, se plantean testar además a pacientes no relacionados a la LMA, y de esta manera verificar que el ensayo sea específico para detectar las variantes deseadas.

En cuanto a las co-ocurrencias entre las variantes del *IDH*, estas son poco frecuentes, pero se podrían presentar. Uno de los 50 pacientes en estudio, correspondiente al 2%, presentó co-ocurrencia de ambas variantes en el gen *IDH1*, en donde se detectó *IDH1G105* e *IDH1R132*. Esta co-ocurrencia ya se observó previamente según

reportes, como mencionan Patel y cols., que citaban la co-ocurrencia en un 0,7% (1/146) (44) y Ravandi y cols. lo detectaron en un 1,17% (2/170) (52). Sin embargo, en este estudio se observó que las variantes en *IDH1* y en *IDH2* son mutuamente excluyentes entre sí, lo que concuerda con varias publicaciones de dichas mutaciones en la LMA (66–68). Además, en el presente trabajo se detectó mayor prevalencia de las variantes en los genes *IDH2*, lo que coincide con la bibliografía que menciona que en la LMA, las variantes en *IDH2* son más comunes que las variantes en *IDH1* (86).

En cuanto a las co-ocurrencias entre las variantes en *IDH1/2* y otras mutaciones estudiadas en el laboratorio, de los pacientes *NPM1*+, el 42% (14/33) presentaban alguna variante en *IDH*. La asociación de la mutación en *NPM1* con las variantes en el gen *IDH1* se encontró un total de 15%: un paciente (3%) presentaba *IDH1G105/NPM1^{mut}* y cuatro pacientes (12%) presentaban *IDH1R132/NPM1^{mut}*; y en la asociación de la mutación en *NPM1* con la variante *IDH2* se encontró un 27%: los nueve pacientes que presentaban la variante *IDH2R140* en este estudio, es decir la totalidad, presentaron alguna mutación en *NPM1*. Según Bullinger y cols, la mutación en *NPM1* se encuentra asociada con las mutaciones en *IDH1* en un 15% aproximadamente, lo que coincide con lo reportado en este trabajo (8). Los mismos autores mencionan que con la variante *IDH2R140* también se asocia en un 15% aproximadamente (8), pero en este trabajo se encontró una frecuencia mayor: 27%; sin embargo, Papaemmanuil y cols reportaron que la *IDH2R140* presentaba una fuerte co-ocurrencia con *NPM1* (odds ratio para co-mutación igual a 3,6; $p=5 \times 10^{-10}$) (65), lo que es compatible con el presente estudio donde el 100% de los pacientes positivos para *R140* fueron también positivos para *NPM1*.

De los pacientes negativos para *NPM1* (17/50) que se analizaron en el estudio, 16/17 pacientes fueron negativos para *IDH1R132* y 17/17 fueron negativos para *IDH2R140*, resultados concordantes con lo observado en otros estudios que demuestran una alta asociación entre *R312* y *R140* con *NPM1* (8,55,65).

La variante *IDH2R172* es mutuamente excluyente con la mutación *NPM1* (65); y en el presente estudio, el 34% (17/50) fueron negativos para la mutación *NPM1*, y entre estos pacientes no se observó la presencia de la variante *IDH2R172*.

Finalmente, como conclusión es importante entender la importancia de incluir el estudio de las variantes *IDH1* e *IDH2* en un perfil de mutaciones de la LMA, porque la presencia de variantes en *IDH* por si mismas no predicen el desenlace de pacientes con LMA (EFS a 5 años=40% vs 39% en pacientes con el alelo normal). Sin embargo, pacientes con variantes en *IDH* y *NPM1* presentan mejores valores en cuanto a la información sobre la sobrevida global y libre de la enfermedad (EFS a 5 años=56,5% vs 20,6% en pacientes con el alelo normal, p menor a 0.001) (55,105).

Por otra parte, cabe resaltar que este es el primer estudio que brinda datos sobre la frecuencia de las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en una población seleccionada del país, y los resultados obtenidos en este trabajo sirven como base para la implementación de posibles tratamientos, ya disponibles a nivel mundial para los pacientes con LMA que presentan estas variantes, teniendo así relevancia en el ámbito clínico, de diagnóstico y tratamiento en la leucemia mieloide aguda en el país.

6. CONCLUSION

6. CONCLUSIÓN

En este trabajo fue posible la detección de las variantes *IDH1* e *IDH2* en la población estudiada, mediante las técnicas moleculares Secuenciación por Sanger y *High Resolution Melting* (HRM).

Se determinó la frecuencia de aparición de las variantes en la población estudiada: 4% para la variante *IDH1G105*, 10% para la variante *IDH1R132* y 18% para la variante *IDH2R140*. La variante *IDH2R172* no fue detectada en la población estudiada.

Se describió la co-ocurrencia de las variantes con otras mutaciones y re-arreglos génicos: 28% de los pacientes presentaron mutaciones en *NPM1* e *IDH1* o *IDH2*; 12% presentaron mutaciones en *FLT3-ITD* e *IDH1* o *IDH2* y 2% presentaron el re-arreglo de fusión *RUNX1-RUNX1T1* y una mutación en *IDH2*.

Se describieron también brevemente las variables clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Döhner H. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136–52.
2. Vakiti, Anusha; Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. StatPearls [Libro en Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>
3. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: A review of the literature. *Leukemia*. 2008;22(5):915–31.
4. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 2013;381(9865):484–95.
5. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021. Am Cancer Soc. 2021;
6. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER). 2021.
7. Daver N, Wei AH, Pollyea DA, et al.. New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer J*. 2020;10(10):1–12.
8. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934–46.
9. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–10.
10. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. Vol. 150, *Cell*. 2012. 264–278.
11. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642–9.
12. Health Professional Version. Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®). In: PDQ Cancer Information Summaries [Libro en Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65996/>
13. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998;92(7):2322–33.
14. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Global Acute Myeloid Leukemia

- Epidemiology and Patient Flow Analysis 2016. *Blood*. 2017;129(4):424–48.
15. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129, *Blood*. 2017. 424–447.
 16. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368:1894–907.
 17. Italian Society of Experimental Hematology. XII Congress of the Italian Society of Experimental Hematology ABSTRACT BOOK XII Congress of the Italian Society of Experimental Hematology. *Haematologica*. 2012;97(2):1–149.
 18. Falini, B.; Mecucci, C.; Tiacci E. et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352:254–66.
 19. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776–84.
 20. Larráyoz MJ, Mañú A, Ariceta B, et al. Diagnóstico molecular de alteraciones en el gen FLT3 : impacto clínico , retos y propuestas. *Genética Médica y Genómica*. 2019;3(3):31–9.
 21. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia [Internet]*. 2017;31(2):272–81.
 22. Roussel X, Daguindau E, Berceanu A, et al. Acute Myeloid Leukemia: From Biology to Clinical Practices Through Development and Pre-Clinical Therapeutics. *Front Oncol*. 2020;10:1–24.
 23. Patel, JP; Gonen, M; Figueroa, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079–89.
 24. Fernandez, HF; Zhuoxin Sun, MD; Yao, X; et al. Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2009;361(1):1249–59.
 25. Mardis; ER; Ding, L; Dooling, D; et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058–66.
 26. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in

- 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24:1302–9.
27. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3):225–34.
 28. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: Biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2010;29(49):6409–17.
 29. Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010;207(2):339–44.
 30. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1–15.
 31. Nassereddine S, Lap CJ, Haroun F, Tabbara I. The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2017;96(12):1983–91.
 32. Rivas M. Terapia epigenética y más allá en leucemia mieloblástica aguda. IV Simp CONJUNTO EHA - SAH. 2019;23:330–6.
 33. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(6):1146–51.
 34. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* (80-). 2006;314(5797):268–74.
 35. Koriyama S, Nitta M, Kobayashi T, Muragaki Y, Suzuki A. A surgical strategy for lower grade gliomas using intraoperative molecular diagnosis. *Brain Tumor Pathol*. 2018;35(3):159–67.
 36. Lin J, Yao D, Qian J, Chen Q. IDH1 and IDH2 mutation analysis in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2012;91(1):519–25.
 37. Weller M, Wick W, von Deimling A. Isocitrate dehydrogenase mutations: A challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia*. 2011;59(8):1200–4.

38. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):573–82.
39. Schlisio S. Neuronal apoptosis by prolyl hydroxylation: Implication in nervous system tumours and the Warburg conundrum. *J Cell Mol Med.* 2009;13(10):4104–12.
40. Tang J, Chang C, Lin P, Chang J. Isocitrate dehydrogenase mutation hot spots in acute lymphoblastic leukemia and oral cancer. *Kaohsiung J Med Sci.* 2012;28(1):138–44.
41. Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1837–42.
42. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462(7274):739.
43. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukemia genome. *Nature.* 2008;456(7218):66–72.
44. Patel KP, Barkoh BA, Chen Z, et al. Diagnostic testing for IDH1 and IDH2 variants in acute myeloid leukemia: An algorithmic approach using high-resolution melting curve analysis. *J Mol Diagnostics.* 2011;13(6):678–86.
45. Gorniak P, Ejduk A, Borg K, et al. Comparison of high-resolution melting analysis with direct sequencing for the detection of recurrent mutations in DNA methyltransferase 3A and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes in acute myeloid leukemia patients. *Eur J Hematol.* 2015;96(15):181–7.
46. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Rep.* 2015;10(8):1239–45.
47. Petiti J, Rosso V, Croce E, et al. Highly Sensitive Detection of IDH2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2020;9(1):271.
48. Saultz J, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med.* 2016;5(3):33.
49. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic-and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010;24(6):1146–51.

50. Lin J, Qian J, Yao DM, et al. Rapid and reliable detection of IDH1 R132 mutations in acute myeloid leukemia using high-resolution melting curve analysis. *Clin Biochem.* 2011;44(10–11):779–83.
51. Wagner K, Ottmann O, Lu M. Impact of IDH1 R132 Mutations and an IDH1 Single Nucleotide Polymorphism in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia : SNP rs11554137 Is an Adverse Prognostic Factor. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2356–64.
52. Ravandi, F; Patel, K; Luthra, R; Federl S. Prognostic Significance of Alterations in IDH Enzyme Isoforms in Patients With AML Treated With High Dose Cytarabine and Idarubicin. *Cancer.* 2012;118(10):2665–73.
53. Ho PA, Kopecky KJ, Alonzo TA, et al. Prognostic implications of the IDH1 synonymous SNP rs11554137 in pediatric and adult AML: A report from the Children's Oncology Group and SWOG. *Blood.* 2011;118(17):4561–6.
54. Thol F, Ganser A. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 2020;21(8):1–11.
55. Panuzzo C, Signorino E, Calabrese C, et al. Landscape of Tumor Suppressor Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2020;9(802):1–25.
56. Feng J-H, Guo X-P, Chen Y-Y, Wang Z-J, Cheng Y-P, Tang Y-M. Prognostic significance of IDH1 mutations in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Am J Blood Res.* 2012;2(4):254–64.
57. Berenstein R, Blau IW, Kar A, et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(44):1–12.
58. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1–8.
59. Sanger, F; Nicklen, S; Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nati Acad Sci USA.* 1977;75(4):59S-76S.
60. Hunkapiller T, Kaiser RJ, Koop BF, Hood L. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science (80-).* 1991;254(5028):59–67.
61. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 2004;50(10):1748–54.

62. Er TK, Liang WC, Chang JG, Jong YJ. High resolution melting analysis facilitates mutation screening of ETFDH gene: Applications in riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta*. 2010;411(9–10):690–9.
63. Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping-limitations and caveats in practical case studies. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):1–21.
64. Walton AH. IDH1 and IDH2 Gene Mutations in South African Patients With Cytogenetically-Normal Acute Myeloid Leukaemia. 2013.
65. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Europe PMC Funders Group Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. 2016;374(23):2209–21.
66. Acha P, Hoyos M, Pratcorona M, et al. Genetic characterization of acute myeloid leukemia patients with mutations in IDH1/2 genes. *Leuk Res*. 2021;101(August 2020):1–4.
67. Figueroa ME, Wahab OA, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553–67.
68. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010;116(12):2122–6.
69. Stein EM. Enasidenib, a targeted inhibitor of mutant IDH2 proteins for treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Futur Oncol*. 2018;14(1):23–40.
70. FDA. FDA granted regular approval to enasidenib for the treatment of relapsed or refractory AML. U.S. Food and Drugs Administration. 2017.
71. DiNardo CD, Stein AS, Stein EM, et al. Mutant isocitrate dehydrogenase 1 inhibitor ivosidenib in combination with azacitidine for newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2021;39(1):57–65.
72. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

2014;111(7):2548–53.

73. Perl AE. The most novel of the novel agents for acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2017;24:1–9.
74. NCBI. Variantes en IDH1 e IDH2 en Leucemia mieloide aguda [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
75. Rakheja D, Mitui M, Boriack R, DeBerardinis R. Isocitrate Dehydrogenase 1/2 Mutational Analyses and 2-Hydroxyglutarate Measurements in Wilms Tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:379–83.
76. NCBI. Homo sapiens isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1 (IDH1), RefSeqGene (LRG_610) on chromosome 2 [Internet]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_023319
77. NCBI. Homo sapiens isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2 (IDH2), RefSeqGene (LRG_611) on chromosome 15; nuclear gene for mitochondrial product [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/300192901>
78. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med*. 2008;14(5):579–84.
79. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103–8.
80. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326–35.
81. Van Dongen J, Macintyre E, Gabert J, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(7):1901–28.
82. NCBI. rs11554137 [Internet]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11554137#seq_hash
83. Lowenberg B, Downing J, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051–62.

84. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059–74.
85. Patel K, Ravandi F, Ma D, Al E. Acute Myeloid Leukemia with IDH1 or IDH2 Mutations: Frequency and Clinicopathologic Features. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(1):35–45.
86. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Futur Oncol.* 2018;14(10):979–93.
87. García L, Cabrero M, del Cañizo C. Leucemias agudas. *Med.* 2016;12(21):1201–12.
88. Anusha, Vakiti; Perna M. Acute Myeloid Leukemia. In: StatPearls [Libro en Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>
89. Virijevic M, Karan-Djurasevic T, Marjanovic I, et al. Somatic mutations of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 are prognostic and follow-up markers in patients with acute myeloid leukaemia with normal karyotype. *Radiol Oncol.* 2016;50(4):385–93.
90. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemias. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):1–44.
91. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209–21.
92. Fasan A, Haferlach C, Eder C, et al. Evaluation of IDH1G105 polymorphism as prognostic marker in intermediate-risk AML. *Ann Hematol.* 2015;94(12):1991–2001.
93. Xu Q, Li Y, Lv N, et al. Correlation Between Isocitrate Dehydrogenase Gene Aberrations and Prognosis of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2017;2.
94. Carvallo P. Conceptos Sobre Genética Humana Para La Comprensión E Interpretación De Las Mutaciones En Cáncer Y Otras Patologías Hereditarias. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2017;28(4):531–7.
95. Salem D, El-Aziz SA, El-Menshawly N, Abouzeid T, Ebrahim M. Prevalence

- and Prognostic Value of IDH1 R132 Mutation in Newly Diagnosed AML Egyptian Patients with Normal Karyotype. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017;33(1):49–55.
96. Liu X, Gong Y. Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia. *Biomark Res.* 2019;7(1):1–8.
 97. Pichler M, Balic M, Stadelmeyer E, et al. Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *J Mol Diagnostics.* 2009;11(2):140–7.
 98. Applied Biosystems. *Applied Biosystems High Resolution Melting Getting Started Guide.* 2009.
 99. Ciccarino P, Desestret V, Boisselier B, et al. METHODS COLD PCR HRM : A Highly Sensitive Detection Method for IDH1 Mutations Human Mutation. 2010;
 100. Kristensen LS, Daugaard IL, Christensen M, Hamilton-Dutoit S, Hager H, Hansen LL. Increased sensitivity of KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis of COLD-PCR products. *Hum Mutat.* 2010;31(12):1366–73.
 101. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: A new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(2):427–32.
 102. VARSOME. rs11554137 [Internet]. Disponible en: <https://varsome.com/variant/hg38/rs11554137?annotation-mode=germline>
 103. Blagoi, Iu P; Sorokin, V A; Valeev, V A; Khomenko, S A ; Gladchenko GO. Effect of magnesium ions on heat denaturation of DNA. *Mol Biol.* 1977;11(4):748–56.
 104. Buzard GS, Baker D, Wolcott MJ, Norwood DA, Dauphin LA. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1–3):292–7.
 105. Zarnegar-lumley S. Study Offers Insights on Prognostic Significance of IDH Mutations Across Age Groups in AML. *Oncologist.* 2021;26(S1):S13–4.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Este formulario se envía al médico tratante al tiempo que la muestra llega al laboratorio, para obtener los datos al momento del diagnóstico.

DATOS PARA ESTUDIO MOLECULAR

Favor completar los datos necesarios para el procesamiento de las muestras

- ✓ Nombre del Paciente :
- ✓ Edad:
- ✓ Sexo:
- ✓ Procedencia:
- ✓ Hemoglobina (g/dl):
- ✓ Recuento de glóbulos blancos (μ l):
- ✓ Recuento de plaquetas (μ l):
- ✓ Porcentaje de blastos en Médula Ósea:
- ✓ Nombre de quien completa este formulario:

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO DE REARREGLOS GÉNICOS Y MUTACIONES DE RIESGO EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

Justificativo: El presente trabajo tiene como objetivo estudiar las variantes en los genes *IDH1* e *IDH2* en pacientes con diagnóstico clínico de leucemia mieloide aguda.

Es importante que usted lea y entienda que:

- 1) Este estudio **NO** tiene ningún costo para usted.
- 2) Su participación es voluntaria.
- 3) Que al tratarse de un estudio que pretende implementar y estandarizar una nueva tecnología y técnica, el resultado de su estudio puede **tardar tiempo en entregarse**.
- 4) Su donación consistirá en permitir que se realice el presente estudio en el material ya remitido al Laboratorio para su diagnóstico (médula ósea o sangre periférica). No se realizará una nueva toma de muestra.
- 5) Este material quedará almacenado y guardado en el laboratorio en completa confidencialidad.
- 6) La participación de usted en este estudio será anónima, es decir únicamente los investigadores mencionados abajo sabrán de su participación. Su nombre no aparecerá en ninguna presentación o publicación que puede resultar de esta investigación.
- 7) El beneficio del estudio consiste en generar conocimiento e información para la población, lo que en un futuro podría direccionar el tratamiento de los pacientes con LMA, cuando la medicación se encuentre disponible en el país.

Por lo tanto, Yo....., con
CI N°:.....Estoy de acuerdo que una muestra de mi sangre y/o médula ósea
se mantengan almacenados por congelación bajo la responsabilidad del equipo de
laboratorio, leí y comprendí todos los puntos anteriormente citados por lo tanto
ACEPTO participar de este estudio.

.....
Firma del paciente o responsable

Investigadores del proyecto (Laboratorio de Genética del IICS): Dra. Ana Ilda Ayala
Lugo, MSc., PhD.; Biol. Valerie Jolly, MSc.; Bioq. María Paz Mujica.