



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*

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

Memoria de tesis  
**“Análisis Bioinformático y de Asociación del gen FLT3  
en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Químico Farmacobiólogo  
**Francisco Alejandro Lagunas Rangel**

Dirección de tesis:  
Doctor en Ciencias (Biología Celular)  
Carlos Cortés Penagos

Morelia, Michoacán  
Febrero 2017



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

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

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

Químico Farmacobiólogo FRANCISCO ALEJANDRO LAGUNAS RANGEL

Doctora en Ciencias Químico-Biológicas  
Martha Eva Viveros Sandoval

---

Doctora en Ciencias Biomédicas  
Graciela María Eugenia Letechipia Vallejo

---

Doctora en Ciencias Biológicas  
Ana Edith Higareda Mendoza

---

Doctora en Ciencias Biológicas  
Ana Laura Guillén Nepita

---

**Dirección de tesis**

Doctor en Ciencias (Biología Celular)

Carlos Cortés Penagos

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

## **ABREVIATURAS**

**CGH** Células germinativas hematopoyéticas

**FAB** Grupo Francés-Americano-Británico

**FT** Factor de Transcripción

**IC95%** Intervalo de confianza al 95%

**IARC** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

**ISCN** International System for Human Cytogenetic Nomenclature

**LLA** Leucemia linfoblástica aguda

**LMA** Leucemia mieloide aguda

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**NMP** Neoplasias mieloproliferativas

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PDB** Protein Data Bank

**RTK** Receptor tirosina-cinasa

**SEMARNAT** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

**SMD** Síndromes mielodisplásicos

**UCSC** University of California Santa Cruz

## **RELACIÓN DE CUADROS**

Cuadro 1. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda de acuerdo a la OMS.....5

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para determinar cada una de las mutaciones seleccionadas.....21

Cuadro 3. Reportes de LMA en Mexico.....33

## RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Estructura intracelular de FLT3.....	9
Figura 2. Procedencia de las muestras empleadas en el estudio.....	25
Figura 3. Eventos de anomalías por cromosoma y tipo de alteración.....	26
Figura 4. Interrelación de los marcadores genéticos analizados.....	27
Figura 5. Predicción de los cambios en la estructura de FLT3 por efecto de la mutación ITD.....	29
Figura 6. Incremento del área de la cavidad catalítica de FLT3.....	30
Figura 7. Efecto de los diferentes ITDs insertados en diferentes regiones funcionales de la región juxtamembrana del ITD.....	31
Figura 8. Modelados de las muestras positivas a FLT3-ITD.....	32

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR IGNACIO CHÁVEZ”**

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>15</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>38</b>

Número total de páginas:55

## RESUMEN



### FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”



#### “ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y DE ASOCIACIÓN DEL GEN FLT3 EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”

**INTRODUCCIÓN:** La reciente identificación de mutaciones genéticas asociadas con LMA ha permitido definir nuevas entidades patológicas. De todas ellas destacan las que afectan al gen FLT3 debido a su alta frecuencia (15-35%) y su asociación con la respuesta al tratamiento, pronóstico clínico y tiempo de supervivencia de los pacientes. **OBJETIVO.** Determinar los efectos de las mutaciones en la estructura de FLT3 y sus asociaciones con otros marcadores genéticos en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda. **MATERIALES Y MÉTODOS.** A partir de muestras de médula ósea o sangre periférica caracterizadas por cariotipo se llevó a cabo la extracción de DNA y RNA y se obtuvo el cDNA correspondiente. Utilizando el DNA y/o el cDNA se efectuó una reacción de PCR para cada uno de los marcadores (FLT3-ITD, FLT3-TKD, KIT-ITD, KIT-TKD, NPM1, CEBP $\alpha$ , DNMT3 $\alpha$ , IDH1, IDH2) y el producto de este se sometió a purificación y secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias se analizaron por métodos informáticos buscando las mutaciones pertinentes y la presencia de SNP's. Apartir de las mutaciones detectadas en la población de estudio se realizaron 90 modelados de la proteína FLT3 presentando diferentes variantes del ITD (modificando tamaño, región y secuencia) utilizando SWISS-MODEL. **RESULTADOS.** Se analizaron 12 muestras de las cuales, 4 presentaron cariotipo normal, 3 anomalías citogenéticas numéricas, 2 rearrreglos cromosómicos y 3 cariotipos complejos. Solamente dos muestras presentaron la mutación FLT3-ITD, presentando en ambos casos dos clones diferentes. No se encontraron mutaciones en KIT, NPM1, CEBP $\alpha$ , DNMT3 $\alpha$ , IDH1 e IDH2. El análisis bioinformático permitió encontrar una correlación entre el tamaño del ITD y el área catalítica de la proteína ( $p < 0.001$ ). **CONCLUSIÓN:** Debido a la diversidad genética en la población mexicana es importante llevar a cabo estudios que permitan determinar el comportamiento de diferentes marcadores pronósticos en LMA, siendo este una prueba piloto que requiere seguimiento con una población mayor.

**Palabras clave:** LMA, marcadores moleculares, pronóstico, modelado proteico, secuenciación

## ABSTRACT



### FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”



#### “BIOINFORMATIC ANALYSIS AND ASSOCIATION OF FLT3 GENE IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA”

**INTRODUCTION:** The recent identification of genetic mutations associated with AML has allowed to define new disease entities. Of all of them stand out those affecting the FLT3 gene because of its high frequency (15-35%) and its association with response to treatment, clinical prognosis and survival time of patients. **OBJECTIVE.** Determine the effects of mutations on FLT3 structure and its associations with other genetic markers in patients diagnosed with acute myeloid leukemia **MATERIALS AND METHODS.** From samples of bone marrow or peripheral blood characterized by karyotype was performed the extraction of DNA and RNA and corresponding cDNA was obtained. Using the DNA and/or cDNA a PCR reaction was performed for each of the markers (FLT3-ITD, FLT3-TKD, KIT-ITD, KIT-TKD, NPM1, CEBP $\alpha$ , DNMT3 $\alpha$ , IDH1, IDH2) and the product of these was subjected to purification and sequencing by the Sanger method. Sequences were analyzed by computer methods seeking relevant mutations and the presence of SNPs. With the detected mutations in the study population were realized 90 modelings of the FLT3 protein presenting different variants of ITD (changing size, region and sequence) using SWISS-MODEL. **RESULTS.** 12 samples was analyzed of which 4 had normal karyotype, 3 numerical cytogenetic abnormalities, 2 chromosomal rearrangements and 3 complexes karyotypes. Only two samples showed the FLT3-ITD mutations, presenting in both cases two different clones. No mutations in KIT, NPM1, CEBP $\alpha$ , DNMT3 $\alpha$ , IDH1 and IDH2 were found. Bioinformatic analysis carry to find a correlation between the size of the ITD and catalytic area of the protein ( $p < 0.001$ ). **CONCLUSION:** Due to genetic diversity in the Mexican population is important to carry out studies to determine the behavior of different prognostic markers in AML, thus this study is a pilot that requires follow out with a larger population.

**Keywords:** AML, molecular markers, prognosis, protein modeling, sequencing



## 1. INTRODUCCIÓN

La producción normal de células sanguíneas -hematopoyesis- es un proceso complejo a través del cual células germinativas hematopoyéticas (CGH) proliferan y se diferencian dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos, entre otros).<sup>1</sup> Las CGH tienen dos propiedades esenciales que se requieren para el mantenimiento de la hematopoyesis: la pluripotencialidad y la capacidad de autorrenovación. La pluripotencialidad se refiere a la capacidad de una sola CGH para generar todas las células hematopoyéticas maduras, mientras que la capacidad de autorrenovación describe la característica de generar células hijas con las mismas propiedades que su progenitor. Cuando una CGH se divide, al menos una de las células hijas debe autorrenovarse para evitar la depleción de células germinativas.<sup>2</sup>

Los tumores de origen hematopoyético se asocian a menudo con mutaciones que bloquean la maduración de la célula progenitora o que anulan su dependencia de los factores de crecimiento.<sup>3</sup> El proceso de transformación leucémica o leucemogénesis es un proceso complejo en múltiples pasos, resultante de la acumulación de mutaciones que modifican en algún punto su sistema de señalización celular (receptor, segundo mensajero, proteína efectora o factor de transcripción).<sup>4</sup> El efecto neto de estas perturbaciones es una expansión clonal no regulada y alteraciones de los procesos de muerte celular y diferenciación, de tal manera que la CGH se transforma en lo que se ha denominado como célula madre leucémica.<sup>5</sup>

### LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

El término leucemia mieloide aguda (LMA) refiere a un grupo de trastornos hematológicos malignos de progresión rápida, fenotípica y genéticamente heterogéneos, los cuales se caracterizan por la proliferación clonal desregulada de células inmaduras que han perdido la capacidad de diferenciarse normalmente.<sup>6</sup> Este tipo de leucemia representa del 15 al 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adultos y ha sido descrita como la forma predominante de leucemia en el periodo neonatal y adulto, pero representa una pequeña proporción de casos durante la infancia y la adolescencia. El

rango de incidencia es aproximadamente 1.5 por 100,000 en infantes menores de 1 año de edad, decrece a 0.4 por 100,000 en niños de edades entre 5 y 9 años, posteriormente incrementa gradualmente a aproximadamente 1 por cada 100,000 personas hacia los 25 años de edad, y finalmente comienza a incrementarse exponencialmente hasta 25 por 100,000 personas en octogenarios.<sup>7</sup>

La LMA surge como resultado de la transformación de precursores hematopoyéticos a través de la adquisición de rearrreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas que bloquean la diferenciación celular y confieren ventajas proliferativas y de supervivencia.<sup>4,8</sup> Estos eventos oncogénicos claves son a menudo clasificados de acuerdo al modelo de los dos “hits” propuesto por Gilliland en el 2001, donde supone que para el desarrollo de una LMA se deben asociar al menos dos tipos de mutaciones, las mutaciones de clase I que activan vías que confieren ventajas proliferativas o de supervivencia, y las mutaciones de clase II que afectan los procesos de diferenciación celular y apoptosis<sup>9</sup>. Sin embargo, recientemente con los estudios de secuenciación masiva, se han identificado otro grupo de mutaciones que no caen dentro de estas categorías, éstas incluyen a genes asociados con modificaciones epigenéticas.<sup>9-11</sup>

La base de la leucemogénesis subyace en el daño genético no letal, en el caso de la LMA existen una gran variedad de factores que contribuyen a su desarrollo, sin embargo los más importantes son la exposición a radiaciones ionizantes, altas concentraciones de benceno ( $\geq 40$  ppm/año), agentes quimioterapéuticos e inhalación crónica de humo de cigarro. Estos agentes exógenos tienen la capacidad de producir daños en el DNA por diferentes mecanismos, principalmente mediante daño oxidativo.<sup>12-16</sup> Además, la obesidad, es un factor endógeno que incrementa el riesgo, el mecanismo preciso aun es incierto, sin embargo se sugiere que la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina, los elevados niveles de leptina, el decremento de la adiponectina y el acortamiento de los telómeros encontrados en estos pacientes están relacionados.<sup>17,18</sup> Por otro lado, la LMA puede desarrollarse como progresión de otro desorden clonal de las CGH, resultado de la inestabilidad genómica y la adquisición de mutaciones adicionales.<sup>7</sup> Los principales ejemplos subyacen en las neoplasias mieloproliferativas (NMP), en los cuales aumenta la producción de uno o más tipos de células sanguíneas, y los síndromes mielodisplásicos (SMD) que se destacan por presentar defectos en la maduración que se asocian a una

hematopoyesis ineficaz.<sup>2</sup> En el primer caso, las NMP, se caracterizan por la presencia de proteínas tirosina cinasa constitutivamente activadas por efecto de una mutación, o bien afectaciones en la señalización por los efectores río abajo, lo cual ejemplifica perfectamente mutaciones de clase I. Por su parte, los SMD, muestran defectos en factores de transcripción claves para la diferenciación hematopoyética normal y en moduladores de la apoptosis, que asemejan mutaciones de clase II.<sup>9</sup> De esta manera, ambas patologías presentan un primer “hit”, lo que las hace susceptibles a desarrollar LMA si se presentara una segunda mutación complementaria. Además, existen algunas condiciones hereditarias que incrementan el riesgo de LMA, por ejemplo: aquellas que se asocian a defectos en la reparación del DNA como la anemia Fanconi, la susceptibilidad en genes a una segunda mutación como el síndrome familiar de plaquetas; defectos en supresores tumorales como la disqueratosis congénita y por mecanismos desconocidos como la ataxia-pancitopenia.<sup>7</sup>

## PRESENTACIÓN CLÍNICA

La signos y síntomas de la LMA son diversos e inespecíficos, pero la mayoría de ellos se atribuyen principalmente a la resultante citopenia provocada por la infiltración leucémica de la médula ósea. Normalmente, los pacientes presentan fatiga, hemorragias, infecciones y fiebre debido a la disminución de eritrocitos, plaquetas y leucocitos funcionales. La infiltración leucémica de otros tejidos incluyen hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, leucemia cutis y gingival, además puede afectar el sistema nervioso central e incluso una masa aislada de blastos (usualmente referida como sarcoma granulocítico) pueden producir una variedad de otros síntomas.<sup>2,7,19,20</sup>

## DIAGNÓSTICO

Por muchos años el diagnóstico de la LMA fue basado únicamente por la examinación patológica y citológica de los extendidos de médula ósea y/o sangre periférica, sin embargo la heterogeneidad en los mecanismos moleculares de esta patología se manifiesta por la variabilidad morfológica de las células de acuerdo al tipo de linaje y grado de diferenciación, esto configuró la base para establecer ciertos subgrupos. Inicialmente propuesto en 1976, el grupo Francés-Americano-Británico (FAB) estableció

un método de clasificación el cual divide a la LMA en ocho distintos subtipos, de acuerdo con la apariencia morfológica de los blastos y su reactividad con tinciones histoquímicas como mieloperoxidasa, negro Sudan, y esterases no específicas  $\alpha$ -naftil-acetato y naftil-butirato, adicionalmente, algunos métodos inmunológicos para analizar proteínas en la superficie celular y marcadores citoplasmáticos por citometría de flujo han sido incorporados a los criterios de clasificación de la FAB. Sin embargo, esta clasificación no siempre refleja la diversidad genética y clínica de la enfermedad.<sup>20-22</sup>

A manera de reconocer y clasificar los diferentes subgrupos de la LMA a través de la correlación clínica, morfológica y genética, la Organización Mundial de la Salud (OMS) efectuó una clasificación que se actualizó recientemente (2016). Esta clasificación presenta importantes diferencias con respecto de la clasificación de la FAB, siendo las principales, el umbral blástico para el diagnóstico de LMA que se modificó de 30% a 20% en médula ósea y/o sangre periférica, y la categorización de los casos de LMA en un subgrupo biológico y clínico. Tres únicos subgrupos de LMA son reconocidos por la clasificación de la OMS: LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA relacionados con cambios mielodisplásicos, y LMA relacionada con el tratamiento de neoplasias mieloides. Aquellos casos que no satisfacen los criterios de estos subgrupos o en los cuales los datos genéticos no puedan ser obtenidos deben considerarse en el cuarto subgrupo: LMA sin ninguna otra especificación, que de manera general se basa en la clasificación de la FAB y permite la aplicación universal del sistema de clasificación.<sup>22</sup>

Recientemente, en abril del 2016 los editores de “WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues”,<sup>23</sup> con el apoyo de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y la OMS, decidieron publicar una revisión actualizada a esta cuarta edición, la cual incorpora los datos recabados en los últimos 8 años de importancia diagnóstica, pronóstica y con implicaciones terapéuticas (Cuadro 1).<sup>24</sup>

**Cuadro 1. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda de acuerdo a la OMS**

<b>Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes</b>
Leucemia mieloide aguda con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
Leucemia mieloide aguda con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
Leucemia promielocítica aguda con PML-RARA
Leucemia mieloide aguda con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A
Leucemia mieloide aguda con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
Leucemia mieloide aguda con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM
Leucemia mieloide aguda (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Entidad provisional: Leucemia Mieloide Aguda con BCR-ABL1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones en NPM1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones bialélicas en CEBPα
Entidad provisional: Leucemia Mieloide Aguda con mutaciones en RUNX1
<b>Leucemia mieloide aguda relacionada con cambios mielodisplásicos</b>
<b>Relacionada al tratamiento de neoplasias mieloides</b>
<b>Leucemia mieloide aguda, sin ninguna otra especificación</b>
Leucemia mieloide aguda con maduración mínima
Leucemia mieloide aguda sin maduración
Leucemia mieloide aguda con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica y monocítica
Leucemia eritroide aguda
Leucemia megacariocítica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielosis y mielofibrosis aguda

(OMS, 2016)<sup>25</sup>**PANORAMA GÉNÉTICO-MOLECULAR*****Citogenética***

Actualmente, los resultados citogenéticos permiten estratificar a los pacientes con LMA en tres clases, favorable, intermedio y desfavorable, de acuerdo al pronóstico clínico que se reporta en la bibliografía. De esta manera, los pacientes con t(8;21) (q22;q22)

[RUNX1/RUNX1T1], inv(16)(p13q22) [CBFB/MYH11] y t(15;17)(q24;q21) [PML/RARA] tienen un pronóstico favorable con buena respuesta al tratamiento y remisiones completas. Por otra parte, los pacientes con t(9;11)(p22;q23) [MLLT3/KMT2A] se consideran con pronóstico intermedio, y en los pacientes con t(6;9)(p23;q34) [DEK/NUP214], inv(3)(q21q26) [GATA2, MECOM], t(1;22)(p13;q13) [RBM15/MKL1] y ahora t(9;22)(p34;q11) [BCR-ABL1]; el pronóstico clínico es adverso debido a la agresividad del padecimiento y la baja respuesta al tratamiento. Estas alteraciones citogenéticas producen genes de fusión que codifican proteínas aberrantes con propiedades funcionales alteradas.<sup>23,26</sup>

Gracias al estudio de las diferentes mutaciones que acompañan a la LMA, se ha comprendido, aunque no completamente, el papel que desempeñan estos genes críticos.

### **Genética**

Un grupo importante de pacientes (aproximadamente el 45%) con diagnóstico de LMA presentan un cariotipo normal. Estos pacientes se clasifican con un pronóstico clínico intermedio debido a que clínicamente no se tiene un marcador de referencia y su origen biológico es desconocido. Recientemente, con el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva, se han identificado nuevas mutaciones genéticas asociadas con este tipo de leucemia. Algunos de los genes identificados incluyen a: KIT, FLT3, NPM1, CEBP $\alpha$ , RAS, WT1, BAALC, ERG, MN1, DNMT, TET2, IDH, ASXL1, PTPN11 y CBL. De todos ellos destacan los que afectan a los genes FLT3, NPM1 CEBP $\alpha$ , porque se han asociado con la respuesta al tratamiento y el progreso de esta enfermedad.<sup>7,8,10,23,27</sup>

En el 2016, en la revisión publicada de la cuarta edición de la clasificación la OMS de neoplasias hematológicas, se incorporaron las mutaciones en RUNX1 adicionalmente a las mutaciones en NPM1 y CEBP $\alpha$  como entidades dentro del grupo de LMA con anormalidades genéticas recurrentes. La mutación en FLT3 no fue incluida como una entidad independiente debido a que ésta se asocia con varias entidades, sin embargo su significancia no debe ser subestimada, ya que su identificación en pacientes con cariotipo normal o con alguna anormalidad cromosómica puede establecer el pronóstico de la leucemia.<sup>23,25</sup>

## FLT3

El gen FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) codifica un receptor tipo tirosina cinasa (RTK) de clase III que está relacionado estructuralmente con FMS, KIT, PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ , posee cinco dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular, una única secuencia transmembrana, e intracelularmente una corta región juxtamembrana seguida por dos dominios cinasa separados por un sitio de inserción de la cinasa.<sup>28-30</sup> Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 13q12 y originalmente se pensó que contenía 21 exones imitando la relación intrón-exón de KIT, sin embargo en realidad posee 24 exones debido a que los tres primeros dominios inmunoglobulina extracelulares están codificados por ocho exones comparado con cinco exones en el caso de KIT.<sup>28-33</sup>

La proteína FLT3 contiene 993 aminoácidos, los cuales presentan una identidad del 85% al compararla con la del ratón, presenta dos isoformas, la primera de 158 a 160 KDa, unida a la membrana celular, la cual sufre N-glicosilación postraducciona y la segunda de 130 a 143 KDa, la cual no se encuentra ni asociada a la membrana celular, ni glicosilada. FLT3 se expresa principalmente en precursores tempranos mieloides y linfoides CD34+, aunque también se ha encontrado en otros órganos linfo-hematopoyéticos como hígado, bazo, timo y placenta, así como en gónadas y cerebro. La expresión de FLT3 se pierde durante la diferenciación celular.<sup>28,29,31</sup>

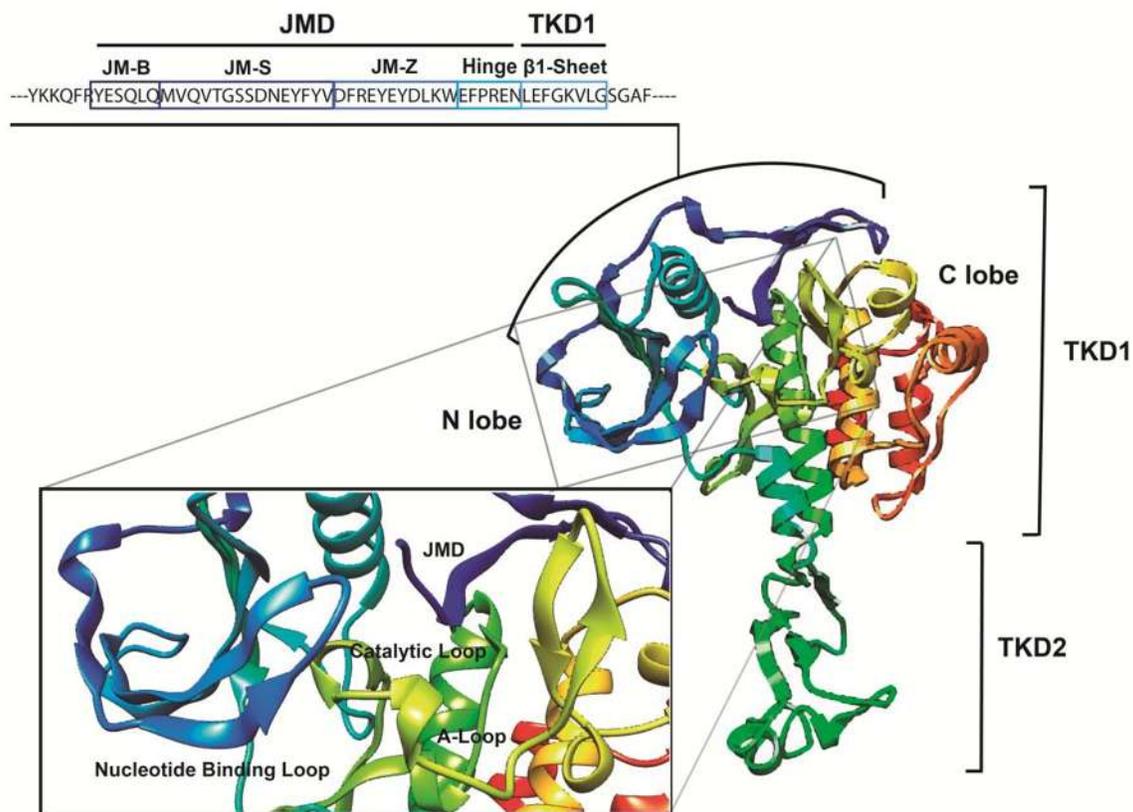
## Funcionamiento de FLT3

FLT3 normalmente reside en la membrana celular de manera monomérica, con una configuración que impide su activación. Al unirse FLT3 a su ligando específico (FL) se produce un cambio conformacional que permite la dimerización y autofosforilación en trans de varios residuos tirosina en el dominio intracelular, creando sitios de acoplamiento para moléculas traductoras como SHC, GRB2, VAC, GAB2, SHIP, CBL y CBLB, las cuales activan diversas vías de señalización celular. La cascada de señalización involucra la fosforilación y activación de múltiples mediadores secundarios incluyendo PI3K, PLC $\gamma$ , MAPK y RAS. La actividad de FLT3 es altamente dependiente del tipo celular y otros factores de crecimiento que actúan sinérgicamente en la célula, ejemplos son la IL-3, el G-CSF, el GM-CSF, la EPO y KIT que producen en colaboración con FLT3 una vigorosa respuesta proliferativa. La activación de FLT3 juega

un rol crítico en la hematopoyesis y el crecimiento celular, debido a que regula diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis celular.<sup>10,28,34</sup>

Los principales mecanismos autoinhibitorios en FLT3, que permiten su actividad solamente al unirse a su ligando, son la cinasa bilobular doblada, el loop de activación y el dominio juxtamembrana. La cinasa bilobular doblada en FLT3 es típicamente encontrada en la mayoría de las proteínas cinasas y consiste de lóbulos N y C terminales. El lóbulo N terminal consiste de cinco  $\beta$  hojas antiparalelas ( $\beta 1$  a  $\beta 5$ ) torcidas y adyacentes a una  $\alpha$  hélice ( $\alpha C$ ). El lóbulo C terminal contiene siete  $\alpha$  hélices ( $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha EF$ ,  $\alpha F$ - $\alpha I$ ) y tres  $\beta$  láminas ( $\beta 6$  a  $\beta 8$ ), adjunto al loop de activación. El loop de activación contiene dos  $\beta$  hojas ( $\beta 10$  y  $\beta 11$ ) que comprenden otra pequeña  $\beta$  lámina, que es característica de las cinasas inactivas. Cuando el loop de activación se encuentra abierto, incluye una  $\beta$  hoja adicional ( $\beta 9$ ), donde  $\beta 6$  permanece por la formación de un par  $\beta$  con  $\beta J1$  en el dominio juxtamembrana, el cual además posee otra  $\beta$  hoja ( $\beta J2$ ). Los lóbulos N y C terminales se conectan por un fragmento polipeptídico flexible que le permite rotación. Cuando el lóbulo N terminal se encuentra girado lejos del lóbulo C terminal, la proteína se encuentra catalíticamente inactiva, pero si se gira hacia el lóbulo C terminal, permitiendo que los residuos catalíticos clave de ambos lóbulos se alineen, la cinasa es catalíticamente activa. El loop de activación de FLT3 posee un fragmento polipeptídico largo que conecta  $\beta 8$  a  $\alpha EF$ . El aspartato 829 sirve como base catalítica en la reacción de fosfotransferencia. Además, contiene tres residuos tirosina que sirven como sitios de fosforilación. Cuando estas tirosinas no se encuentran fosforiladas, el loop de activación asume una conformación cerrada por el doblamiento en la hendidura entre el lóbulo N y C terminales, así bloqueando el acceso de los sustratos y el ATP. Cuando las tirosinas se fosforilan producen un cambio conformacional, provocando que el loop de activación tome una configuración abierta, permitiendo el paso del ATP y los sustratos. La región juxtamembrana puede ser dividida en tres regiones topológicamente distintas: el dominio juxtamembrana de unión (JM-B), el dominio juxtamembrana “switch” (JM-S) y el segmento zipper o enlazador (JM-Z). El JM-B (Y572 a M578) tiene una estructura como dedo, la cual tiene contacto con básicamente todos los componentes implicados en el ciclo de activación-desactivación del dominio citoplasmático. El JM-S (V579 a V592) son dos cadenas  $\beta$  antiparalelas torcidas que están localizadas externamente en el lóbulo

C, adjuntas al JM-B por la extensión de la cadena  $\beta$ J1. Este dominio contiene dos residuos tirosina clave (Y589 y Y591), situadas entre la  $\beta$  hoja de JM-S y el lóbulo C, debido a lo voluminoso y la carga del grupo fosfato, la fosforilación de estas tirosinas induce que JM-S no pueda plegarse apropiadamente, favoreciendo la conformación abierta y activa de FLT3. Finalmente, el JM-Z (D593 a W603) en el extremo C terminal de la región juxtamembrana está asociado al lóbulo N terminal, formando un loop alrededor de la cadena  $\alpha$ C. Se piensa que su función es el de mantener JM-S en una manera adecuada después de la transición entre la función activa e inactiva de FLT3 (Figura 1).<sup>33,35,36</sup>



**Figura 1. Estructura intracelular de FLT3.** La región intracelular de FLT3 incluye el dominio juxtamembrana (JMB) y los dos dominios tirosina cinasa (TKD) separados por el sitio de inserción. Las regiones funcionales del dominio juxtamembrana y la estructura de la cavidad catalítica son resaltados.

Recientemente, se han encontrado diversas mutaciones en FLT3 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA, 1 a 3% de los pacientes), síndromes mielodisplásicos (SMD, 5 a 10%) y leucemia mieloide aguda (LMA, 15 a 35 %), haciendo a FLT3 uno de los genes más frecuentemente mutados en neoplasias hematológicas.<sup>28</sup> Notablemente, el gen FLT3 es sobreexpresada en 70 a 90% de los pacientes con AML y LLA. De acuerdo con la hipótesis de los “dos hits” las mutaciones en FLT3 pueden funcionalmente cooperar con otras alteraciones genéticas para inducir la transformación leucémica. Dos distintas clases de mutaciones han sido identificadas en pacientes con AML que involucran la activación constitutiva de FLT3, una en la región juxtamembrana y otra dentro del loop de activación en el dominio tirosina cinasa, denominadas FLT3-ITD y FLT3-TKD respectivamente.<sup>10,28</sup>

### **FLT3-ITD**

La mutación más común en FLT3 involucra una duplicación en tándem interna (ITD) entre los exones 14 y 15 en el dominio juxtamembrana, la cual varía en longitud y posición de paciente a paciente.<sup>28</sup> FLT3-ITD fue descrita por primera vez en 1996 cuando al realizar un screening de la expresión de FLT3 en pacientes con leucemia, se descubrieron productos de amplificación más grandes de los esperados.<sup>37</sup> La mutación FLT3-ITD ocurre cuando un fragmento de la secuencia que codifica el dominio juxtamembrana se duplica y se inserta. La longitud del ITD varía de 3 a 400 pb, siendo siempre un múltiplo de tres nucleótidos los que se amplifican, por lo que se preserva el marco de lectura. Dos artículos independientes (Meshinchi et al. (2008)<sup>38</sup> y Kayser et al. (2009)<sup>36</sup>) reportan que el promedio de los amplificados es de 52 pb, involucrando la duplicación al menos uno de los siete residuos del codón 591 a 597, siendo este último el más común. En algunos casos es posible identificar más de 5 diferentes clonas con diferentes número de repetidos, puntos de inserción y relaciones alélicas. La causa de la duplicación aun no es conocida, sin embargo se sugiere que durante la replicación del DNA, una secuencia palindrómica en la cadena retrasada forma una estructura en horquilla, la cual permite la duplicación, agregándose además una falla general en los mecanismos de reparación por apareamiento erróneo. Otras teorías sugieren una falla en

el proceso de reparación “slipage”, posterior a la ruptura simultánea de la cadena líder y retrasada.<sup>30,36,38–40</sup>

Se ha sugerido que el cambio conformacional ocasionado por el segmento de la duplicación de FLT3-ITD es responsable de eliminar el impedimento estérico que normalmente bloquea la dimerización sin estimulación del ligando, así mismo expone diversos sitios dentro de los dominios tirosina cinasa que inducen su autofosforilación. Experimentos en modelos de trasplante de médula ósea en ratón indican que FLT3-ITD es suficiente para promover un cambio fenotípico asociado con proliferación aumentada, pero es insuficiente para inducir leucemia aguda manifiesta.<sup>10,28,34</sup>

La incidencia de FLT3-ITD se correlaciona con la edad de los pacientes con AML, en pacientes pediátricos menores de 10 años se presenta en un 5 a 16% con un aumento significativo en pacientes mayores de 10 años, en pacientes adultos se reportan 25 a 35%, sin incremento de la incidencia con la edad. El más significativo impacto de FLT3-ITD es su asociación con altas cuentas blásticas, incremento del riesgo de recaída y disminución de la supervivencia. Diversos grupos encontraron que FLT3-ITD es uno de los principales factores de riesgo debido a que predice un resultado adverso. Las mutaciones FLT3-ITD se han correlacionado con ciertos subgrupos citogenéticos. FLT3-ITD es especialmente frecuente en pacientes con cariotipo normal. Se ha reportado que 30 a 50% de los pacientes con leucemia aguda promielocítica que presentan t(15;17) (q22;q12); PML-RARA, también presentan alguna mutación en FLT3. Similarmente, se ha reportado frecuente asociación entre t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 y FLT3 ITD (~90%). Otras mutaciones asociadas a FLT3-ITD ocurren en NPM1 y DNMT3a. Estudios retrospectivos sugieren que la presencia de mutaciones en NPM1 pueden disminuir el pronóstico negativo de FLT3-ITD, pero posiblemente si la relación alélica de este último es baja.<sup>28,34,39,41</sup>

En contraste con la proteína FLT3 normal, FLT3-ITD activa la vía STAT5 significativamente. La presencia de regiones fosforiladas en la región juxtamembrana de FLT3-ITD permite que interactúe con proteínas proximales del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lo que inhibe su procesamiento por las enzimas de estos complejos, resultando en la retención del receptor en el citoplasma, aumentando el tiempo de exposición a sustratos como STAT5. STAT5 induce la expresión de genes como la

Ciclina D1, c-MYC y p21, las cuales son importantes para la proliferación celular. Pu.1 y CEBP $\alpha$ , dos proteínas involucradas en la regulación de la diferenciación en células hematopoyéticas, son significativamente reprimidas por FLT3-ITD, lo que sugiere su contribución en el bloqueo de la diferenciación. Se ha reportado que FLT3-ITD inicia un ciclo de inestabilidad genómica por lo cual se incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS) que favorecen fenómenos como el rompimiento de la cadena doble de DNA y errores en la reparación.<sup>10,28,34,39,42,43</sup>

FLT3-ITD es principalmente encontrado de manera heterocigota, sin embargo en ocasiones puede encontrarse de manera homocigota después de la pérdida del alelo normal. Se ha observado que la relación alélica (Relación entre FLT3-ITD y FLT3 silvestre) determina en gran medida el pronóstico clínico en pacientes con FLT3-ITD. Varios estudios han indicado que pacientes con altos números en la relación alélica tienen un peor pronóstico clínico, debido a que la proteína FLT3 normal interfiere y bloquea la aberrante señalización de FLT3-ITD. La pérdida de la heterocigosidad (LOH) se ha propuesto que puede ser debida a la recombinación homóloga del alelo FLT3-ITD, creando más copias del alelo mutado y eliminando el silvestre, implicando un alto riesgo de recaída y muerte.<sup>34,43</sup>

Ahora bien, Stirewal reporta que los diferentes tamaños del ITD tienen un importante efecto en el tratamiento y sobrevida de los pacientes con FLT3-ITD. Aquellos pacientes con fragmentos largos del ITD ( $\geq 40$  pb) presentaron una peor respuesta al tratamiento que aquellos con fragmentos pequeños ( $< 40$  pb), presentando solamente el 35% de los pacientes con fragmentos largos respuestas completas en comparación con el 67% en el caso de los pacientes con fragmentos pequeños, lo que a su vez disminuye el tiempo de sobrevida, con estimadas probabilidades de sobrevida en 5 años de 13% y 26%, para fragmentos grandes y pequeños, respectivamente. Sin embargo, estos resultados contrastan con los que reportan otros grupos de trabajo (Ponziani et al. (2006) y Gale et al. (2008)) por lo que aún no son concluyentes, siendo necesarios una mayor cantidad estudios antes de definir una conclusión que pueda ser trasladada al manejo clínico de estos pacientes.<sup>44-46</sup>

Existen diversas estrategias experimentales para realizar la detección de FLT3-ITD, sin embargo la más utilizada es mediante electroforesis de los productos de PCR generados

de la amplificación de los exones 14 y 15. Usualmente las muestras utilizadas son médula ósea o sangre periférica, de las cuales indistintamente se realiza la extracción de DNA o RNA con posterior transcripción reversa para obtener el cDNA, sin embargo Libura et al. encontraron al realizar una comparación de la sensibilidad para la detección de FLT3-ITD de estas dos muestras, que el uso de cDNA es 1 a 2 escalas logarítmicas más sensible que el DNA, apareciendo más frecuentemente clonas de baja concentración de FLT3-ITD y encontrándose primeramente la pérdida del heterocigosidad. Se sugiere que esto pueda deberse a que al utilizar RNA se realizan dos amplificaciones, la primera en la transcripción reversa para obtener el cDNA, y la segunda en la reacción de PCR, lo cual no ocurre al utilizar DNA, pudiendo así detectar concentraciones más bajas de FLT3-ITD. La relación alélica se puede determinar utilizando marcadores fluorescentes que se unan al DNA, así los productos de PCR se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis capilar y se mide la abundancia de cada fragmento por la intensidad de la fluorescencia después de producir la excitación del fluoróforo con un láser.<sup>28,47</sup>

### **FLT3-TKD**

El segundo tipo común de mutación en FLT3 son mutaciones puntuales missense en el exón 20 del loop de activación en el dominio tirosina cinasa (TKD). FLT3-TKD ha sido encontrada en células malignas de pacientes con LMC (1%), LLA (1-3%), SMD (2-5%) y LMA (5-10%). Casi todas estas mutaciones involucran la sustitución (GAT→TAT) de un aspartato por una tirosina en el codón 835 (D835Y), aunque otras sustituciones, deleciones e inserciones dentro de este codón y en los de alrededor han sido identificados. El aspartato en la posición 835 pertenece al dominio DFG (Aspartato-Fenilalanina-Glicina) del loop de activación, que juega un rol crítico en la prevención de la unión eficiente del ATP, pudiendo adoptar una forma cerrada (inactivo) o abierta (activo). Estas mutaciones producen un cambio conformacional en la proteína, perturbando el balance energético requerido para estabilizar la forma cerrada, eliminando su función autoinhibitoria que provoca su activación constitutiva. A diferencia de FLT3-ITD, FLT3-TKD no se asocia a altas cuentas blásticas, implicando un pronóstico no tan adverso. En modelos animales se ha demostrado que mientras FLT3-ITD provoca inicialmente el desarrollo de un desorden mieloproliferativo, FLT3-TKD induce el desarrollo de un

desorden linfoide. Un solo paciente puede ocasionalmente tener conjuntamente las mutaciones ITD y TKD en FLT3, sin embargo la mayoría de los pacientes tienen un solo tipo de mutación.<sup>10,34,35</sup>

FLT3-TKD es fácilmente identificada debido a que resultan en la pérdida de un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV, pudiendo digerir un producto de PCR de esta región con dicha enzima y después realizando la confirmación mediante secuenciación.<sup>30</sup>

## MODELADO PROTEÍCO

La estructura y función de una proteína están definidas por su secuencia de aminoácidos que naturalmente varía durante una mutación genética. De esta manera, las predicciones teóricas de la estructura tridimensional y patrones de doblamiento de una proteína pueden proveer información valiosa para inferir como se modifica su función y contribuir a mejorar los tratamientos en diferentes enfermedades.<sup>48</sup> El principio que subraya el modelado proteico por homología es que la estructura de una proteína se preserva mejor durante la evolución que su secuencia.<sup>49</sup> El modelado comparativo puede producir un modelo para una secuencia, si está se relaciona con la estructura de al menos una proteína conocida. De esta manera, el modelado proteico comparativo involucra el alineamiento de la secuencia con otras proteínas de estructura conocida, la asignación de una estructura secundaria, la construcción de los modelos y finalmente su evaluación.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se conoce que los principales mecanismos autoinhibitorios de FLT3 son el dominio cinasa bilobulado, el loop de activación y la región juxtamembrana, sin embargo, hasta el momento no se tiene claro como es que las mutaciones que afectan a FLT3 perturban estos mecanismos y permiten su actividad constitutiva independiente del ligando, sin contar que aunque su inhibición ha sido posible todavía deja mucho que desear.

Por otro lado, de acuerdo con Moreno-Estrada A. et al. (2014), la población mexicana es una de las más diversas en el mundo genéticamente.<sup>50</sup> Esta diversidad ha sido asociada con numerosos criterios clínicos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento, así como de riesgo de enfermedad. Por este motivo, los marcadores moleculares para pacientes mexicanos con LMA pueden presentar diferencias de aquellos reportados en otras poblaciones y por ello es necesario valorar su efecto.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La reciente identificación de mutaciones genéticas asociadas con AML ha permitido definir nuevas entidades patológicas. De todas ellas destacan las que afectan al gen FLT3 debido a su alta frecuencia (15-35%) y su asociación con la respuesta al tratamiento, pronóstico clínico y tiempo de supervivencia de los pacientes.

Por tal motivo, el análisis estructural de FLT3 y sus mutaciones puede brindar información importante para entender los mecanismos utilizados y posteriormente mejorar la especificidad de las moléculas inhibidoras.

Así mismo, los datos sobre la presencia de estas mutaciones en la población latina es escasa, por lo que el presente estudio definiría un conjunto de mutaciones en una población mexicana con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

#### 4. HIPÓTESIS

Las mutaciones en el gen FLT3 encontradas en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda producen modificaciones estructurales que permiten su actividad constitutiva y conllevan a su asociación específica con otros marcadores citogenéticos (RUNX1-RUNX1T1, CBF $\beta$ -MYH11, PML-RAR $\alpha$ , MLLT3-MLL, DEK-NUP214, GATA2, MECOM, RBM15-MKL1 y BCR-ABL1), genéticos (mutaciones en NPM1, CEBP $\alpha$  y KIT), e implicados con modificaciones epigenéticas (DNMT3 $\alpha$ , IDH1, IDH2).

## 5. OBJETIVOS

### ❖ **Objetivo General**

Determinar los efectos de las mutaciones en la estructura de FLT3 y sus asociaciones con otros marcadores genéticos en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

### ❖ **Objetivos Específicos**

- ◆ Identificar la presencia de las mutaciones en el gen FLT3 en muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.
- ◆ Establecer la asociación de las mutaciones en el gen FLT3 con cada uno de los diferentes marcadores genéticos implicados en leucemia mieloide aguda (RUNX1-RUNX1T1, CBF $\beta$ -MYH11, PML-RAR $\alpha$ , MLLT3-KMT2A, DEK-NUP214, GATA2, MECOM, RBM15-MKL1, BCR-ABL1, mutaciones en NPM1, CEBP $\alpha$ , KIT, DNMT3 $\alpha$ , IDH1, IDH2).
- ◆ Efectuar modelados de FLT3 y analizar los efectos de las mutaciones ITD y TKD en su estructura.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### TIPO Y CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Proyecto de investigación de ciencia básica.

### UNIVERSO O POBLACIÓN.

Muestras de pacientes anónimos donadas por biobanco a Laboratorios Mendel con información únicamente de origen, edad y sexo.

Las muestras se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios de selección:

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes del biobanco del Instituto de Hematopatología con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda sin tratamiento previo

- CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes del biobanco del Instituto de Hematopatología sin diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda o con descripción de tratamiento quimioterapéutico o radiológico previo.

- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras con condiciones inadecuadas para el procesamiento debido a la presencia de coágulos o hemólisis.

### ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Las muestras contaban con estudio de cariotipo. La técnica empleada para la elaboración del cariotipo fue de bandas G de acuerdo al protocolo descrito por Bates S. (2011)<sup>51</sup>, con un análisis de al menos 20 metafases por muestra. El reporte de los resultados se desarrollo acorde a las normas que establece la ISCN 2016<sup>52</sup>.

### EXTRACCION DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para cada una de las muestras se realizó extracción de DNA y RNA. El DNA se obtuvo utilizando QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) haciendo uso de las especificaciones brindadas por el proveedor. Por su parte, el RNA se obtuvo empleando

QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) y de la misma manera se utilizaron las especificaciones proporcionadas por el proveedor. La calidad e integridad de ambos ácidos nucleicos se corroboró mediante cuantificación mediante espectrofotometría en BioPhotometer (Eppendorf<sup>®</sup>) y a través de su visualización en geles de agarosa al 1.5%.

## **TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

Para el RNA se efectuó transcripción reversa utilizando Omniscript RT Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) y Random Nonamers (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Es importante mencionar que todas las reacciones de RT, así como las reacciones de PCR, se llevaron a cabo utilizando un termociclador Gradient Palm Cycler (Corbett Research<sup>®</sup>).

## **DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

A partir de las secuencias de referencia que se encuentran la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para cada uno de los genes se diseñaron oligonucleótidos para detectar las mutaciones genéticas asociadas a LMA. Cada uno de los oligonucleótidos diseñados (Cuadro 2) fue analizado con el servidor OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) y el programa CLC Sequence Viewer 7.6.1 (QIAGEN<sup>®</sup>). La síntesis de los oligonucleótidos se solicitó a la compañía ELIM Biopharm<sup>®</sup>.

## **DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES**

Para cada una de las determinaciones se realizaron ensayos previos para encontrar las condiciones óptimas en base al método Taguchi de diseño de experimentos, donde se utilizó una matriz L4 para analizar tres variables: temperatura de alineamiento, tiempo de alineamiento y número de ciclos. La tabla 2 presenta los oligonucleótidos diseñados para cada gen y los tamaños esperados de los fragmentos amplificados. Se utilizó QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) en las determinaciones “screening” de las mutaciones y Q5<sup>®</sup> High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs<sup>®</sup>) para los productos que posteriormente se secuenciaron. Únicamente para el caso de las mutaciones en CEBP $\alpha$  se utilizó adicionalmente Q-solution (QIAGEN<sup>®</sup>), debido al alto contenido de GC en el gen, en una concentración del 10% para cada reacción.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para determinar cada una de las mutaciones seleccionadas.**

MUTACIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS	ÁCIDO NUCLEICO	AMPLICON
FLT3-ITD	5'- TATGAAAGCCAGCTACAGATGG -3'	DNA	308 pb
	5'- ACGGCAACCTGGATTGAGACTC -3'	RNA	218 pb
FLT3-TKD	5'- TGTGTTACAGAGACCTGGC -3'	DNA	444 pb
	5'- GGATAACTGAACTAAGTGCAAG -3'		
KIT-ITD	5'- TGTGTTACAGAGACCTGGC -3'	RNA	215 pb
	5'- CCATAT GACCAGACATCACTCT -3'		
KIT-TKD	5'- ACACCCTGTTCACTCCTTTG CTG -3'	DNA	675 pb
	5'- CAGTCATGGCCGCATCTGAC -3'	RNA	304 pb
NPM1	5'- GTATTCACAGAGACTTGGCAGCC-3	DNA	236 pb
	5'- TGTGTGATATCCCTAGACAGGA -3'		
CEBP $\alpha$ p42	5'-GTATTCACAGAGACTTGGCAGCC-3'	RNA	153 pb
	5'- CAGGTGCCATCCACTTCACAG -3'		
CEBP $\alpha$ p30	5'- GTAACTCTCTGGTGGTAGAATG-3'	DNA	294 pb
	5'- AAGCAAAGGGTGGAGTTCATC -3'		
DNMT3 $\alpha$	5'- T GGT TCT CTT CCC AAA GTG G -3'	RNA	327pb
	5'- AAGCAAAGGGTGGAGTTCATC -3'		
IDH1	5'- CGACTTCTACGAGGCGGAGC -3'	DNA	265 pb
	5'-CTTGGCCTTCTCCTGCTGCC-3'	RNA	
IDH2	5'- CCTGGACGGCAGGCTGGAGC -3'	DNA	640 pb
	5'- GACCAAGGAGCTCTTGGCAG -3'	RNA	
IDH1	5'- GGTATTTGGTTTCCCAGTCCAC-3'	DNA	238 pb
	5'- CTCTCCATCCTCATGTTCTTGG-3'	RNA	
IDH1	5'- GGCACGGTCTTCAGAGAAGC-3'	DNA	216 pb
	5'- CTTGCTTAATGGGTGTAGATACC-3'		
IDH2	5'- GGCACGGTCTTCAGAGAAGC-3'	RNA	170 pb
	5'- TCACTTGGTGTGTAGGTTATCTC-3'		
IDH2	5'- GTTCAAGCTGAAGAAGATGTGG-3'	DNA	312 pb
	5'- CCATCTTTTGGGGTGAAGACC-3'	RNA	228 pb

## SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Los productos de PCR de cada uno de los genes y para cada una de las muestras se secuenciaron por el método de Sanger en la empresa ELIM Biopharm<sup>®</sup>. Los electroferogramas obtenidos fueron corregidos de manera manual. Las secuencias originadas de cada gen se compararon con las secuencias de referencia del genoma GRCh38/hg38 de la base de datos de la UCSC (<https://genome.ucsc.edu>). Se utilizó el sistema bioinformático Finch TV 1.5 y el servidor POLY PEAK PARSER (<http://yosttools.genetics.utah.edu/PolyPeakParser/>) para el análisis y depuración de los electroferogramas. Por su parte, se utilizaron CLC Sequence Viewer (QIAGEN<sup>®</sup>) y Clustal X 2.1 para alinear y comparar las secuencias obtenidas con las de referencia. Todos los cambios encontrados se buscaron en la base de datos del NCBI y de la UCSC.

## MODELADO PROTEÍCO Y ANÁLISIS

Los modelados de la región intracelular de FLT3 fueron preparados a partir de la estructura cristalizada correspondiente de la base de datos del RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) con el código 1RJB. El servidor SWISS-MODEL<sup>53</sup> (<https://swissmodel.expasy.org>) fue utilizado para predecir los cambios en la estructura de FLT3, cuando diferentes ITDs en tamaño y secuencia son insertados en alternativas regiones funcionales del dominio juxtamembrana. Para limitar el número de estructuras se utilizó un diseño de experimentos factorial, sin embargo, debido a incompatibilidades en las especificaciones, 6 de las construcciones fueron eliminadas, de esta manera se construyeron solamente 90 modelados de los 96 posibles. El servidor QMEAN<sup>54</sup> (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>), se utilizó para analizar la calidad de las estructuras. Se analizaron cada uno de los modelados efectuados empleando el servidor CASTp<sup>55</sup> (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/>) para obtener el área y volumen de la cavidad catalítica. La visualización y análisis comparativo fue efectuado utilizando UCSF CHIMERA<sup>56</sup> 1.11 y SWISS-Pdb Viewer<sup>53</sup> 4.1.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS versión 22. Para todos los resultados se presentan los datos descriptivos de media, desviación estándar y error

estándar. Los datos obtenidos de los modelados de FLT3 se analizaron mediante ANOVA multifactorial para las variables categóricas y cuantitativas, añadiendo un post hoc de Bonferroni. Además, para las variables cuantitativas se determinó un coeficiente de correlación de Pearson y posteriormente se efectuó regresión lineal. Todo el análisis estadístico fue realizado empleando un  $\alpha=0.05$  (2 colas).

## 7. RESULTADOS

### MUESTRAS

Se obtuvieron un total de 12 muestras, de las cuales 58% (7) fueron de sangre periférica y 42% (5) de médula ósea. El rango de edades fue entre 19 y 77 años de edad, con una media de 42.33 años, desviación estándar de 20.056 años y error estándar de 5.78. El 66.6% (8) de las muestras se encontraron entre los 22 y 63 años. Con respecto al sexo, 50% fueron del sexo masculino y 50% del sexo femenino. La procedencia de las muestras fue principalmente de la zona centro y sur del país (Figura 1): Morelia, Michoacán (1); León, Guanajuato (2); Querétaro, Querétaro (1); Puebla, Puebla (3); Chontalpa, Tabasco (1); Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (2); Mérida, Yucatán (2).

### ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Con el fin de conocer los marcadores citogenéticos presentes en nuestras muestras se realizaron estudios de cariotipo. El análisis citogenético mostró los siguientes resultados: 4 de las muestras presentaron un cariotipo normal, 3 contenían anomalías citogenéticas numéricas, 2 rearrreglos cromosómicos estructurales y 3 presentaban cariotipos complejos. Las muestras con anomalías citogenéticas numéricas mostraron los cariotipos 46 XX, -16, +mar ; 47 XX, +mar/ 45 XX, -22; y 46 XX, +11, -20. Por su parte los rearrreglos cromosómicos estructurales fueron t(15;17)(q22;q12); PML-RARA y del(9)(q22q33). De los cariotipos complejos, uno se asoció a t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1, otro a inv(16)(p13.1q22); CBFβ-MYH11 y el último a t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1.

Al evaluar el número de eventos que afectaban a cada cromosoma pudimos determinar que en nuestra población el cromosoma 11 es el más afectado con 5 eventos, seguido por los cromosomas 1, 5 y 22 que presentaron 4 eventos cada uno y los cromosomas 9 y 12 con 3. Por el contrario, los cromosomas 4, 13, 18 y X no se vieron afectados en ninguna de las muestras (Figura 2A).

Los rearrreglos genéticos identificados fueron: 21% translocaciones recíprocas, 21% aparición de un cromosoma adicional, 21% pérdida de un cromosoma, 18% delección de una parte del cromosoma, 6% que se añadiera material de origen desconocido, 6% que se

produjera un cromosoma derivativo, 3% duplicación de una región y 3% una inversión (Figura 2B). Al conjuntar esto se puede observar que los extremos del cromosoma son preferentemente modificados, y la región centromérica tiende a mantenerse, siendo el cromosoma 14 y 16 las únicas excepciones donde esto no ocurrió.

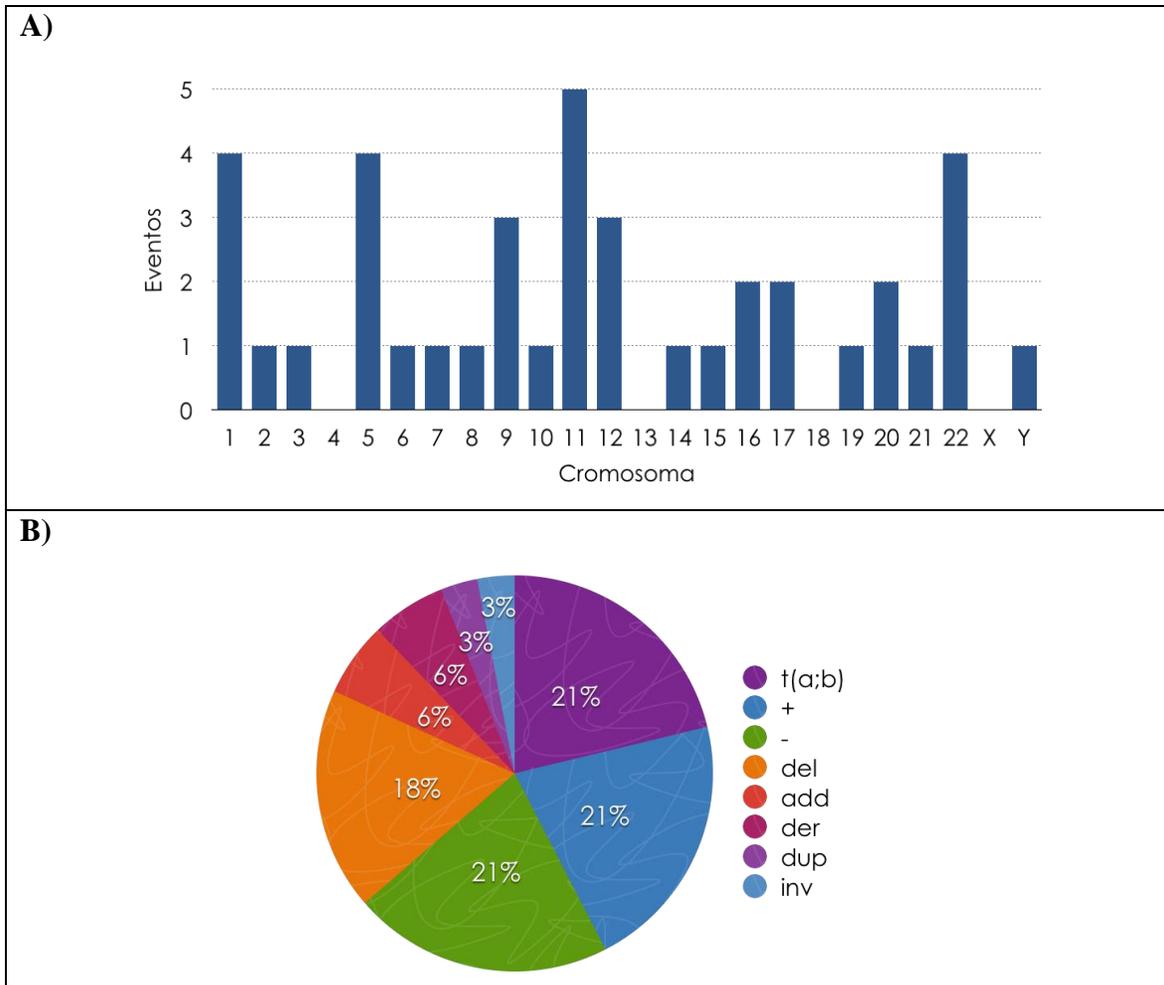


**Figura 2. Procedencia de las muestras empleadas en el estudio.** Las muestras se obtuvieron principalmente de la zona centro y sur del país. Cada círculo muestra el número de muestras por estado.

### ANÁLISIS GENÉTICO

Ahora, para conocer aquellos marcadores no identificables por cariotipo, se realizó en análisis genético de nuestras muestras. A partir de la secuenciación de los productos de amplificación generados para determinar las mutaciones a las que se hace referencia en materiales y métodos, se encontró que dos de nuestras muestras presentaban la mutación FLT3-ITD, encontrándose en ambos casos dos clonas distintas. Las dos clonas de la

primera muestra afectaron la región funcional JM-S y  $\beta$ 1-Sheet respectivamente, mientras que las clonas de la segunda muestra solamente afectaban la región JM-S. En todos los casos el inicio del ITD fue en diferentes puntos. No se encontraron mutaciones codificantes en KIT, NPM1, CEBP $\alpha$ , DNMT3a, IDH1 e IDH2, sin embargo, algunas muestras presentaron mutaciones puntuales en regiones intrónicas del gen KIT (Figura 3).



**Figura 3. Eventos de anomalías por cromosoma y tipo de alteración.** Se muestran los gráficos del número de eventos que afectaban a cada cromosoma dentro de las muestras analizadas y el tipo de alteración cromosómica

Categoría	Marcador	Muestras									
Alteración Citogenética	t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1										
	inv(16)(p13.1q22) ó t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11										
	t(15;17)(q22;q12);PML-RARA										
	t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A										
	t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214										
	inv(3)(q21.3q26.2) ó t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM										
	t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1										
	t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1										
	Cariotipo complejo										
	Otro										
RTK	FLT3										
	KIT										
Otro	NPM1										
FT Mieloide	CEBPα										
DNA Metilación	DNMT3α										
	IDH1										
	IDH2										

**Figura 4. Interrelación de los marcadores genéticos analizados.** El diagrama muestra la distribución de las mutaciones dentro de las muestras analizadas, así como su asociación entre ellas. Las líneas representan el tipo de alteración y las columnas representan pacientes en el estudio. RTK. Receptor tirosina-cinasa. FT. Factor de Transcripción.

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

A manera de conocer los efectos en la estructura de FLT3 debido a las mutaciones FLT3-ITD se desarrollaron una serie de modelados. Todos los modelados generados se consideraron de buena calidad y adecuados para el análisis estructural debido a que los QMEAN Z-scores obtenidos fueron entre 0.67 y 0.87, siendo más de la mitad encima de 0.75.

El análisis comparativo reveló que el dominio catalítico es mantenido sin modificaciones significativas, sugiriendo que todas las estructuras son funcionales. Las otras estructuras

que se mantuvieron sin cambios notables son los lóbulos N y C en el TKD1. Por el contrario, el cambio más notable fue la pérdida de la estructura secundaria por parte del TKD2 cuando los ITDs eran grandes. Las duplicaciones de un mismo codón produjeron cambios más notables en la estructura de FLT3 que aquellos que duplicaban una secuencia de codones, siendo significativa esta diferencia en el tamaño del área catalítica ( $p=0.022$ ). La desviación estándar se mantiene entre el ITD que duplica el mismo codón y una secuencia corta de codones con  $86.385 \text{ \AA}^2$  y  $88.927 \text{ \AA}^2$  respectivamente, sin embargo se incrementa al duplicarse una secuencia larga de codones con  $123.916 \text{ \AA}^2$ .

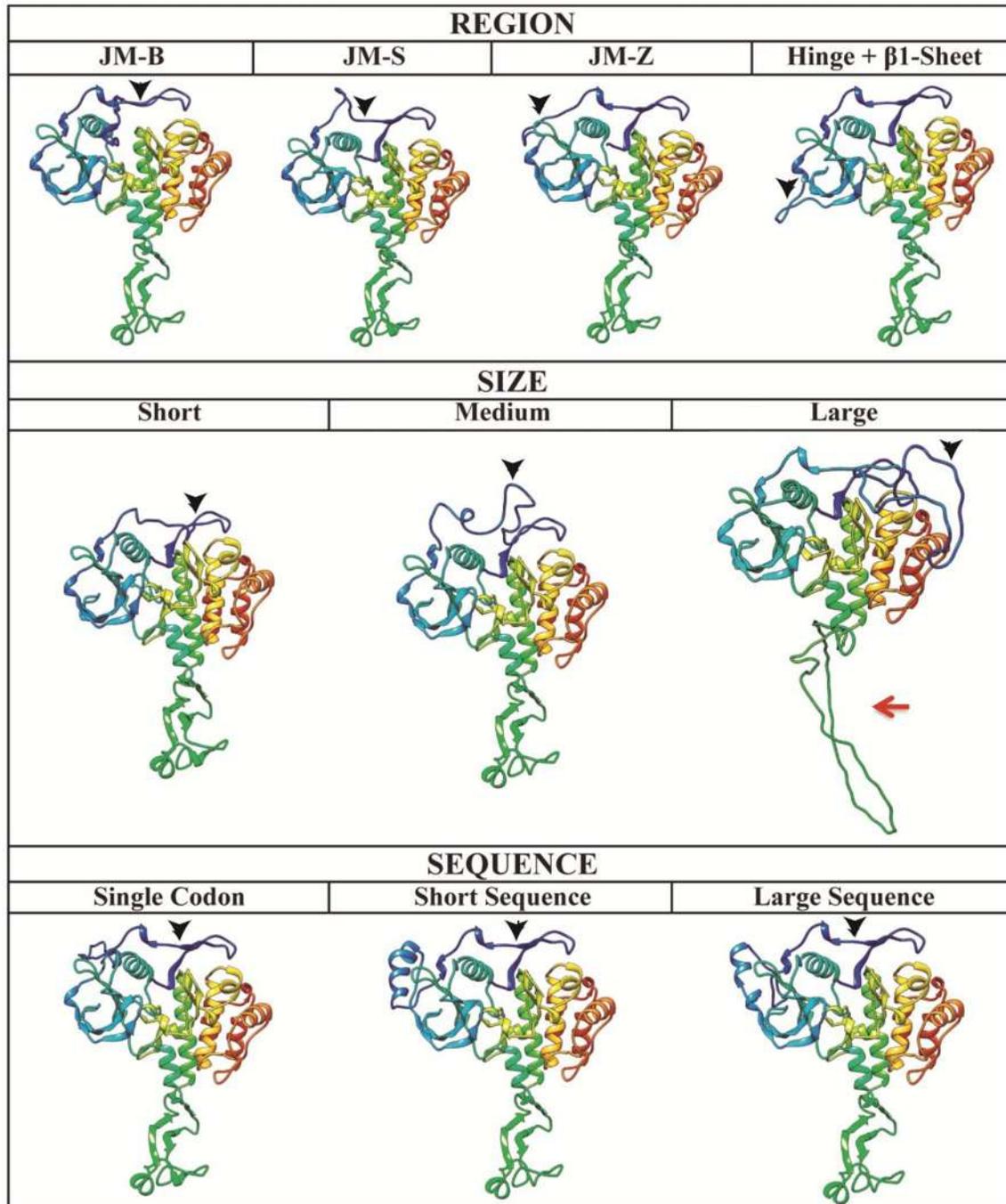
La secuencia de aminoácidos insertados en el ITD generalmente se presentaba como un fragmento desorganizado, sin estructura secundaria o en algunos casos con estructura de  $\beta$  hoja emergiendo de la estructura central (Figura 4). Debido a esto, diversas interacciones entre el lóbulo N y la región juxtamembrana se pierden. Además, el “loop” formado por los aminoácidos R656 a K647 tiene un movimiento ascendente que alarga la cavidad catalítica (Figura 5).

El análisis de la cavidad catalítica de FLT3 mostró que existe una tendencia de incrementar el área de esta región conforme el tamaño del ITD se incrementa. El ANOVA multifactorial presentó significancia en la intercepción ( $p<0.001$ ), el tamaño del ITD ( $p=0.009$ ), así como la relación entre el tamaño del ITD y la secuencia que se repite ( $p=0.023$ ). Sin embargo, es importante mencionar que la dispersión de los datos también se incrementa con el tamaño del ITD, las estructuras con un ITD corto presentaron una desviación estándar de  $44.660 \text{ \AA}^2$ , mientras que los ITD medianos tuvieron una desviación de  $73.192 \text{ \AA}^2$  y los largos con  $123.916 \text{ \AA}^2$ . Posteriormente se calculó un coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo un valor de  $0.423$  ( $p<0.001$ ), indicando una relación lineal en este fenómeno. De esta manera, basados en los resultados de la regresión lineal ( $p<0.001$ ), se determinó una siguiente fórmula para predecir el incremento de la cavidad catalítica:

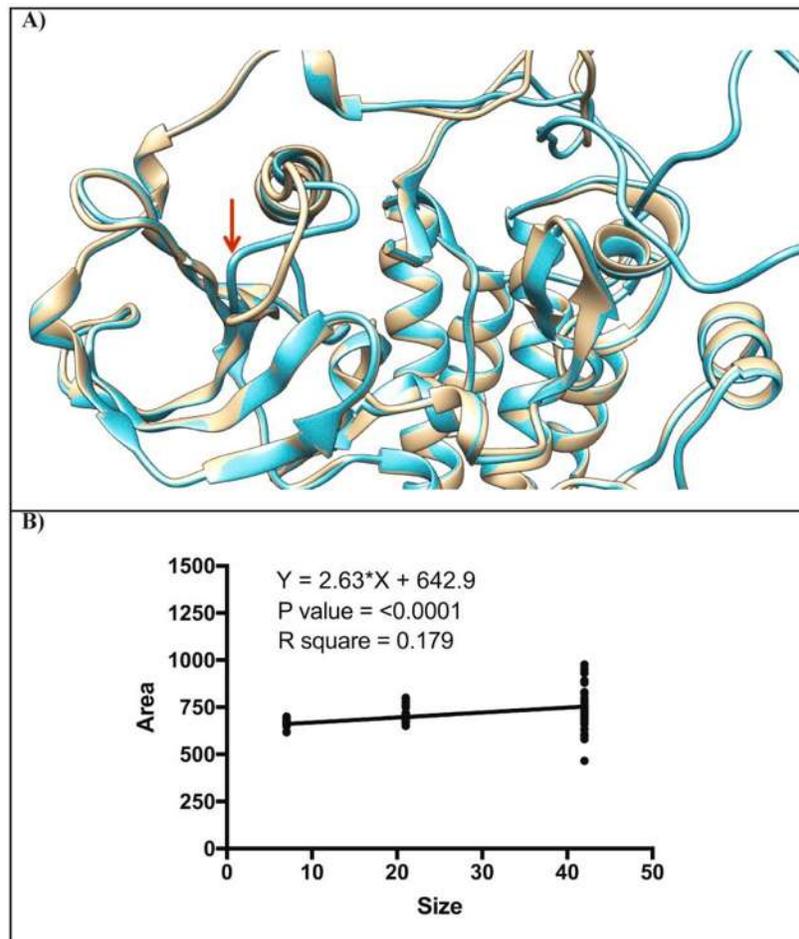
$$\text{Área de la Cavidad Catalítica } (\text{\AA}^2) = 2.630 (X) + 642.918$$

Donde X significa el número de codones o aminoácidos que se insertan en el ITD.

Por lo tanto, por cada codón o aminoácido añadido al ITD la cavidad catalítica incrementa en  $2.630 \text{ \AA}^2$ .



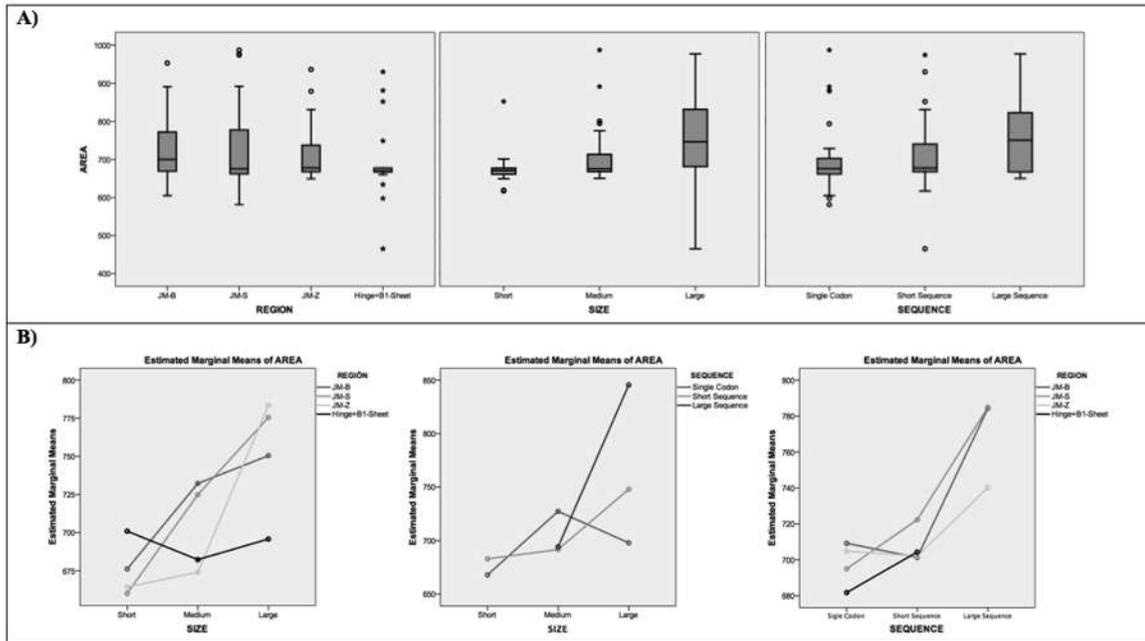
**Figura 4. Predicción de los cambios en la estructura de FLT3 por efecto de la mutación ITDs.** La figura muestra como los diferentes ITDs modifican la estructura intracelular de FLT3, sin embargo, en general la estructura se preserva. La flecha roja señala la pérdida de la estructura secundaria por parte del TKD2 y flechas negras las posiciones de los ITDs.



**Figura 5. Incremento del área de la cavidad catalítica en FLT3.** A) Movimiento ascendente del “loop” formado por los aminoácidos R656 a K647. La estructura gris corresponde a la proteína silvestre de FLT3, mientras que la estructura azul a FLT3-ITD. La flecha señala el punto que se modifica. B) Regresión lineal del incremento de la cavidad catalítica debido al tamaño del ITD.

Por otra parte, las regiones funcionales donde ocurre la inserción del ITD no fueron significativas ( $p=0.855$ ), sin embargo al graficar las medias marginales del área comparando las regiones funcionales y el tamaño del ITD, puede observarse que las mutaciones en las regiones JM-B, JM-S y JM-Z tienen un incremento significativo del área al aumentar el tamaño del ITD, por el contrario las mutaciones en la región del hinge y la hoja  $\beta 1$  no presentan este incremento en el área catalítica (Figura 6).

Por último, se desarrollaron los modelados para ambas clonas de las dos muestras que presentaron la mutación FLT3-ITD y se determinó el área catalítica utilizando la fórmula predicha, con lo cual pudimos observar que si bien los resultados no son exactos si son cercanos entre sí, ajustándose perfectamente utilizando los intervalos de confianza al 95% (IC95%) (Figura 7)



**Figura 6. Efecto de los diferentes ITDs insertados en diferentes regiones funcionales de la región juxtamembrana del ITD. A) Datos descriptivos de las variables analizadas. B) Interacciones entre las variables con respecto del área en la cavidad catalítica.**

Muestra 2		
	Clona 1	
	Posición del ITD: JM-S	
	Área calculada: 669 Å <sup>2</sup>	
	Área teórica: 700.778 Å <sup>2</sup>	
	IC 95%(638. 885-762.693)	
	Clona 2	
	Posición del ITD: Hoja β1	
	Área calculada: 667 Å <sup>2</sup>	
	Área teórica: 698.148 Å <sup>2</sup>	
	IC 95%(637. 469-758.848)	
Muestra 10		
	Clona 1	
	Posición del ITD: JM-S	
	Área calculada: 678 Å <sup>2</sup>	
	Área teórica: 692.888 Å <sup>2</sup>	
	IC 95%(634. 437-751.158)	
	Clona 2	
	Posición del ITD: JM-S	
	Área calculada: 694 Å <sup>2</sup>	
	Área teórica: 690.258 Å <sup>2</sup>	
	IC 95%(633. 221-747.313)	

**Figura 7. Modelados de las muestras positivas a FLT3-ITD.** Se evaluó el tamaño del área catalítica mediante CASTp (Área Calculada) y utilizando la formula predicha (Área Teórica). Los resultados no son exactos pero se ajustan con los IC95%. Las clonas 1 aparecen a la izquierda, mientras que las clonas dos aparecen a la derecha.

## 8. DISCUSIÓN

En México existen pocos reportes relacionados con la prevalencia de la LMA (Cuadro 3), sin contar que los datos presentados por la Secretaria de Salud contienen una infinidad de sesgos debido principalmente a un registro inadecuado de los casos, además, la valoración de estos pacientes en base a marcadores moleculares es básicamente nulo, encontrando solamente 1 de 8 reportes donde se determinan estos (únicamente citogenéticos), lo que contrasta con lo reportado por Kasi et al. (2016), quienes mencionan que para un paciente con LMA es vital conocer al menos marcadores citogenéticos, de lo contrario debe considerarse con un pronóstico desfavorable ya que va recibir un tratamiento básicamente a ciegas<sup>57</sup>.

**Cuadro 3. Reportes de LMA en Mexico.**

Referencia	Número de Casos	Subtipo FAB predominante	Marcadores Analizados	Observaciones
Mejía-Aranguré JM. et al. (2000) <sup>58</sup>	71	---	---	En diferentes años no se notifico ningún caso de AML
Fajardo-Gutiérrez A. et al (1997) <sup>59</sup>	51	M3, M4, M5	---	---
Mejía-Aranguré JM. et al. (2005) <sup>60</sup>	43	M3	---	Incidencia mayor de LPA Posible aumento de incidencia en áreas altamente contaminadas
Buitron-Santiago N. et al. (2010) <sup>61</sup>	53	M2, M4	Citogenéticos	Se excluyeron a los pacientes con LPA Promedio de edad menor al reportado (44 vs 60)
Rodriguez L. et al (2010) <sup>62</sup>	50	M2, M3	---	Incidencia de LMA menor a lo reportado
Pérez-Saldívar ML. et al. (2011) <sup>63</sup>	28	M2, M4, M1, M5	---	Alta incidencia de leucemia agudas debido al componente ambiental y socioeconómico

González-Salas WM. et al. (2012) <sup>64</sup>	95	M2, M3, M4	—	Incremento significativo en LPA
Jaime-Pérez JC. et al. (2014) <sup>65</sup>	132	M2, M4, M3, M5	—	Promedio de edad menor al reportado (32 vs 60)

Es interesante resaltar que el promedio de edad de nuestra población es menor de lo que se reporta en la bibliografía global (42.33 vs 60), presentando el mismo fenómeno otros reportes como el de Buitron-Santiago N. et al. (2010)<sup>61</sup> y Jaime-Pérez JC. et al. (2014)<sup>65</sup>, sin embargo, debido al número tan pequeño de muestras, estos datos no pueden tomarse en consideración. Además, el efecto del componente ambiental es también de considerarse, debido a que los 3 pacientes que presentaron cariotipos complejos provienen de León, Gto., Queretaro, Qro., y Chontalpa, Tabs., zonas consideradas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)<sup>66</sup> como productoras de gran cantidad de residuos peligrosos y adicionando que Chontalpa es zona petrolera. Aspecto previamente mencionado por Mejía-Aranguré JM. et al. (2005)<sup>60</sup> y Pérez-Saldívar ML. et al. (2011)<sup>63</sup>.

Con respecto a las muestras que presentaron la mutación FLT3-ITD, las asociaciones fueron diferentes a lo que se reporta en la literatura, ocurrido en muestras con cariotipo 46 X, +11, -20 y del(9)(q22q33), y no en la muestra con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA como era de esperar, sin embargo, nuevamente, debido a lo reducido de la muestra no pueden obtenerse conclusiones de estos datos. En ambos casos y ambas clonas fueron más grandes que el promedio de 52 pb reportado por Meshinchi S. et al. (2008), siendo 69 pb en las clonas de la muestra 2 y 60 pb en las clonas de la muestra 10. La zonas afectadas fueron la región JM-S y la hoja  $\beta$ 1, manteniéndose en todos los casos sin modificación la región JM-Z.

Con respecto de los otros genes (NPM1, KIT, DNMT3A, IDH1, IDH2), al no encontrar alguna muestra que presentara alguna de las mutaciones asociadas a LMA no quiere decir que estas no se encuentren, simplemente que la muestra fue muy pequeña para identificarlas y por lo tanto aún queda sin resolver el patron de asociación entre mutaciones en la población mexicana.

Por otra parte, aunque en el análisis estadístico las regiones donde se producen los ITDs no fueron significativos ( $p=0.855$ ), el gráfico de medias marginales estimadas del área entre las regiones y el tamaño del ITD muestra que las mutaciones en las regiones JM-B, JM-S y JM-Z producen un crecimiento considerable en el área de la cavidad catalítica de acuerdo con el tamaño ITD, sin embargo, las mutaciones en la región del hinge y la hoja  $\beta 1$  no mostraron este crecimiento, manteniéndose más estable la estructura de FLT3. Estos datos podrían explicar algunas observaciones descritas anteriormente, en 2006 Stirewalt D.<sup>44</sup> reportó, en población estadounidense, que el aumento de tamaño en el ITD se asociaba con la disminución de la supervivencia global, la respuesta completa y la supervivencia libre de recaída; sin embargo, en ese mismo año, Ponziani V. et al.<sup>45</sup>, en población italiana, no observó ninguna correlación entre el tamaño del ITD y el pronóstico de los pacientes. De manera contrastante, Kusec R. (2006)<sup>67</sup>, en población croata, encontró una mejor supervivencia en el subgrupo con ITDs largos. Dos años más tarde, Gale RE. et al.<sup>46</sup>, en población británica, reportó que los ITD grandes comprometen la remisión completa de los pacientes pero no la supervivencia global; por su parte Meshinchi S. et al.<sup>68</sup>, en población estadounidense, observó que la longitud del ITD es un factor de riesgo para la supervivencia global, con ninguna diferencia en la tasa de respuesta completa. Por último, en 2011 Barragán E. et al.<sup>69</sup>, en población española, presentó diferencias significativas en el momento de la recidiva y la supervivencia de acuerdo con el crecimiento del tamaño de ITD. Es importante tener en cuenta que de todos estos trabajos sólo Meshinchi S. et al. menciona la región en la que se producen las mutaciones, siendo principalmente en el JM-S y JM-Z. Sin embargo, tomando como base otros trabajos con poblaciones similares, como Griffith J. et al.<sup>35</sup> y Kayser S. et al.<sup>36</sup> en población de británica y alemana respectivamente, determinaron que las mutaciones se producen principalmente en la región del hinge y la hoja  $\beta 1$ . Esto nos habla de un componente genético, la población estadounidense, donde la mutación se produce principalmente en JM-S y JM-Z, tienen un marcado crecimiento en la cavidad catalítica y por lo tanto en la actividad de la enzima, lo que se refleja en el pronóstico clínico; mientras que en la población europea, las mutaciones se han producido en la región del hinge y la hoja  $\beta 1$ , donde la cavidad catalítica no tienen un considerable

crecimiento y por lo tanto, los informes no presentaron diferencias significativas en la supervivencia.

## 9. CONCLUSIONES

Debido a la diversidad genética en la población mexicana, el presente estudio permitió optimizar las diferentes determinaciones para las mutaciones analizadas, observar a pequeña escala su comportamiento en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda dentro de esta población y proponer efectos de FLT3-ITD dentro de la estructura de la proteína a través de métodos bioinformáticos; sin embargo, los datos obtenidos son insuficientes para responder a nuestra hipótesis, siendo necesario continuar investigando, aumentando el número de muestras y posiblemente agregando algunos otros marcadores y otras variables que afecten su estructura, para que de esta manera se tengan datos representativos del comportamiento y asociación entre las mutaciones en el gen FLT3 y los otros marcadores citogenéticos, genéticos y asociados a modificaciones epigenéticas.

## 10. REFERENCIAS

- 1 Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R. Hematopoyesis. *Cancerología* 2007; **2**: 95–107.
- 2 Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Enfermedades de los leucocitos, ganglios linfáticos, bazo y timo. In: *Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional*. Elsevier España, S.L.U.: Barcelona, 2015, pp 579–628.
- 3 Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasias. In: *Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional*. Elsevier España, S.L.U.: Barcelona, 2015, pp 265–340.
- 4 Nichol JN, Assouline S, Miller WH. The Etiology of Acute Leukemia. In: *Neoplastic Diseases of the Blood*. Springer New York: New York, NY, 2013, pp 177–198.
- 5 Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P *et al*. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; **22**: 915–931.
- 6 Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; **368**: 1894–1907.
- 7 Liesveld JL, Lichtman MA. Acute Myelogenous Leukemia. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ *et al*. (eds). *Williams Hematology*. McGraw-Hill Education: United States of America, 2016.
- 8 Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010; **24**: 35–63.
- 9 Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; **3**: 179–198.
- 10 Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2011; **4**: 36.
- 11 Chen S-J, Shen Y, Chen Z. A panoramic view of acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2013; **45**: 586–7.
- 12 Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; **22**: 5834–5847.
- 13 Kolachana P, Subrahmanyam V V, Meyer KB, Zhang L, Smith MT. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and

- in the bone marrow in vivo. *Cancer Res* 1993; **53**: 1023–6.
- 14 Hiraku Y, Kawanishi S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res* 1996; **56**: 5172–8.
- 15 Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002; **21**: 7435–7451.
- 16 Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J *et al.* Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* 1993; **82**: 3705–11.
- 17 Estey E, Thall P, Kantarjian H, Pierce S, Kornblau S, Keating M. Association between increased body mass index and a diagnosis of acute promyelocytic leukemia in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; **11**: 1661–4.
- 18 Lichtman MA. Obesity and the Risk for a Hematological Malignancy: Leukemia, Lymphoma, or Myeloma. *Oncologist* 2010; **15**: 1083–1101.
- 19 Marcucci G, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education: United States of America, 2015, pp 678–687.
- 20 Longo DL, Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1136–1152.
- 21 Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1051–62.
- 22 Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; **100**: 2292–302.
- 23 Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman J. (ed.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4a ed. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, 2008.
- 24 Cazzola M. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood* 2016; **127**:

- 2361–2364.
- 25 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**: 2391–2405.
- 26 Thompson MA. Molecular Genetics of Acute Leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA *et al.* (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2009, pp 1791–1807.
- 27 Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev* 2013; **27**: 13–22.
- 28 Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 650–65.
- 29 Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; : 178–84.
- 30 Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 1738–52.
- 31 Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; **91**: 1101–34.
- 32 Rosnet O, Mattei M-G, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics* 1991; **9**: 380–385.
- 33 Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; **100**: 1532–42.
- 34 Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 4263–4269.
- 35 Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F *et al.* The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Mol Cell* 2004; **13**: 169–178.
- 36 Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J *et al.* Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009;

- 114**: 2386–2392.
- 37 Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K *et al.* Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; **10**: 1911–8.
- 38 Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, Gerbing RB, Rocnik JL *et al.* Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008; **111**: 4930–4933.
- 39 Parcels BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 2006; **24**: 1174–84.
- 40 Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; **12**: 1333–7.
- 41 Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; **2013**: 220–6.
- 42 Chan PM. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. *Protein Cell* 2011; **2**: 108–15.
- 43 Li L, Bailey E, Greenblatt S, Huso D, Small D. Loss of the wild-type allele contributes to myeloid expansion and disease aggressiveness in FLT3/ITD knockin mice. *Blood* 2011; **118**: 4935–45.
- 44 Stirewalt DL. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; **107**: 3724–3726.
- 45 Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P *et al.* The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; **20**: 2074–6.
- 46 Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK *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**: 2776–84.

- 47 Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F *et al.* FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 2003; **102**: 2198–2204.
- 48 Capriles PV, Guimarães AC, Otto TD, Miranda AB, Dardenne LE, Degraeve WM. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC Genomics* 2010; **11**: 610.
- 49 Huynh T, Khan J, Ranganathan S. A comparative structural bioinformatics analysis of inherited mutations in  $\beta$ -D-Mannosidase across multiple species reveals a genotype-phenotype correlation. *BMC Genomics* 2011; **12**: S22.
- 50 Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernandez-Lopez JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras A V *et al.* The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science (80- )* 2014; **344**: 1280–1285.
- 51 Bates SE. Classical cytogenetics: karyotyping techniques. *Methods Mol Biol* 2011; **767**: 177–90.
- 52 McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds.). *ISCN 2016. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*. KARGER: Kuba Libri, Prague, 2016.
- 53 Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; **22**: 195–201.
- 54 Benkert P, Tosatto SCE, Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 2008; **71**: 261–277.
- 55 Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: W116–W118.
- 56 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004; **25**: 1605–1612.

- 57 Kazi S, Massie D, Stevenson D, Culligan D. 322 Impact of unsuccessful karyotyping in AML - a single centre study. In: *The Authors. British Journal of Haematology*. John Wiley & Sons, 2016, p 132.
- 58 Mejía-Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Paredes-Aguilera R, Flores-Aguilar H, Martínez-García MDC. Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud Publica Mex* 2000; **42**: 431–437.
- 59 Fajardo-Gutierrez A, Navarrete-Martinez A, Reynoso-Garcia M, Zarzosa- Morales ME, Mejia-Arangure M, Yamamoto-Kimura LT. Incidence of malignant neoplasms in children attending Social Security hospitals in Mexico City. *Med Pediatr Oncol* 1997; **29**: 208–212.
- 60 Mejía-Aranguré JM, Bonilla M, Lorenzana R, Juárez-Ocaña S, de Reyes G, Pérez-Saldivar ML *et al*. Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer* 2005; **5**: 33.
- 61 Buitrón-Santiago N, Arteaga-Ortiz L, Rosas-López A, Aguayo Á, López-Karpovitch X, Crespo-Solís E. Experiencia del INCMNSZ en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda. Cohorte 2003-2008. *Rev Investig Clin* 2010; **62**: 100–108.
- 62 Rodríguez L, González-Ilano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A *et al*. Artículo original Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex* 2010; **11**: 78–81.
- 63 Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L *et al*. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011; **11**: 355.
- 64 González-Salas WM, Olarte-Carrillo I, Gutiérrez-Romero M, Horacio M-FE, Marínez-Murillo C, Ramos-Peñafiel CO. Frecuencia de leucemias agudas en un hospital de referencia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2012; **50**: 167–171.
- 65 Jaime-Pérez JC, Brito-Ramirez AS, Pinzon-Uresti MA, Gutiérrez-Aguirre H, Cantú-Rodríguez OG, Herrera-Garza JL *et al*. Characteristics and Clinical Evolution of Patients with Acute Myeloblastic Leukemia in Northeast Mexico: An

- Eight-Year Experience at a University Hospital. *Acta Haematol* 2014; **132**: 144–151.
- 66 SEMARNAT. Residuos. In: *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: Mexico, D. F., 2012, pp 317–361.
- 67 Kusec R. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; **108**: 405–406.
- 68 Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJP, Huismans DR, Munske L *et al*. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; **102**: 2387–94.
- 69 Barragan E, Montesinos P, Camos M, Gonzalez M, Calasanz MJ, Roman-Gomez J *et al*. Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica* 2011; **96**: 1470–1477.