

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina de Grado presentada para la obtención del Título de Licenciatura en Bioquímica

Análisis de metilación en promotores de genes candidatos en pacientes con Leucemia mieloblástica aguda de Uruguay

Autor: Florencia Salvarrey Baubeta

Tutora: Dra. Mónica Cappetta Sapriza

Co-tutora: Dra. Silvana Pereyra Lepre

Laboratorio de Epidemiología Genética

Departamento de Genética

Facultad de Medicina, Udelar

Montevideo, Uruguay

Julio 2023

1. Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle profundamente a mi tutora de tesis Dra. Mónica Cappetta y co-tutora Dra. Silvana Pereyra, por todas sus enseñanzas, su confianza en mí y por el apoyo en todo momento para poder terminar la tesis de grado. Especialmente quiero agradecerles por sus palabras motivadoras cuando más las necesité y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo e iniciarme en este maravilloso mundo de la investigación. Gracias por su paciencia, constancia y consejos tanto como estudiante como de la vida misma.

Agradezco sinceramente a los integrantes del Departamento de Genética de Facultad de Medicina y especialmente a los compañeros de la isla. Con ellos pude compartir muchos momentos felices, salidas, congresos, reuniones y más. Muchas gracias por todos esos momentos que formaron parte de mi vida y bienvenidos todos los nuevos momentos que vendrán.

Quiero agradecer enormemente a toda mi familia por su amor, apoyo, motivación y palabras de aliento durante todo el transcurso de mi carrera. Especialmente le agradezco a mi madre por incentivarme a investigar y apoyar mi vocación por la ciencia y la genética humana desde pequeña. Le agradezco también a mi padre por su aliento y confianza constante en mí para que terminara esta tesis y la carrera.

Agradezco eternamente a mi pareja Andrés por su amor, respeto, apoyo incondicional y motivación contante. Por soportar mis horas de estrés y días largos de estudio sin fines de semana. Gracias por ser mi compañero de vida y todos tus consejos, ambos sabemos que el mundo de la ciencia no es fácil, pero nos reconfortamos porque sabemos qué hacemos lo que nos gusta.

Muchas gracias a mis amigas, especialmente para Andy, Vero y Lore por su comprensión cuando no podía juntarnos, gracias por siempre estar ahí y todo su apoyo, son muy importantes para mí.

A todos los mencionados mi más sincero agradecimiento, sin ustedes no hubiera podido lograrlo.

2. Índice

1. AGRADECIMIENTOS.....	2
2. ÍNDICE.....	3
3. RESUMEN.....	5
4. INTRODUCCIÓN.....	6
4.1. GENERALIDADES SOBRE LAM	6
4.2. MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LAM	9
4.3. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LAM	10
4.4. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN DE LAM EN URUGUAY	12
5. OBJETIVO GENERAL:.....	15
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	15
6. METODOLOGÍA:	16
6.1. FASE DE MUESTREO	16
6.1.1. Población de estudio:	16
6.2. FASE DE LABORATORIO	17
6.2.1. Tratamiento de las muestras de ADN con bisulfito de sodio.	17
6.2.2. Selección de regiones promotoras y diseño de oligonucleótidos.	17
6.2.3. Amplificación por PCR. Pruebas a diferentes temperaturas.	19
6.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	20
6.2.5. Secuenciación de las regiones amplificadas con Minlon.....	21
6.3. FASE DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	21

6.3.1.	Análisis bioinformático	21
7.	RESULTADOS	23
7.1.	AMPLIFICACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES CANDIDATOS	23
7.2.	AMPLIFICACIÓN DE PROMOTORES EN MUESTRAS DE PACIENTES CON LAM Y CONTROLES SANOS.....	26
7.3.	SECUENCIACIÓN DE LOS PROMOTORES GÉNICOS	26
7.4.	METILACIÓN DIFERENCIAL EN SITIOS CPG DE PACIENTES CON LAM	27
7.4.1.	Gen <i>KIT</i>	28
7.4.2.	Gen <i>TET2</i>	30
7.4.3.	Gen <i>PTEN</i>	32
8.	DISCUSIÓN	34
9.	CONCLUSIONES	42
10.	BIBLIOGRAFÍA	43

3. Resumen

La leucemia mieloblástica aguda (LAM) es la leucemia aguda más frecuente en adultos mayores. En estudios genómicos recientes se describieron alteraciones somáticas genéticas y epigenéticas en genes candidatos recurrentes en pacientes con LMA con importancia clínica y terapéutica. Actualmente, se utilizan marcadores citológicos, citogenéticos y moleculares para definir el pronóstico. No obstante, algunos de los pacientes presentan cariotipo normal al diagnóstico sin otros marcadores pronósticos disponibles, lo que dificulta predecir su evolución.

El objetivo de este trabajo fue detectar nuevos marcadores pronósticos epigenéticos en pacientes con LAM de Uruguay. Para esto, evaluamos los niveles de metilación de los promotores de los genes candidatos *TET2*, *KIT*, *PTEN* y *RUNX1* en 17 muestras de ADN de pacientes con LAM al debut de la enfermedad y 3 controles sanos. Se amplificaron los promotores génicos a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio y se secuenciaron utilizando la plataforma MinION (Nanopore). Se diseñó un pipeline de análisis bioinformático para determinar los niveles de metilación de cada CpG en las regiones promotoras estudiadas, y se correlacionaron con los datos clínicos de los pacientes. Los promotores estudiados se encuentran desmetilados en la mayoría de los individuos. Sin embargo, detectamos sitios CpG específicos hipermetilados en los promotores de *TET2* y *KIT* en pacientes con una manifestación extremadamente aguda de la enfermedad con evolución rápidamente desfavorable, en comparación con el control. Estos resultados preliminares deben ser validados en un muestreo mayor. Actualmente se están analizando otros promotores génicos con el fin de ayudar la estratificación clínica de los pacientes con LAM en Uruguay.

Palabras claves: leucemia, metilación del ADN, promotores, biomarcadores

4. Introducción

4.1. Generalidades sobre LAM

La leucemia mieloblástica aguda (en adelante LAM), es una afección maligna hematopoyética que se caracteriza por la acumulación de células blásticas en la médula ósea y la sangre (Verma et al., 2021). Se considera un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneo, presentando mutaciones somáticas y translocaciones cromosómicas funcionalmente distintas (Akalin et al., 2012). La presencia de diversas alteraciones genéticas adquiridas en células de la línea mieloide altera los mecanismos normales de diferenciación, proliferación y autorrenovación celular. Como consecuencia, en la médula ósea se acumulan precursores mieloides inmaduros con capacidad de replicación que son incapaces de diferenciarse hacia células hematopoyéticas maduras. De esta manera, el espacio medular es ocupado por células tumorales inmaduras que impiden la hematopoyesis normal y provocan insuficiencia medular seguida de las consecuencias clínicas derivadas de esto (Amor-Vigil & Hernandez-Miranda, 2019).

La LAM es una enfermedad de baja frecuencia a nivel mundial que corresponde al 1,0 % de todos los cánceres (NIH, 2023). En Uruguay, la Sociedad de Hematología lleva un registro de los nuevos casos cada año. En 2018 y 2019 se diagnosticaron 92 casos nuevos de LAM en cada año y en 2020 se diagnosticaron 123 casos nuevos. La incidencia en Uruguay se estima entre 2,7 a 3,8 /100.000 habitantes por año (Boada, 2020). Esta cifra es similar a la incidencia de LAM en países desarrollados; por ejemplo, en Estados Unidos la incidencia de LAM es de 4,1 /100.000 habitantes por año según los casos de 2016 a 2020 (NIH, 2023).

En cuanto a los rangos etarios, LAM suele tener una mayor prevalencia en los adultos mayores de 60 años, los cuales en general tienen un mal pronóstico. Esta característica también se mantiene en Uruguay donde la mediana etaria entre 2018 y 2020 fue de 64 y 67 años respectivamente (Boada, 2020). Por este motivo, la edad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar LAM con un pronóstico desfavorable. Según el registro nacional de LAM en Uruguay los pacientes menores de 65 años tienen una mortalidad de 44,1 %, mientras que en los pacientes mayores de 65 años la tasa de mortalidad asciende a 91,4 % (Boada, 2020).

Desde el punto de vista genético LAM se caracteriza por ser una enfermedad muy heterogénea, de aparición rápida, progresiva y frecuentemente quimiorresistente. Estas características hacen que sea fundamental la clasificación y la estratificación del riesgo en el momento del diagnóstico para tomar decisiones certeras sobre el tratamiento (Tazi et al., 2022).

El evento iniciador en las etapas más tempranas del desarrollo de LAM ha sido un tema ampliamente estudiado y controvertido. En un estudio con 1540 muestras de pacientes con LAM se identificó al menos 1 mutación conductora en el 96 % y 2 o más mutaciones conductoras en el 86 % de las muestras (Papaemmanuil et al., 2016). Estas mutaciones impulsoras adquiridas somáticamente, crean una ventaja de crecimiento para las células que las poseen. Además, el microambiente que rodea a estas células puede influir en la competitividad jugando un rol significativo en la proliferación celular maligna. Se sabe que las mutaciones se acumulan linealmente a lo largo de la vida de un individuo, mientras que la incidencia de cáncer aumenta exponencialmente con la edad. Este aspecto podría ser particularmente relevante en pacientes de edad avanzada, ya que los clones mutados pueden permanecer durante más tiempo y desarrollar la enfermedad sólo cuando el microambiente y el contexto celular se vuelve favorable (Zjablovskaja & Florian, 2020).

Los genes involucrados en el desarrollo de LAM han sido ampliamente estudiados. Según The Cancer Genome Atlas Research (TCGA) Network, los genes con mutaciones asociadas a LAM se pueden organizar según su función biológica en nueve categorías (ver Tabla 1) (Zjablovskaja & Florian, 2020). Estas categorías muestran una importante diversidad de mecanismos celulares que pueden verse afectados tanto en el desarrollo de LAM como durante su transcurso. En la mayoría de los casos de esta enfermedad, además de las mutaciones impulsoras, existen varias alteraciones genéticas y epigenéticas que surgen en simultáneo a lo largo de la evolución tumoral, contribuyendo a la heterogeneidad de la enfermedad. Además, la falta de síntomas en etapas tempranas y la diversidad de las manifestaciones clínicas en los pacientes, hacen que su diagnóstico y pronóstico sea particularmente complejo. Se ha planteado que LAM es el resultado de una combinación entre dos clases de mutaciones, las mutaciones de clase I, que otorgan ventajas de proliferación y supervivencia a la célula, y las mutaciones de clase II que afectan los procesos de diferenciación

celular y apoptosis. No obstante, algunas mutaciones encontradas recientemente que afectan a los modificadores epigenéticos no se encuentran en ninguna de estas dos clases (Roussel et al., 2020).

Tabla 1: Genes involucrados en el desarrollo de LAM organizados según su función biológica.

Función biológica relacionada	Ejemplo de genes
Genes de señalización activados	<i>FLT3</i>
Genes relacionados a la metilación del ADN	<i>DNMT3A, TET2, IDH2</i>
Genes modificadores de la cromatina	genes de fusión <i>MLL-X, ASXL1, KDM6A, EZH2</i>
Gen que codifica la nucleofosmina	<i>NPM1</i>
Genes del factor de transcripción mieloide	<i>RUNX1, CEBPA</i>
Fusiones de factores de transcripción	<i>PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1</i>
Genes supresores de tumores	<i>TP53, WT1</i>
Genes del complejo de espliceosoma	<i>U2AF1</i>
Genes del complejo de cohesina	<i>SMC1A, SMC3, STAG2, RAD21</i>

Hoy en día en Uruguay se utilizan las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para estratificar a los pacientes según la citomorfología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular (mutaciones en genes *FLT3*, *NPM1*, *c-KIT* y *CEBPA*). La categorización de los pacientes según su citogenética se realiza en base a las translocaciones genéticas balanceadas más frecuentes: *t(8;21)(q22;q22)*, *inv(16)(p13.1;q22)* o *t(16;16)(p13.1;q22)*, *t(15;17)(q22;q12)* y *t(9;11)(p22;q23)* (Papaemmanuil et al., 2016).

La clasificación genómica actual de los pacientes se propuso en 2016 por Papaemmanuil *et al.* (2016) en donde se identifican 11 clases moleculares, cada una con distintas características diagnósticas y resultados clínicos. Esta clasificación ha sido revisada y actualizada recientemente en Tazi *et al.* (2022), proponiendo 16 clases moleculares basadas en la citogenética y el estado mutacional de 32 genes (Sargas et al., 2023).

La investigación de LAM ha avanzado en gran medida en los últimos años, pero debido a su gran heterogeneidad el estudio de esta enfermedad se va complejizando y es difícil mantener actualizadas las recomendaciones de los organismos de salud para lograr una correcta clasificación de los pacientes. En el momento del debut de la enfermedad la clasificación y la estratificación según

el riesgo son claves para decidir el tratamiento. Tradicionalmente se clasifica a los pacientes con esta patología en tres categorías de riesgo: favorable, intermedio y adverso.

La clasificación de pacientes propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sigue dependiendo en gran medida de los hallazgos citogenéticos en el momento del diagnóstico de LAM, que están presentes en menos del 50 % de los pacientes, por lo tanto, el resto de los pacientes con LAM presentan un cariotipo normal (Tazi et al., 2022). Por este motivo, es importante la caracterización de esta enfermedad a nivel genómico. De acuerdo con esto, varios organismos internacionales han revisado sus recomendaciones de estratificación de pacientes priorizando las anomalías genéticas para establecer el diagnóstico, pronóstico y la selección de tratamiento. Entre ellos se encuentran la actualización de las recomendaciones de la OMS, la nueva clasificación de Consenso Internacional (ICC) y la estratificación de riesgo de la European LeukemiaNet (ELN), todas actualizadas en 2022 (Sargas et al., 2023).

4.2. Marcadores moleculares asociados a LAM

Aunque la LAM tiene una gran heterogeneidad genética, se han encontrado mutaciones puntuales recurrentes que se han empleado en la estratificación del riesgo durante las últimas décadas. Sin embargo, con el uso de la secuenciación de próxima generación (NGS), se han descubierto nuevas mutaciones que tienen relevancia diagnóstica y pronóstica de gran importancia para todos los pacientes con LAM, pero más aun para los pacientes con cariotipo normal (Roussel et al., 2020).

Actualmente se ha recomendado evaluar clínicamente en el debut de la enfermedad el estado mutacional de los siguientes genes: *ASXL1*, *BCOR*, *CEBPA*, *EZH2*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2* y *TP53*, por definir el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes (Sargas et al., 2023). Además, se han reportado ampliamente en la bibliografía, mutaciones en otros genes asociados a LAM como *ABL1*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *TET2*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *HRAS*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NRAS*, *PTPN11*, *SETBP1*, *WT1*, *BAALC*, *ERG*, *MN1* (Roussel et al., 2020; Sargas et al., 2023). En el futuro, estos genes podrían utilizarse como marcadores moleculares, incorporándolos al *pool* de análisis realizados en el debut de LAM. De todas formas, a

pesar de la actualización de criterios de estratificación del riesgo, existe una alta mortalidad y tasa de recaída, por lo que el resultado de la enfermedad sigue siendo variable principalmente para la clase de riesgo intermedio, que es un grupo muy heterogéneo y menos conocido (Makkar et al., 2023).

Como ya se ha descrito anteriormente, varias de las mutaciones encontradas en los genes asociados a LAM, están presentes en modificadores epigenéticos como *TET2*, *DNMT3A*, *IDH*, *EZH2*, entre otros. Las mutaciones en estos genes coexisten con otras alteraciones moleculares y se han observado mayormente en los pacientes con riesgo intermedio (Amor-Vigil & Hernandez-Miranda, 2019). Por este motivo, el estudio de esta categoría de genes es de especial interés para intentar estratificar a los pacientes de riesgo intermedio y asignarles un posible tratamiento. La desregulación de los modificadores epigenéticos afecta el patrón de metilación del ADN, la hidroximetilación del ADN y modificaciones de histonas como metilación, acetilación, fosforilación, etc. Como consecuencia estas mutaciones afectan una gran cantidad de funciones celulares.

4.3. Alteraciones epigenéticas en LAM

Las alteraciones epigenéticas se definen como cambios en la función de los genes que son heredables a través de divisiones celulares pero que no son causados por cambios en la secuencia del ADN. Las marcas epigenéticas desempeñan un papel crucial en varios procesos moleculares como la apertura, el cierre y la remodelación de la arquitectura de la cromatina para la formación del estado de eucromatina o heterocromatina, que es responsable de la regulación génica (Verma et al., 2021).

Las modificaciones epigenéticas que se analizan principalmente en el contexto de la LAM son la metilación del ADN, la hidroximetilación del ADN, la acetilación de histonas y la metilación de histonas y lisina (Zjablovskaja & Florian, 2020). Particularmente, la metilación del ADN ocurre como resultado de la transferencia de un grupo metilo al quinto carbono en el nucleótido de citosina por parte de las ADN metiltransferasas (DNMT) (por ejemplo, DNMT3A), lo que lleva a la formación de 5-metilcitosina (5mC). Esto ocurre principalmente en el contexto de una citosina seguida de una guanina en la secuencia de ADN (sitios CpG) (Zjablovskaja & Florian, 2020).

El efecto de las modificaciones epigenéticas sobre la expresión génica depende del tipo de modificación y región génica involucrada. Por ejemplo, la metilación del ADN tiene una función principalmente represiva, ya que inhibe la asociación entre los factores de unión al ADN y sus regiones objetivo de ADN y, al mismo tiempo, permite la unión de complejos represores específicos (Zjablovskaja & Florian, 2020).

Normalmente en el genoma de células normales de personas sanas, las secuencias CpG se encuentran metiladas. Sin embargo, en las islas CpG y en sus regiones cercanas (dentro de los 2 kb) estos sitios CpG se encuentran desmetilados (Nishiyama & Nakanishi, 2021). Muchas de estas regiones desmetiladas del ADN se encuentran en potenciadores y en el 70 % de los promotores cumpliendo funciones de regulación de la expresión génica (Duy et al., 2020). Aproximadamente un 90 % del genoma humano presenta regiones de CpG de baja densidad (1–3 CpG/100 pb) y el resto del ADN presenta una densidad de ≥ 5 CpG/100 pb, en donde se incluyen las islas CpG. La metilación del ADN en los dinucleótidos CpG es el cambio epigenético más frecuente en el cáncer en general donde se ha encontrado una hipometilación de todo el genoma en regiones de baja densidad de CpG y una hipermetilación específica en sitios dentro de las islas CpG. De esta forma, se cree que la hipermetilación del ADN lleva al silenciamiento de los genes supresores de tumores y los genes que controlan la inestabilidad genómica lo que promueve la tumorigénesis. Por otro lado, la hipometilación del ADN en todo el genoma causa una desregulación de los retrotransposones provocando inestabilidad cromosómica y una posible sobreexpresión de oncogenes (Magi et al., 2023).

Particularmente en LAM, las investigaciones han indicado que la metilación del ADN no se distribuye aleatoriamente en el genoma, sino que se organiza en patrones bien definidos. Se ha visto que los perfiles de 5mC permiten clasificar a los pacientes con LAM en subtipos biológicamente definidos y con distintos resultados clínicos. En la mayoría de los casos, los subtipos de LAM presentaron una firma de hipermetilación muy marcada en comparación con las células normales, pero también se encontró que algunos grupos presentaron un patrón de hipometilación (Figueroa et al., 2010). Por este motivo, la evidencia de una correlación entre los factores epigenéticos, el

subtipo citogenético molecular y el resultado en LAM hace que la metilación del ADN sea un marcador molecular interesante para el pronóstico de esta enfermedad (Krali et al., 2021).

Por otro lado, así como las mutaciones se acumulan a lo largo de la vida se ha descrito que las alteraciones epigenéticas también aumentan con el envejecimiento. Estudios sobre los patrones epigenéticos de pacientes con LAM de diferentes rangos de edades (jóvenes y adultos mayores) mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Un estado epigenético alterado puede resultar en un perfil transcripcional alterado y en consecuencia un deterioro de las funciones de la célula. De esta manera, las células envejecidas de pacientes con LAM pueden tener diferentes alteraciones epigenéticas y comportamientos celulares diferentes en comparación con las células de pacientes jóvenes, a pesar de presentar las mismas alteraciones genéticas (Zjablovskaja & Florian, 2020).

4.4. Antecedentes de Investigación de LAM en Uruguay

La gran mayoría de las investigaciones y estudios clínicos se realizan con pacientes de EEUU y Europa, por lo tanto, los resultados están sesgados a esas poblaciones y sus características genéticas y epigenéticas. En Uruguay se ha trabajado desde hace varios años en el diagnóstico y estratificación de pacientes con LAM en el Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española de Socorros Mutuos (AEPSM). Este grupo de investigación desarrolló un análisis de mutaciones puntuales en los genes *FLT3*, *NPM1*, *c-KIT* y *CEBPA* mediante las técnicas de PCR, PCR-RFLPs, ASO-PCR y secuenciación. También se incorporaron la técnica de FISH para identificar marcadores de valor pronóstico como los reordenamientos de 11q23, inv(16)/t(16;16) y t(15;17). Todos estos estudios se encuentran disponibles actualmente para los pacientes al momento del diagnóstico (Uriarte, 2009).

El constante avance en la investigación de LAM marca un desafío a la hora de realizar el diagnóstico y pronóstico de esta patología tanto en el momento del debut de la enfermedad como durante su evolución, pudiendo requerir una reclasificación del riesgo. Por tal motivo, este grupo de investigación se propuso profundizar y actualizar el algoritmo de estratificación de los pacientes vigente en ese momento en Uruguay. A finales del año 2015 se inicia el proyecto de investigación

titulado “Relevancia pronóstica del perfil genético y epigenético integrado en Leucemia Mieloide Aguda” (ANII ALI_2_2013_1_4204). Este proyecto conformó una alianza estratégica entre la AEPSM y el Dpto. de Genética de la Facultad de Medicina de la UdelaR. Su objetivo fue el estudio de la contribución de mutaciones genéticas al fenotipo clínico y sobrevida global, utilizando técnicas genómicas como la secuenciación masiva de nueva generación en muestras de pacientes con LAM del Uruguay. Además, se analizó el estado global de metilación del ADN, así como la detección de metilación de promotores de genes asociados a LAM. Los resultados obtenidos en el proyecto de investigación en LAM de Uruguay proporcionan un importante punto de partida para determinar características clínicas, genéticas y epigenéticas de los pacientes propios de esta región. De esta manera, se pudieron obtener frecuencias de mutaciones presentes en el debut de la enfermedad en nuestra población, cuyos resultados completos se encuentran en vías de publicación (Dell’ Oca et al., 2018; Elizondo, 2020). Este trabajo de tesis forma parte de este proyecto de investigación.

Como se ha explicado anteriormente, es importante poder estratificar a los pacientes con LAM en grupos pronósticos al momento del diagnóstico. Para lograr una correcta clasificación se han estudiado una gran variedad de alteraciones citogenéticas y mutaciones en genes candidatos para LAM que se usan actualmente. Sin embargo, aún hay una gran cantidad de pacientes que presentan un cariotipo normal y un pronóstico incierto. Por este motivo, desde hace varios años se han investigado nuevos marcadores moleculares que expliquen la gran heterogeneidad de esta enfermedad, como por ejemplo las modificaciones epigenéticas. A diferencia de las mutaciones, las modificaciones epigenéticas son potencialmente reversibles y podrían emplearse para desarrollar y optimizar nuevos tratamientos. Por ejemplo, se ha estudiado el uso de agentes inhibidores de las DNMTs para contrarrestar la hipermetilación aberrante presente en las leucemias, con la intención de reactivar genes silenciados, por ejemplo, genes supresores de tumores. No obstante, este tipo de drogas no están dirigidas a un blanco específico, por lo que podrían tener consecuencias no deseadas en el paciente. Por este motivo es necesario seguir investigando posibles marcadores epigenéticos nuevos para poder explicar la complejidad de LAM y determinar qué grupos de pacientes se beneficiarían de este tipo de tratamiento.

En este trabajo presentamos el análisis de metilación de los promotores de genes candidatos asociados a LAM, por una metodología de secuenciación masiva dirigida. Analizamos una población de pacientes sanos y con LAM de nuestro país. La hipótesis de nuestro trabajo es que existen regiones de ADN con metilación diferencial en los promotores de genes asociados a LAM. El estudio de estos cambios epigenéticos podría sumarse al algoritmo de diagnóstico de los pacientes con LAM y ser utilizados como marcadores moleculares que permitan evaluar el pronóstico y mejorar el tratamiento de los pacientes.

5. Objetivo general

Evaluar el estado de metilación de promotores de genes candidatos asociados a LAM en pacientes de la población uruguaya.

5.1. Objetivos específicos

1. Puesta a punto de la amplificación de los promotores de los genes *TET2*, *PTEN*, *KIT* y *RUNX1*.
2. Detectar el estado de metilación de los sitios CpG de los promotores seleccionados por secuenciación y herramientas bioinformáticas.
3. Comparar el estado de metilación de los promotores génicos entre pacientes con LAM y controles sanos.
4. Comparar el estado de metilación de los promotores génicos entre pacientes con un desarrollo severo de la enfermedad y el resto de los pacientes con LAM.

6. Metodología

Las principales etapas que se llevaron a cabo para realizar este trabajo están clasificadas en tres fases: muestreo, laboratorio y análisis bioinformático (ver Figura 1).

6.1. Fase de Muestreo

6.1.1. Población de estudio:

Como parte del proyecto “Relevancia pronóstica del perfil genético y epigenético integrado en Leucemia Mieloide Aguda” (código: ALI_2_2013_1_4204) se tomaron muestras de ADN de sangre periférica de pacientes con LAM de Uruguay en el debut de la enfermedad y previo al inicio de cualquier tratamiento. Se estableció como criterio de inclusión para ingresar al estudio, ser adultos con LAM y tener un porcentaje de blastos mayor al 20%. Los pacientes involucrados pertenecen a varias instituciones médicas del país. En este trabajo de tesis se trabajó con 17 muestras de pacientes con LAM y 3 controles sanos tomados al azar.

El proyecto cuenta con la aprobación de los Comités de ética de la Facultad de Medicina y de la AEPSM (Exp. N° 070153-000194-15). Todas las personas participantes fueron informadas de los alcances de los estudios y autorizaron, mediante la firma de un consentimiento informado, la utilización de su muestra y datos clínicos para realizar los estudios asociados a la temática del proyecto. Todos los datos y muestras fueron tratados en forma totalmente anónima y registrados con un código que no identifica a la persona participante.

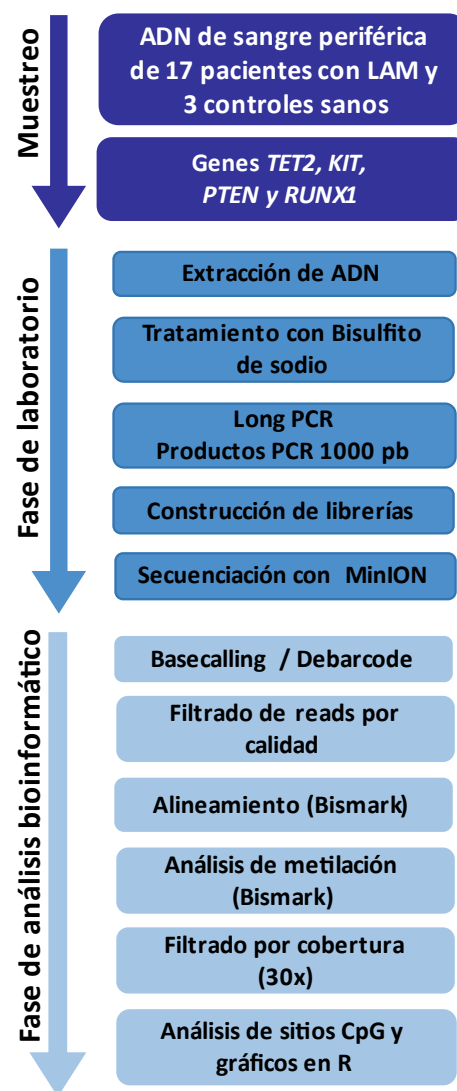


Figura 1: Esquema de las etapas de la metodología, Fase muestreo, Fase de laboratorio y Fase de análisis bioinformático.

6.2.Fase de Laboratorio

6.2.1. Tratamiento de las muestras de ADN con bisulfito de sodio.

El ADN previamente extraído de sangre periférica se trató con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ-DNA Methylation Gold (Zymo Research). Se siguió el protocolo del proveedor con la siguiente modificación durante la incubación del ADN con el reactivo de conversión: un ciclo a 98 °C por 5 minutos y tres ciclos de 98 °C por 5 minutos y 64°C por 50 minutos.

Se cuantificó la cantidad de ADN tratado utilizando Qubit 3.0 con el kit Qubit ssDNA Assay (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor dado que el ADN tratado con bisulfito de sodio tiene gran cantidad de *mismatches* y por tanto es monocatenario en la mayoría de su extensión.

6.2.2. Selección de regiones promotoras y diseño de oligonucleótidos.

Para este trabajo se seleccionaron 4 genes candidatos previamente asociados con LAM, de un panel de 30 genes previamente secuenciados para detectar variantes génicas en los mismos pacientes (Proyecto ALI_2_2013_1_4204): *TET2*, *KIT*, *PTEN* y *RUNX1*.

Las regiones promotoras de interés se visualizaron utilizando Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) utilizando el genoma de referencia GRCh38/hg38. Dentro del promotor, se seleccionaron aquellas regiones en donde se encuentran una mayor cantidad de sitios de unión a factores de transcripción y presencia de islas CpGs.

Para la amplificación de dichas regiones, se diseñaron oligonucleótidos usando el software Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems) y el software MethPrimer 2.0 (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Para el diseño de los oligonucleótidos se tuvieron en cuenta los siguientes criterios para lograr una amplificación efectiva: 1) tamaño de los oligonucleótidos óptimo entre 18 y 24 pares de bases (pb), 2) la temperatura de hibridación (*annealing*) debe ser entre 54°C y 62°C, 3) los oligonucleótidos no deben incluir sitios CpG ni SNPs dentro de su secuencia y 4) se requiere que tengan como mínimo 3 citosinas que no estén en contexto CpG. Para lograr una mejor hibridación, se optó preferiblemente por los oligonucleótidos que tuvieran G o C en su extremo 3' y un menor contenido de bases A y T en la secuencia. Para el diseño y la elección de los cebadores óptimos se siguieron los criterios publicados

por Wojdacz et al. (2008) en donde detalla las características y precauciones para lograr el mejor rendimiento de la técnica.

Para amplificar con mayor sensibilidad la región de interés se diseñaron PCRs anidadas, donde cada región es amplificada en dos rondas de amplificación consecutivas. En la primera ronda se amplifica la región de interés usando el ADN como molde, y en la segunda se amplifica una región más interna a la amplificada anteriormente, usando el producto de PCR como molde. La Tabla 2 presenta los oligonucleótidos diseñados en cada caso. El segundo juego de oligonucleótidos se diseña dentro de la región amplificada por el primer juego de oligonucleótidos. En el caso de *RUNX1* se realizó un diseño de PCR semianidada, en donde uno de los cebadores de la primera ronda se utiliza también para la segunda ronda.

El laboratorio cuenta con una amplia experiencia en el diseño de PCR de ADN tratado con bisulfito, lográndose amplificar regiones de hasta de 1200 pb. Por este motivo, durante la elección y diseño de los oligonucleótidos para este trabajo, se buscó que el tamaño de los amplicones finales fueran de aproximadamente 600 pb a 1000 pb para cada región. Siguiendo estrictamente todos los criterios detallados anteriormente, se diseñaron 19 oligonucleótidos para realizar las amplificaciones de las regiones promotoras seleccionadas (ver Tabla 2). Además, se verificó que cada par de oligonucleótidos seleccionados (tanto para la primera como para la segunda ronda de amplificación) solo hibridaran en la región de interés mediante la plataforma Bisearch (<http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch>), aceptándose hasta 3 bases no apareadas.

En la secuencia de cada oligonucleótido de la ronda 2 se adicionó una cola de bases, esta secuencia es necesaria para realizar el marcado posterior con el *barcoding* durante la preparación de la librería. La secuencia agregada en los oligonucleótidos directos es: TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC y en los reversos se les agregó la secuencia: ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC.

Tabla 2: Características de los oligonucleótidos diseñados. Tm final es la temperatura óptima utilizada en la reacción de PCR. Se marca con (*) donde no se pudo obtener una Tm óptima para la amplificación de las regiones estudiadas.

Gen	Ronda de amplificación	Oligonucleótido (5'-3')	Tm Final (°C)	Posiciones de inicio y fin	Largo del amplicón (pb)
TET2	1	GGTTTTTGAGGGTAAGGTG	56	chr4: 105146076	892
		CCTCAACCTTACAACAATCC		chr4: 105146967	
	2	GGTGGTGGAGTGTAGATTAG	57	chr4: 105146224	696
		CAAATCCTAAAAACAACCATC		chr4: 105146919	
KIT	1	GTTTGGGGAGTATTTGGTAGG	58	chr4: 54657559	1071
		CCCAACTCTAAACACAAAAAAC		chr4: 54658629	
	2	ATTTTAGGGGTGGAAAGGTG	58	chr4: 54657679	858
		AACCTACAAACAAATCCTCCC		chr4: 54658536	
RUNX1 isla A	1	TTAGGGTTAGGGTGTGTGGT	*	chr21: 34890043	980
		TCCCCTAAAATCAAAAACCTACT		chr21: 34891022	
	2	TTAGGGTTAGGGTGTGTGGT	*	chr21: 34890043	836
		AAAATTTCCCTTACCCAAAACCTT		chr21: 34890878	
RUNX1 isla B	1	TAAGGTTTTTGTAGGGAGG	*	chr21: 34886554	880
		ACCAAAAACAAAACCTTAACCTC		chr21: 34887433	
	2	TAGTGGATATTTTTGGGGATAT	*	chr21: 34886588	759
		CCCATCCTAAATCAAAAACC		chr21: 34887346	
PTEN	1	GGAGTGGTATTAGTTGGGG	57	chr10: 87861986	934
		TTACCTAAAAATCCCCCTTC		chr10: 87862919	
	2	TGTGGGTGTTTGTGTAATTAG	58	chr10: 87862075	800
		TCAATCTTAACACAAAAACAAC		chr10: 87862874	

6.2.3. Amplificación por PCR. Pruebas a diferentes temperaturas.

Se realizó la amplificación por PCR de las regiones promotoras utilizando ADN tratado con bisulfito de sodio. La primera reacción de amplificación por PCR (1ra ronda) se realizó en un volumen final de 10 µL que contiene: 0,9 µL de buffer PCR 11X, 7,62 µL de H₂O miliQ, 0,12 µL de Tris base 1M, 0,06 µL de mezcla de Taq polimerasa marca Bioline compuesto por High Taq pol (5 U/ µL) y Velocity

(2U/ μ L) en relación 20:1, 0,3 μ L de solución de cebadores directo y reverso 10 μ M cada uno y 1 μ L de ADN tratado con bisulfito con una concentración de 50-100 ng.

El programa que se utilizó en la reacción de Long PCR (Ronda 1) fue:

1 ciclo 96 °C por 5 min

35 ciclos 96 °C por 20 seg, T_m °C por 30 seg, 72°C por 2 min.

1 ciclo 72 °C por 1 min

15 °C ... ∞

La segunda reacción de amplificación por PCR (2da ronda) se realizó en un volumen final de 20 μ L que contiene: 1,8 μ L de buffer PCR 11X, 16,53 μ L de H₂O miliQ, 0,25 μ L de Tris base 1M, 0,12 μ L de mezcla de Taq polimerasa marca Bioline compuesto por High Taq pol (5 u/ μ L) y Velocity (2U/ μ L) en relación 20:1, 0,8 μ L de solución de cebadores directo y reverso 10 μ M cada uno y 0,5 μ L de producto de PCR de la 1ra ronda.

El programa que se utilizó en la reacción de Long PCR (Ronda 2) fue:

1 ciclo 96 °C por 5 min

32 ciclos 96 °C por 20 seg, T_m °C por 30 seg, 72°C por 1:30 min

1 ciclo 72 °C por 1 min

15 °C ... ∞

Se llevaron a cabo varias pruebas a diferentes temperaturas con el fin de optimizar la reacción de amplificación para cada promotor. Estas pruebas se realizaron con las temperaturas de hibridación teóricas calculadas ($T_m = 2AT + 4GC$) de cada juego de oligonucleótidos. Se buscó un equilibrio entre estas temperaturas de hibridación y la resolución e intensidad de la banda observada en la electroforesis.

6.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos amplificados fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer TBE 0,5X teñido con SYBER Safe (Invitrogen). Se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb HyperLadder™ (Bioline).

6.2.5. Secuenciación de las regiones amplificadas con Minlon

Para este trabajo se realizaron dos instancias de secuenciación. En cada una de ellas se realizó un *pool* con los productos de PCR de cada uno de los pacientes estudiados. Luego siguiendo el protocolo de Nanopore PCR Barcoding Kit (SQK-PBK004) versión: PBK_9073_v1_revK_14Aug2019 se construyeron las librerías y se realizó la secuenciación de las regiones promotoras seleccionadas. Para ambas secuenciaciones se utilizaron celdas del tipo FLO-MIN106D (R9.4.1) de 512 poros de Nanopore, corridas en un dispositivo MinION (Oxford Nanopore).

6.3. Fase de análisis bioinformático

6.3.1. Análisis bioinformático

Para el análisis de los resultados de la secuenciación se realizó un asignado de bases y *debarcoding* separando cada uno de los 12 *barcode* utilizados en cada secuenciación con el software MinKnow (Nanopore). Luego se realizó un filtrado de los *reads* obtenidos por calidad con el software Nanofilt (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>) estableciendo como filtro tener un índice de calidad mayor que 8.

El alineamiento de las secuencias filtradas se realizó con el software Bismark versión 0.22.3 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>) utilizando como genoma de referencia un genoma humano versión hg38. Los parámetros utilizados en Bismark fueron ajustados para secuencias largas. Se logró un mapeo de hasta 90% por muestra. Se extrajo información de metilación para cada citosina con la función “*bismark_methylation_extractor*”, que genera un archivo de cobertura, que contiene el porcentaje de citosinas metiladas (% 5mdC/5mdC+ dC), 5-metil-2'-deoxicitidina. Esta es una cuantificación relativa de citosinas metiladas entre conteos de *reads* con citosinas metiladas y no metiladas.

En el laboratorio se diseñó previamente un código en R para el análisis de los sitios CpGs secuenciados (Pereyra et al., 2020). En este código usa como insumo la tabla con los datos de CpGs metiladas y no metiladas obtenidos del procesamiento anterior de las secuencias. Luego se realiza un filtrado por sitios CpG quedándonos con los sitios que tengan igual o más de 30 *reads* de

cobertura. Este valor está calculado considerando la suma entre secuencias con CpG metiladas y no metiladas. Estos datos los manipulamos utilizando el paquete *GenomicRanges* (Lawrence et al., 2013) de *Bioconductor*, con el genoma de referencia utilizado en este trabajo (hg38). Aplicando el paquete *GenomicRanges* y *rtracklayer* (Lawrence et al., 2009) realizamos un filtrado de los sitios CpG por posiciones de las regiones promotoras de interés obtenidas de *Genome Browser*. De esta forma excluimos las secuencias inespecíficas de los análisis posteriores. Luego se obtuvo una tabla para cada gen con los sitios CpG y los niveles de metilación correspondientes para cada paciente y los controles sanos. Las tablas finales permitieron visualizar los resultados en representaciones gráficas realizadas en Rstudio con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016). Para cada región promotora se realizaron gráficas de porcentaje de metilación (%5mC/5mC+C) en función de la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción (tss, obtenido de *Genome Browser*). Los sitios CpGs se categorizaron por pacientes con LAM y controles sanos. En algunos casos los pacientes se clasificaron como pacientes con LAM y pacientes con LAM severos, estos últimos definidos como aquellos que fallecieron dentro de los primeros 45 días post diagnóstico.

7. Resultados

7.1. Amplificación de regiones promotoras de los genes candidatos

Se logró poner a punto la amplificación de las regiones dentro de los promotores de *TET2*, *KIT* y *PTEN* realizando diferentes pruebas de PCR. En la Figura 2 se puede observar un esquema a escala de las regiones seleccionadas. Además, se destacan las regiones que se obtendrán como resultado de la segunda ronda de amplificación con sus respectivas ubicaciones. Para lograr la amplificación de las regiones de interés se probaron varias temperaturas de hibridación comenzando por las T_m calculadas de los oligonucleótidos diseñados, tanto para la primera como para la segunda ronda de amplificación. De esta forma, se lograron identificar las temperaturas óptimas (o T_m finales, Tabla 1) para lograr la amplificación de manera adecuada. En el caso de *RUNX1*, no se obtuvo una amplificación adecuada para su posterior secuenciación en ninguna de las dos regiones seleccionadas. Para la isla A se probó para la primera ronda con 56°C, 58°C, 60°C, 61°C y 62°C y en la segunda ronda con 56°C a 59°C, pero con ninguna de estas combinaciones de T_m se obtuvo un resultado adecuado para la secuenciación. Para la isla B, se probó desde 52°C a 56°C para la primera ronda y desde 52°C a 55°C para la segunda, pero tampoco se logró una amplificación adecuada. A pesar de realizar varios intentos con diferentes combinaciones de temperaturas en ninguna de las dos islas de *RUNX1* se logró una amplificación adecuada para la posterior secuenciación.

En el caso de la amplificación de la región promotora de *TET2*, se probaron tres combinaciones de temperaturas, 54 °C, 55 °C y 56 °C para la primera ronda de amplificación y 57 °C para la segunda ronda de amplificación. Como resultado en la electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 3A), se obtuvieron bandas del tamaño esperado en todos los carriles (aproximadamente 700 pb, ver Tabla 1). Esto significa, que estas combinaciones de temperaturas son óptimas para realizar la amplificación. Por lo tanto, se logró poner a punto eficientemente la amplificación de la región promotora de *TET2*.

Para la región promotora de *KIT* también se logró una amplificación satisfactoria de las regiones buscadas. Sin embargo, para este gen, con las diferentes combinaciones de temperaturas

se obtienen diferentes intensidades de banda. En la Figura 3B, carriles 2 y 3, podemos observar uno de los resultados de la amplificación de la región promotora de *KIT*. En el carril 2 se utilizó 58 °C para ambas rondas de amplificación. En el carril 3 se utilizó 58 °C en la primer ronda y 57 °C en la segunda ronda. En ambos casos se obtuvieron bandas del tamaño esperado, sin embargo, como se puede apreciar, la combinación de temperaturas utilizadas para el carril 2 resultó ser más apropiada ya que se logró una mejor intensidad de la banda.

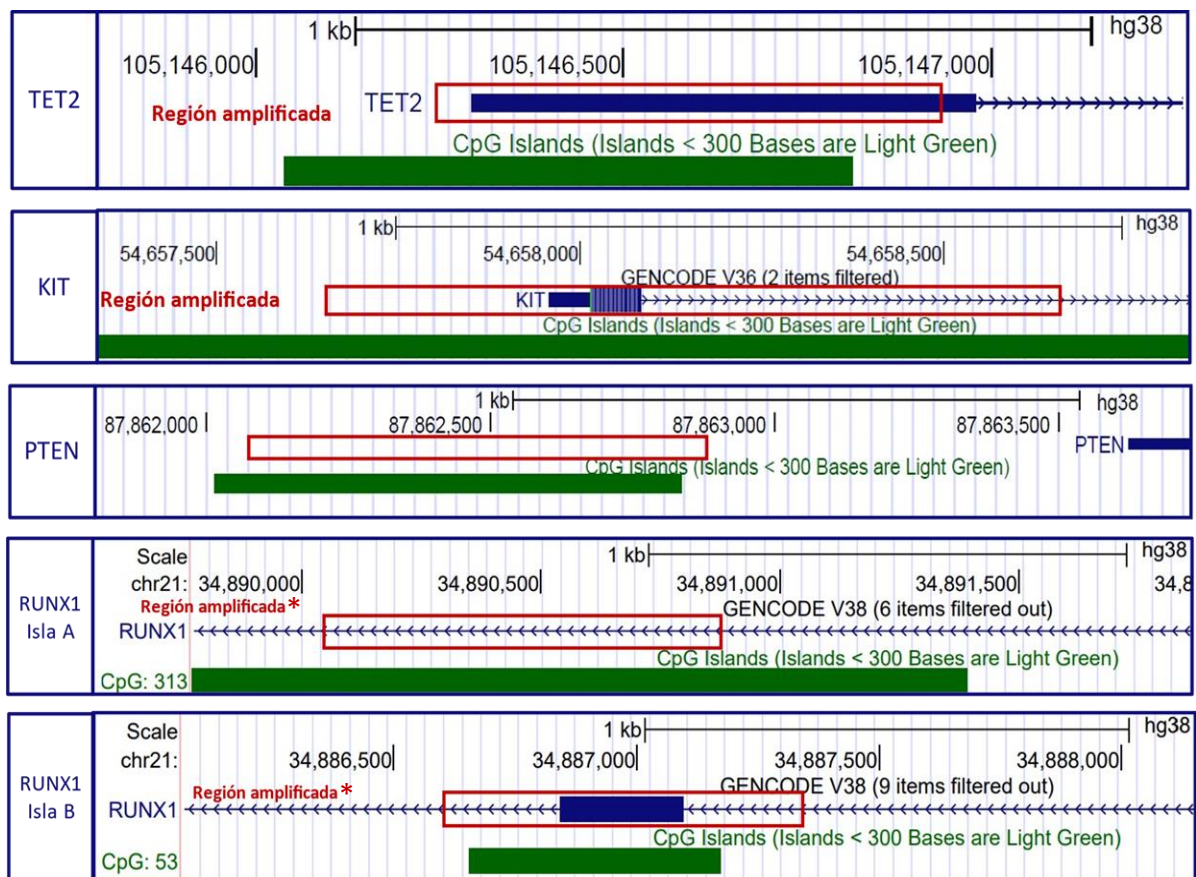


Figura 2: Esquemas del diseño de oligonucleótidos a escala para cada una de las regiones estudiadas. El recuadro rojo muestra la región final amplificada sobre la secuencia de ADN. Para RUNX1 isla A y B la región amplificada corresponde a la región final evaluada ya que no se logró la amplificación (*). Imágenes tomadas y adaptadas de Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>).

También se logró poner a punto la amplificación de la región de interés para el gen *PTEN*. En los carriles 4 y 5 (Figura 3B) se encuentran los resultados de una prueba de temperatura de esta región. En el carril 4 se utilizó 57 °C para la primera ronda y 58 °C para la segunda ronda de amplificación. En el carril 5 se utilizó 57 °C para ambas rondas de amplificación. Como podemos ver en el gel, se obtuvieron bandas en el entorno de 800 pb, para ambas condiciones de amplificación. Este tamaño de bandas coincide con el tamaño esperado del amplicón (Tabla 1). Sin embargo, la combinación de temperaturas utilizada en el carril 4 dio como resultado una banda más intensa que en el carril 5. Por este motivo, para la región de *PTEN*, seleccionamos la combinación de temperaturas utilizadas en el carril 4.

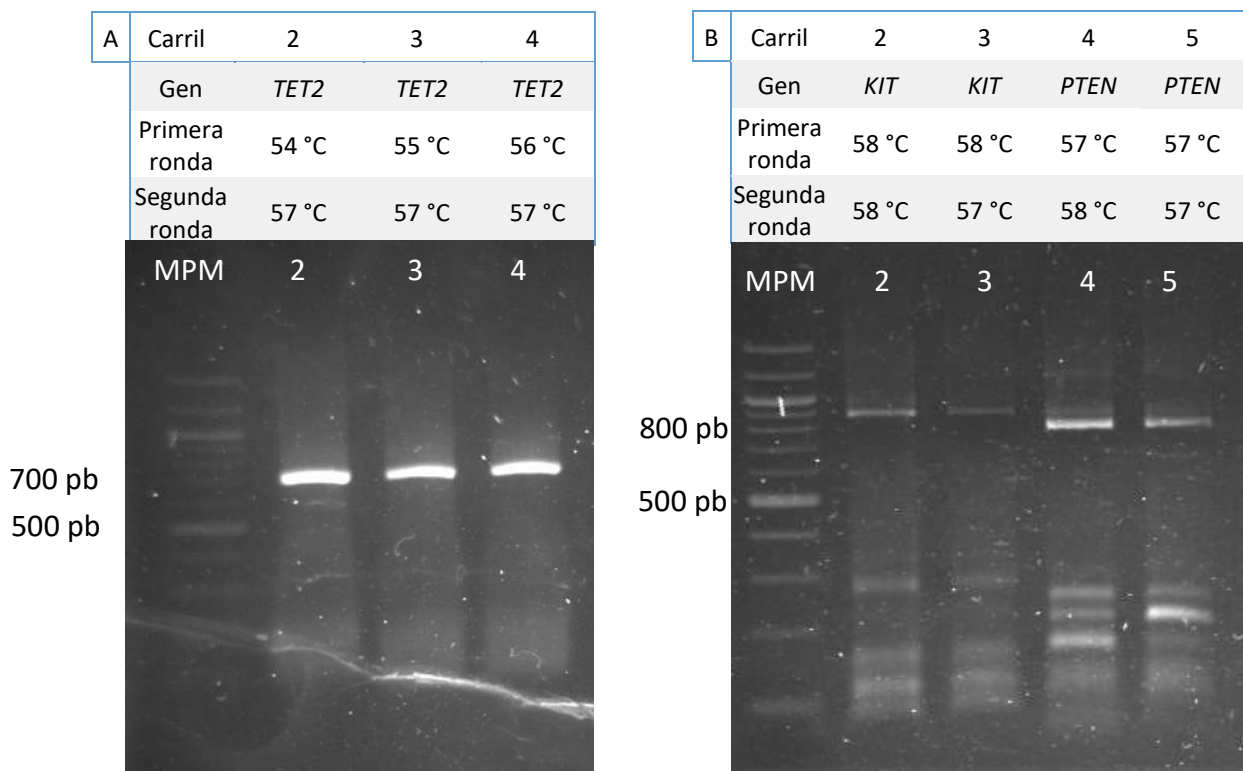


Figura 3: Optimización de la amplificación de los promotores de genes candidatos. Cada carril corresponde a una combinación de diferentes temperaturas detalladas en la tabla superior. A) Amplificación de *TET2* (696 pb) en los carriles 2, 3 y 4. B) Amplificación de *KIT* (858 pb) en los carriles 2 y 3. Amplificación de *PTEN* (800 pb) en los carriles 4 y 5. El MPM utilizado en ambos geles presenta bandas cada 100 pb y bandas más intensas en los 500 y 1000 pb.

7.2. Amplificación de promotores en muestras de pacientes con LAM y controles sanos.

Se lograron amplificar 17 muestras de pacientes con LAM para *TET2*, 19 muestras para *KIT* y 12 muestras para *PTEN*. Además, se amplificaron 3 controles sanos. El tamaño de las bandas obtenidas en los geles de electroforesis se corresponde con el tamaño esperado de amplificación para las regiones estudiadas. Además, podemos observar que las muestras de pacientes y controles amplificaron con una gran eficiencia y especificidad ya que se observan muy pocas bandas inespecíficas.

7.3. Secuenciación de los promotores génicos

Se realizaron dos secuenciaciones para este trabajo utilizando muestras de pacientes diferentes en cada una de ellas. Todas las muestras que se lograron amplificar fueron secuenciadas. Se visualizaron y ubicaron los *reads* mapeados al genoma de referencia utilizando el programa IGV versión 2.8.6. En la Figura 4 se pueden observar algunas de las secuencias obtenidas para una

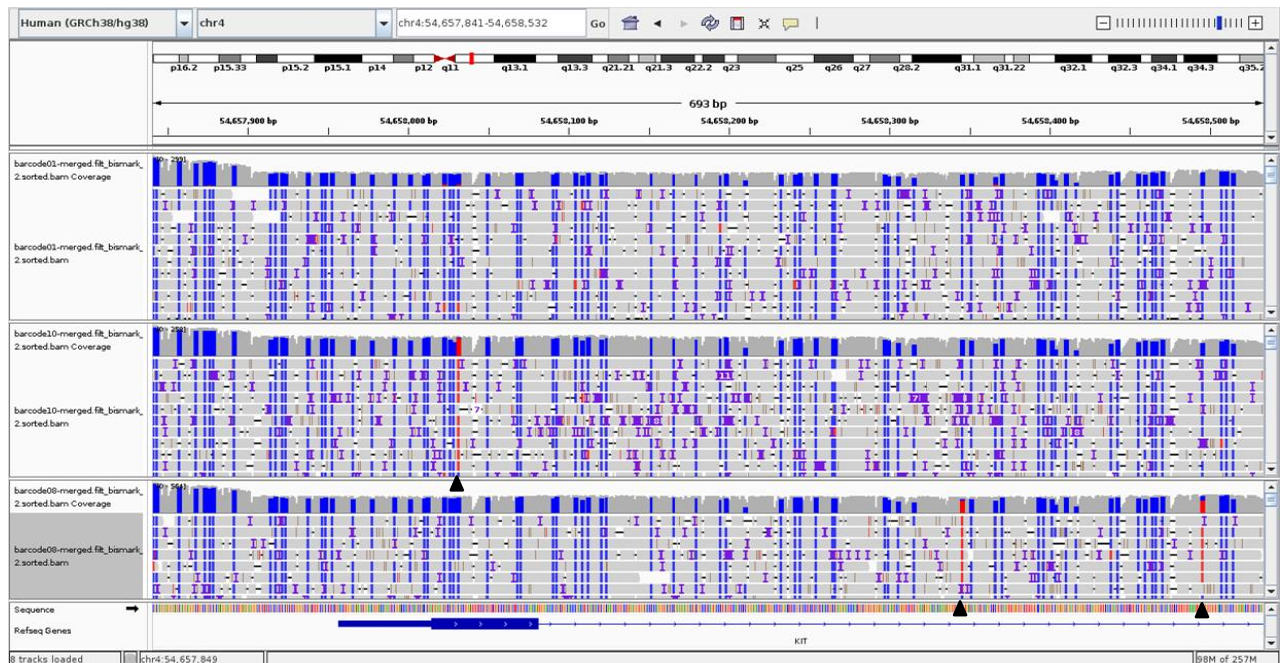


Figura 4: Secuencias obtenidas de un control sano (superior) y dos pacientes con LAM (inferiores) para la región promotora de *KIT*, visualizado en IGV. En rojo se pueden observar las citosinas metiladas, marcadas con triángulo negro.

muestra de control sano y dos pacientes con LAM mapeadas en la región estudiada del promotor de *KIT*. En rojo se marcan las citosinas metiladas, que se encuentran en los pacientes con LAM y no se encuentran en el control sano.

Todo el conjunto de datos obtenidos a partir de dos secuenciaciones independientes fue procesado con *bismark_methylation_extractor* para obtener los resultados de metilación de los sitios CpG. Luego del filtrado de lecturas por cobertura (30X) y por posición genómica se encontraron 3.168 sitios CpGs entre todos los individuos evaluados en las tres regiones promotoras. Con este conjunto de resultados se procedió a los siguientes análisis. Luego de la separación del conjunto de sitios CpGs por gen, se procedió a eliminar los sitios CpGs que no estuvieran representados en todos los individuos evaluados para cada región. De esta forma, en total se obtuvieron datos sobre los niveles de metilación de 2257 sitios CpGs en total, que corresponden a 183 sitios CpG únicos. Mas precisamente, se obtuvieron datos de niveles de metilación para 53 sitios CpGs para la región promotora de *KIT* para 14 pacientes con LAM y un control sano. Para la región promotora de *TET2* se obtuvo el nivel de metilación de 69 sitios CpGs en 14 pacientes con LAM y un control sano y para la región promotora de *PTEN* se obtuvo el nivel de metilación para 61 sitios CpGs en 9 pacientes con LAM.

7.4. Metilación diferencial en sitios CpG de pacientes con LAM

Se representó gráficamente el porcentaje de metilación ($\% \text{5m dC}/\text{5m dC} + \text{dC}$) en función de la posición relativa al TSS para cada gen. El análisis de metilación diferencial se realizó mediante la comparación de las representaciones gráficas obtenidas en cada caso. En este estudio no se pudo realizar un análisis estadístico debido a que no se obtuvieron suficientes resultados para los controles sanos y se necesitaría analizar una mayor cantidad de muestras de pacientes con LAM.

7.4.1. Gen *KIT*

La isla CpG estudiada para *KIT* tiene un tamaño de 1888 pb y el TSS se ubica dentro de esta isla CpG. Con respecto al TSS la isla se ubica desde la posición -714 hasta la posición 1173. Como se puede observar en la representación gráfica para *KIT* (Figura 5), luego del procesamiento bioinformático se obtuvieron datos de metilación para una extensión de aproximadamente 400 pb dentro de la isla CpG que incluye al TSS.

Las muestras secuenciadas para la región promotora del gen *KIT* (Figura 5), fueron categorizadas en tres clases: control sano, pacientes con LAM y pacientes con LAM severos. Como se había mencionado anteriormente, los pacientes con LAM severos son aquellos que fallecieron como máximo 45 días luego del diagnóstico.

Comparando de forma visual los niveles de metilación entre estas tres categorías de pacientes se pueden observar sitios CpG específicos hipermetilados aislados en los pacientes con LAM severos, en comparación con el control sano y los restantes pacientes con LAM. Los pacientes con LAM severos son LAM3*, LAM6*, LAM7* y LAM10* (marcados con asterisco en la Figura 5). Los sitios hipermetilados en estos pacientes severos se ubican en una región de 271 pb aproximadamente de extensión y presentan un porcentaje de metilación por encima del 50 % superando en algunos casos el 80 % de los sitios CpG metilados. Sin embargo, en el control sano y en el resto de los pacientes con LAM los niveles de metilación no superan el 20% de los sitios CpG metilados en estas ubicaciones.

Particularmente el paciente LAM10* presenta tres sitios específicos hipermetilados con un nivel de metilación que supera el 80 %, el paciente LAM3* presenta dos sitios CpG que superan el 50 % de metilación y el paciente LAM7* tiene un sitio CpG específico hipermetilado con un nivel de más del 85 % de las CpGs metiladas.

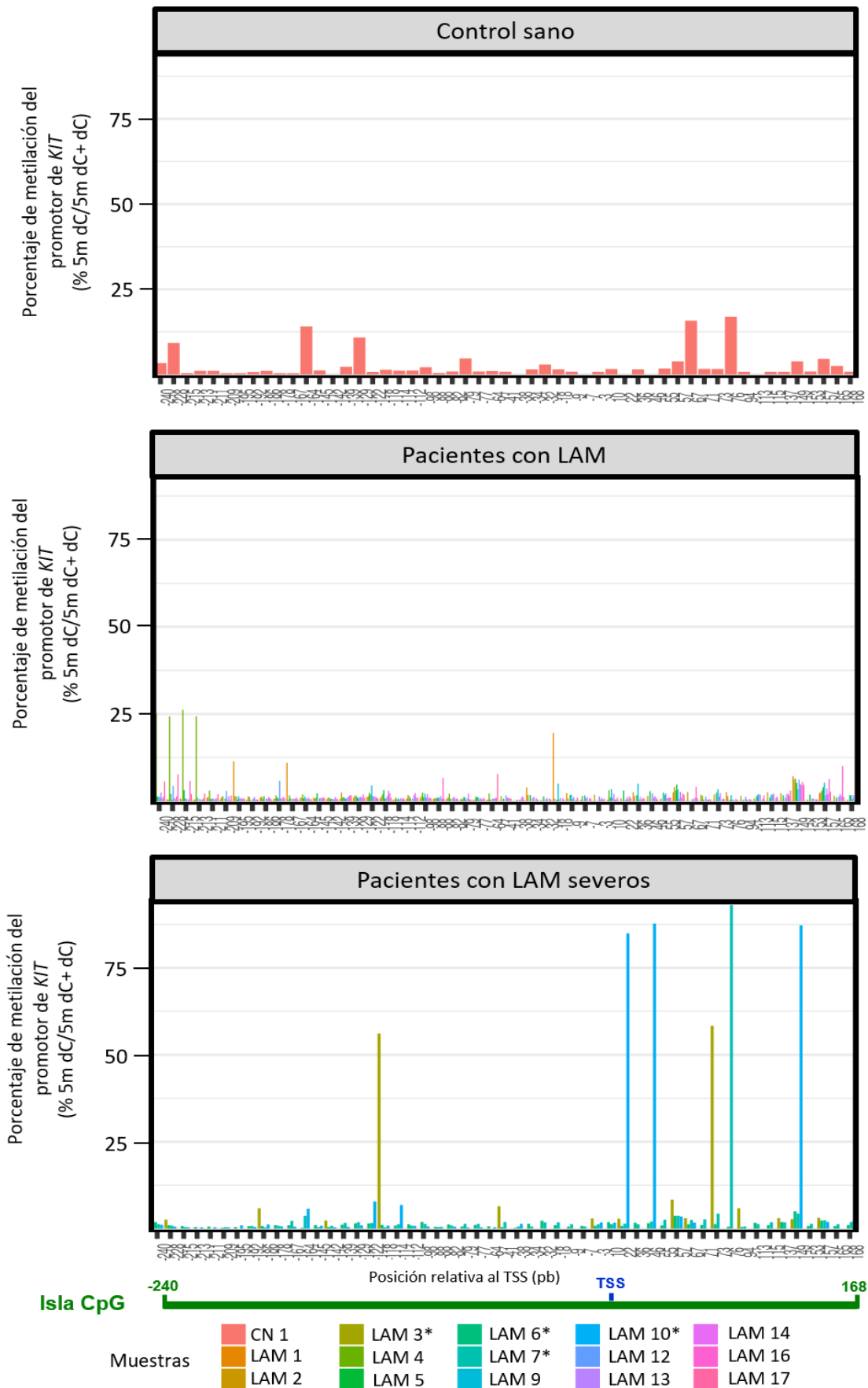


Figura 5: Nivel de metilación de los sitios CpG ubicados en la región promotora del gen *KIT* estudiada. Se clasifican los datos en tres clases: Control sano, Pacientes con LAM y Pacientes con LAM severos (*). En verde se marca la extensión de la isla CpG y en azul la posición del TSS.

7.4.2. Gen *TET2*

La isla CpG estudiada para *TET2* tiene un tamaño de 772 pb y el TSS se ubica dentro de esta isla CpG. Con respecto al TSS, la isla se ubica desde la posición -253 hasta la posición 518. Como se puede observar en la representación gráfica para *TET2* (Figura 6) los datos obtenidos se distribuyen a lo largo de la isla CpG desde la posición -16 hasta +583 con respecto al TSS.

El análisis de la metilación diferencial de la región promotora de *TET2* (Figura 6) muestra la existencia de sitios CpGs específicos hipermetilados aislados en los pacientes con LAM en comparación con el control sano. Los pacientes LAM3*, LAM4 y LAM8 presentan sitios hipermetilados con un porcentaje de metilación en el entorno del 40% al 60%. Los pacientes LAM2, LAM5, LAM6* y LAM11 muestran entre un 10% y 30% de metilación en sitios CpGs específicos aislados. En cambio, en el control sano todos estos sitios CpGs presentan un porcentaje de metilación entre 0% y 5% aproximadamente. Como se puede observar, los pacientes severos no pueden diferenciarse del resto de los pacientes con LAM evaluados en este trabajo. Por lo tanto, no se visualizó metilación diferencial entre los pacientes con LAM y los pacientes con LAM severos para esta región promotora. Asimismo, se pueden observar pacientes con LAM severos (LAM7* y LAM15*) que no mostraron sitios hipermetilados en esta región. Por este motivo, los pacientes solo se agruparon en una categoría sin discriminar entre pacientes con LAM severos y pacientes con LAM.

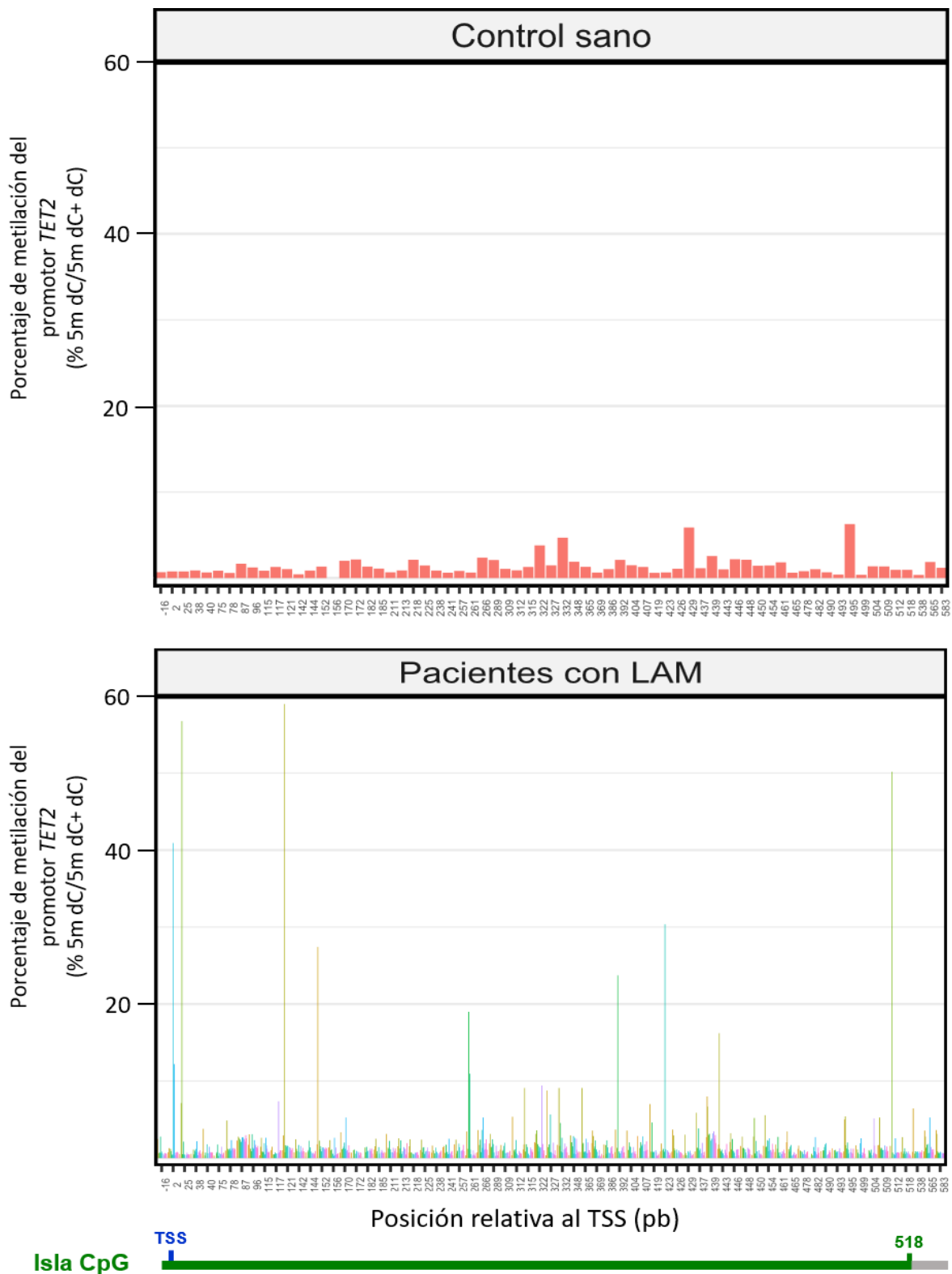


Figura 6: Nivel de metilación de los sitios CpG ubicados en la región promotora del gen *TET2*. Los datos de las muestras se clasifican en dos categorías: control sano y Pacientes con LAM. Las muestras de pacientes con LAM severos se distinguen con *. En verde se marca la extensión de la isla CpG y en azul la posición del TSS

7.4.3. Gen *PTEN*

La isla CpG estudiada para *PTEN* tiene un tamaño de 824 pb y el TSS se ubica fuera de esta isla CpG. Con respecto al TSS la isla se ubica desde la posición -1609 hasta la posición -786. Como se puede observar en la representación gráfica para *PTEN* (Figura 7) los datos obtenidos se distribuyen a lo largo de gran parte de la isla CpG.

En este caso los pacientes se agrupan solo en una categoría (pacientes con LAM) ya que los datos sobre metilación de los sitios CpG tanto de los controles sanos como de los pacientes con LAM severos fueron filtrados durante el procesamiento bioinformático de las secuencias.

Como resultado del análisis de metilación de la región estudiada para *PTEN* podemos ver que se encuentra mayormente hipometilada para pacientes con LAM. La metilación en general no llega a 5% en la mayoría de los sitios, sin embargo, en dos sitios específicos la metilación alcanza un 15% de las CpGs (LAM1 y LAM5) y 40 % solo en un sitio CpG (LAM17). Cada uno de estos casos se trata de pacientes diferentes. Por otra parte, podemos observar que el paciente LAM5 tiene varios sitios con un nivel de metilación del 10%.

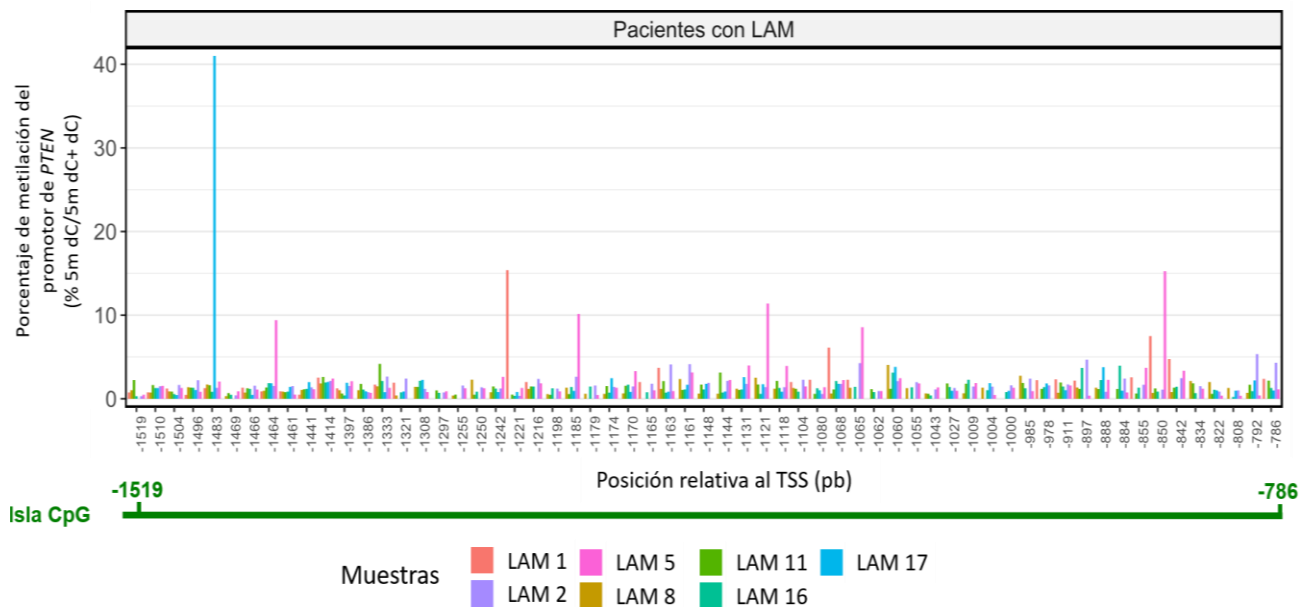


Figura 7: Nivel de metilación de los sitios CpG ubicados en la región promotora del gen *PTEN*. Solo se obtuvieron resultados para pacientes con LAM, no se logró obtener resultados para controles sanos. En verde se marca la extensión de la isla CpG.

Como se describió, se logró poner a punto la amplificación de tres regiones promotoras de los genes *KIT*, *TET2* y *PTEN*, candidatos para LAM. Para el gen *RUNX1*, no se lograron resultados con una eficiencia suficiente como para poder realizar la secuenciación. Además, se analizaron gráficamente los niveles de metilación diferencial para cada uno de los promotores génicos. Se pudo visualizar metilación diferencial entre los pacientes con LAM y los controles sanos, así como sitios específicos hipermetilados aislados presentes solo en pacientes con LAM severos.

8. Discusión

En este trabajo se puso a punto una técnica para analizar los niveles de metilación de regiones de promotores de genes candidatos para LAM, como lo son *KIT*, *TET2* y *PTEN*. La metilación de los sitios CpGs se detectó utilizando secuenciación de amplicones de ADN tratado con bisulfito de sodio. El bisulfito de sodio deamina los residuos de citosina no metilada y la convierte en uracilos mientras que no afecta a los residuos de 5-metilcitosina. Por lo tanto, durante la reacción de PCR las citosinas no metiladas se amplifican como timinas y las citosinas metiladas son mantenidas en la secuencia (J.Clark et al., 1994). De esta forma, mediante secuenciación de los amplicones resultantes se puede diferenciar a las 5-metilcitosinas de las citosinas no metiladas. El diseño de los cebadores para lograr amplificar las regiones promotoras en ADN tratado con bisulfito de sodio es considerablemente más complejo en comparación a una PCR estándar. Por un lado, el diseño de los cebadores debe tener en cuenta las modificaciones introducidas por el bisulfito de sodio y, por otro lado, las regiones promotoras y las islas CpGs tienen una gran cantidad de secuencias repetidas que dificultan la amplificación. Además, el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio tiene algunas desventajas ya que introduce roturas en el ADN dando como resultado una fragmentación aleatoria del ADN que representa el principal obstáculo de esta técnica. De hecho, los amplicones más grandes obtenidos y secuenciados a partir de ADN desaminado tratado con bisulfito de sodio no superan los 1500 pb de longitud (Yang et al., 2015). Sin embargo, el laboratorio de Epidemiología genética de la Facultad de Medicina tiene una amplia experiencia con esta técnica y ha logrado secuenciar grandes regiones de hasta 1200 pb utilizando ADN tratado con bisulfito de sodio (Cappetta et al., 2021; Pereyra et al., 2020).

Luego de examinar las regiones promotoras de los genes *KIT*, *TET2* y *PTEN*, y teniendo en cuenta los criterios descritos anteriormente, se lograron diseñar cebadores funcionales para amplificar parte de las islas CpGs que se localizan en las regiones promotoras de estos genes. Es importante resaltar que el diseño de estos oligonucleótidos funcionales representó un gran desafío dentro de la puesta a punto de la técnica, sin embargo, con un análisis detallado y minucioso se alcanzó este objetivo con éxito.

Para *RUNX1* se encontraron dos islas CpGs, una de 3237 pb (isla A) y otra de 520 pb (isla B). En ambos casos el diseño de cebadores fue meticuloso debido a la gran cantidad de secuencias repetidas y SNPs presentes en estas ubicaciones. Incluso para la amplificación de la isla A debimos optar por una amplificación semi-anidada para poder evitar las zonas de repetidos que podrían ocasionar un desprendimiento de la polimerasa durante la PCR. Aunque se tomaron en cuenta todas las posibles variables y se hicieron varias pruebas de combinaciones de temperaturas, no se logró una eficiencia suficiente de la amplificación de ninguna de las dos regiones de interés para *RUNX1* como para poder realizar la secuenciación. Sin embargo, en los demás genes estudiados si se logró obtener eficientemente productos de PCR del tamaño esperado para secuenciar. Por lo tanto, se logró de forma exitosa poner a punto la técnica para la amplificación eficiente de las regiones promotoras seleccionadas para 3 de los 4 genes seleccionados para este trabajo.

El gen *KIT* es un oncogén que codifica para un receptor de tirosina quinasa transmembrana de clase III. Este gen tiene una función importante en los procesos de proliferación, supervivencia, adhesión y quimiotaxis celular. Además, la expresión de *KIT* se ha encontrado en los blastos de 70 % de los pacientes con LAM (Nabil et al., 2023) y se ha reportado que en el 4% al 5% de todos los casos de LAM este gen se encuentra mutado (Amor-Vigil & Hernandez-Miranda, 2019). En este trabajo de tesis, el análisis de metilación diferencial en una región del promotor se realizó por medio de la visualización de las representaciones gráficas de los resultados obtenidos para los pacientes con LAM en comparación con los controles. Este análisis muestra que en el caso de *KIT* existen varios sitios CpGs hipermetilados aislados en los pacientes con LAM severos a diferencia de los restantes pacientes con LAM y los controles sanos. Estos 6 sitios CpGs hipermetilados aislados se ubican en una extensión de 271 pb que van desde la posición -122 hasta la posición 149 con respecto al TSS. Esta zona está incluida dentro de la isla CpG y presenta una gran cantidad de sitios de unión a factores de transcripción tanto en médula como en sangre, según se muestra en Genome Browser. Sin embargo, en la bibliografía reciente, se han encontrado evidencias de que *KIT* se encuentra sobreexpresado en los pacientes con LAM en comparación con los casos control (Nabil et al., 2023). Además, se ha reportado la sobreexpresión de *KIT* en otros tipos de cáncer, incluidos los tumores del estroma gastrointestinal, el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y melanoma.

Nabil et al. (2023) encontraron que el aumento en la expresión de *KIT* fue un factor de mal pronóstico para los pacientes con LAM, ya que su regulación positiva se asoció significativamente con una tasa de supervivencia más corta. Asimismo, encontraron una menor expresión de *KIT* en pacientes con factores pronósticos de bajo riesgo. También se asoció significativamente la sobreexpresión de *KIT* y la presencia de LAM con t(8;21) y/o inv-16 (Nabil et al., 2023).

Los cambios en el nivel de metilación pueden ser el resultado de mutaciones que causan la pérdida o la ganancia de función en las enzimas involucradas en este mecanismo. Entre estas enzimas se encuentran las ADN metiltransferasas, que son fundamentales para una hematopoyesis normal. En particular la DNMT3A y la DNMT3B están involucradas en la metilación *de novo* permitiendo la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (Kalinkova et al., 2023). Se ha encontrado que un 25 % de pacientes con LAM tienen mutaciones en DNMT3A, de las cuales, la mutación más frecuente es *DNMT3A*^{R882H} que reduce su actividad de metilación del ADN (Spencer et al., 2017). Es de amplio conocimiento que en líneas generales la hipermetilación de las islas CpGs de las regiones promotoras está asociada con el silenciamiento de los genes en el cáncer. Sin embargo, en Spencer et al (2017), un estudio específico para la mutación *DNMT3A*^{R882H} se encontró que la expresión de la mayoría de los genes estudiados para LAM no se correlacionaba con el nivel de metilación de las islas CpGs. Es decir que los eventos de hipermetilación encontrados en genes asociados a LAM en las islas CpG no se asociaron con la represión o silenciamiento génico en pacientes con esta mutación. Ellos plantean en este estudio que la hipermetilación de las islas CpG por DNMT3A pueden ser un vestigio de una marca molecular que intentó restringir la proliferación y la autorrenovación anormal de células. En las células en donde está presente la mutación de *DNMT3A* este proceso se ve alterado, por lo tanto, puede contribuir a la iniciación de la leucemia al aumentar la cantidad de células afectadas que podrían tener una mutación iniciadora de LAM. Estos hallazgos sugieren que los fenotipos de expresión en LAM pueden surgir a través de vías comunes o convergentes y enfatizan la relación compleja e impredecible entre la metilación y la expresión génica en las células primarias (Spencer et al., 2017). Además, es importante destacar que las mutaciones de *DNMT3A* en pacientes con LAM se asocian con una supervivencia general (SG) más corta lo que representa una herramienta pronóstica y predictiva prometedora (Kalinkova et al.,

2023). El análisis de metilación en las islas CpG de Spencer et al. (2017), no proporciona datos para las regiones estudiadas en este trabajo. Sin embargo, es interesante tener presente la diversidad de mecanismos involucrados en las marcas epigenéticas, así como los diferentes resultados que pueden ocasionar. Sumado a esto, la gran heterogeneidad genética y epigenética de LAM complejizan aún más el estudio de estas patologías. Por lo tanto, la hipermetilación de sitios específicos en islas CpGs podría tener una gran variedad de consecuencias a nivel molecular tanto en la regulación de la expresión particular de ese gen como en todo el genoma, por ejemplo, al afectar el promotor de una metilasa de ADN.

Como parte de los objetivos del proyecto de investigación de Uriarte et al. (2014) se propusieron evaluar la presencia de mutaciones somáticas en genes asociados a LAM en pacientes de la población uruguaya. La mayoría de los pacientes con LAM incluidos en este trabajo de tesis presentaron mutaciones en genes asociados a cáncer (datos no publicados; comunicación personal Cappetta M). Solo 6 de los 17 pacientes no presentaron mutaciones en ninguno de los genes evaluados. El resto de los pacientes presentaron mutaciones categorizadas como patogénicas y probablemente patogénicas. De los 10 pacientes con LAM que presentaron sitios específicos hipermetilados en alguna de las regiones promotoras evaluadas, 7 presentaron mutaciones clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas y de éstos, 4 pacientes tienen mutaciones en *DNMT3A*. Como mencionamos anteriormente el estudio en conjunto de los datos de mutaciones y metilación en promotores de genes asociados a LAM es fundamental para poder definir una nueva clasificación de los pacientes con LAM según su pronóstico y de esta forma, evaluar el mejor tratamiento que se adapte a su categoría.

En el caso de los genes *TET* (*TET1*, *TET2* y *TET3*), éstos codifican para enzimas que participan en la traslocación diez – once (ten-eleven) y cumplen funciones como reguladores de la desmetilación del ADN. Las enzimas TET oxidan a la 5mC convirtiéndola en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) (Duy et al., 2020). Por lo tanto, estas enzimas eliminan las marcas de metilación del ADN y desempeñan un papel fundamental en la diferenciación hematopoyética (Kalinkova et al., 2023). En particular el gen *TET2* tiene una función como supresor de tumores, ya que se ha visto que las mutaciones en este gen están asociadas con

un aumento de la metilación de CpGs en varios tipos de cáncer (Joshi et al., 2022; Nishiyama & Nakanishi, 2021). De esta manera, la eliminación de *TET2* en las células hematopoyéticas reduce 5hmC principalmente en los potenciadores, lo que conduce a la regulación negativa de los genes supresores de tumores, y por lo tanto afecta a múltiples capas del epigenoma (Duy et al., 2020).

Se ha reportado ampliamente en la bibliografía que *TET2* es uno de los genes más mutados en LAM y en otros tipos de leucemias (Kalinkova et al., 2023). Las mutaciones sin sentido y de cambio de marco de lectura causan un fenotipo de pérdida de función y el deterioro de la actividad catalítica de la enzima que resulta en niveles bajos de 5hmC. Además, se ha reportado que la presencia de las mutaciones en *TET2* tienen diferentes frecuencias en adultos menores a 70 años (8% - 12%) en comparación con ancianos mayores a 75 años (42%) (Zjablovskaja & Florian, 2020). Como podemos ver, la expresión de *TET2* es importante para el correcto mantenimiento del epigenoma: los pacientes con baja expresión de *TET2* tienen una supervivencia general notablemente más corta tanto en LAM con citogenética normal como anormal. Como parte de los resultados encontrados en este trabajo de tesis, el análisis de metilación diferencial de la región promotora estudiada para *TET2* muestra hipermetilación en sitios específicos aislados tanto en los pacientes con LAM severos, quienes fallecieron dentro de los primeros 45 días post diagnóstico, como en el resto de los pacientes. Estos sitios específicos hipermetilados presentaron un nivel de metilación entre 50 % y 60 % en los pacientes con LAM. Es importante resaltar que en el control sano estos sitios no se encuentran metilados lo que concuerda con la bibliografía en donde se menciona que *TET2* se expresa con normalidad en las células normales de sujetos sanos (Joshi et al., 2022). A su vez, la región promotora estudiada presenta una importante variedad de sitios de unión a factores de transcripción, así como también presenta elementos reguladores asociados y una alta expresión en sangre (visto en Genome Browser). Por otra parte, el estudio de los niveles de metilación en modificadores epigenéticos es muy importante, ya que afecta la expresión de los genes en todo el genoma. Asimismo, las modificaciones epigenéticas son reversibles, lo que representa una gran ventaja frente a las mutaciones, ya que se pueden utilizar como diana para el desarrollo de terapias epigenéticas.

Por otra parte, el gen *PTEN* también es un supresor tumoral que actúa principalmente como una fosfatasa que desfosforila el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfatos (PIP3). Además, se ha demostrado que tiene importantes funciones como supresor de tumores en el núcleo mediando la proliferación celular, promoviendo la estabilización del genoma, regulando la reparación de ADN y la sensibilidad al estrés genotóxico (Morotti et al., 2015). Como es de esperarse, al ser un gen involucrado en tantas funciones vitales para la célula, *PTEN* tiene una red de regulación particularmente compleja. La fosfatasa está controlada por modificaciones postraduccionales y el nivel de expresión de *PTEN* está regulado por varios miARN, vinculados en la patogénesis del cáncer. Específicamente en LAM se ha visto que existe una expresión aberrante de los miARN reguladores de *PTEN*, lo que conduce a una inactivación de *PTEN* (Morotti et al., 2015).

En este trabajo de tesis se analizó el nivel de metilación de una de las islas CpG ubicada en la región promotora de *PTEN*. De esta forma se pudo visualizar que en líneas generales hay un bajo nivel de metilación en esta región (<5%) en los pacientes con LAM. Sin embargo, para varios sitios CpGs estudiados se encontró un nivel de metilación superior que se encuentra entre 10% y 15%. Solo para uno de los pacientes (LAM17) se encontró un sitio CpG específico que muestra un 40% de metilación. Lamentablemente no obtuvimos datos de metilación del control sano y de los pacientes con LAM severos. Por este motivo no pudimos visualizar si existían diferencias en los niveles de metilación entre el control, los pacientes con LAM severos y el resto de los pacientes. A pesar de esto, es interesante destacar que se ha reportado en la bibliografía que existe una regulación a la baja de *PTEN* mediante una metilación diferencial significativa en sitios CpGs dentro de las islas próximas al inicio de este gen (Lee et al., 2022). Concretamente, en el estudio de Lee et al. (2022) se encontró en la región reguladora de *PTEN*, sitios CpGs específicos significativamente hipermetilados, en líneas celulares de LAM resistentes a agentes hipometilantes, en comparación con líneas celulares no resistentes. También analizaron estos sitios CpGs en muestras de pacientes encontrando niveles de metilación significativamente más altos en pacientes LAM resistentes a agentes hipometilantes en comparación con pacientes LAM sensibles. La media de los niveles de metilación que se reportan para los pacientes que responden a la terapia se encuentran entre 5% y 10 % mientras que en los pacientes resistentes se encuentra entre 15% y 20 %. Aunque los sitios

CpGs estudiados en la investigación de Lee et al. (2022) están ubicados a unos 380 pb de la región seleccionada para este trabajo de tesis, podemos decir que los niveles de metilación reportados en ambos trabajos concuerdan parcialmente (entre 5% y 20% para algunos casos). Siendo que el uso de agentes hipometilantes puede tener varios efectos secundarios no deseados a nivel de todo el genoma, la existencia de metilación diferencial entre pacientes resistentes a los agentes hipometilantes en comparación con pacientes que responden ante el uso de este tratamiento sería muy importante para poder categorizar correctamente a los pacientes con LAM. De este modo, se podría seleccionar a los pacientes con LAM que efectivamente se puedan beneficiar de este tratamiento de los pacientes que son resistentes y que solo sufrirían los efectos secundarios.

Las diferentes estrategias terapéuticas son un área de investigación emergente y se están centrando en revertir los patrones aberrantes de metilación de ADN en las neoplasias malignas hematológicas. Hallazgos recientes sugieren que el enfoque basado en la metilación del ADN sensibiliza otros tratamientos contra el cáncer y puede mejorar los resultados clínicos obtenidos para pacientes con cáncer hematológico (Kalinkova et al., 2023).

La investigación en cáncer actualmente tiene como objetivo encontrar nuevos biomarcadores para lograr un diagnóstico preciso junto con nuevos tratamientos más eficientes. Un diagnóstico temprano y una correcta estratificación de los pacientes son claves para mejorar el pronóstico, los resultados del tratamiento y la supervivencia de los pacientes con neoplasias malignas hematopoyéticas, entre ellas LAM. Las nuevas tecnologías de secuenciación y las herramientas bioinformáticas se están implementando ampliamente para ayudar a dilucidar el impacto tanto de la genética como la epigenética en el desarrollo y la progresión del cáncer. Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se encuentra la metilación del ADN. Sabemos que LAM es una enfermedad heterogénea y compleja, pero en el futuro, una estratificación de los pacientes con LAM basada en la metilación del ADN podría conducir a un tratamiento más personalizado, implicando mejores resultados para los pacientes y menores costos destinados a la salud. La reversibilidad de los cambios en los patrones de metilación del ADN es una gran ventaja que podría tener grandes implicaciones clínicas. Sin embargo, los factores adversos asociados con los inhibidores de la metilación del ADN justifican más investigación.

Es necesario resaltar que en este trabajo de tesis logramos implementar el análisis de metilación para regiones promotoras de los genes *KIT*, *TET2* y *PTEN*, asociados a LAM en pacientes de Uruguay. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis no han podido ser evaluados estadísticamente, debido a la cantidad de muestras analizadas de pacientes con LAM y controles sanos. Por este motivo, será necesario analizar estas regiones promotoras en una mayor cantidad de pacientes y controles para poder validar estos resultados estadísticamente. Actualmente, las técnicas puestas a punto durante este trabajo ya se están implementando en un muestreo mayor de pacientes con LAM de Uruguay que permitirá obtener conclusiones estadísticas. De esta manera y dependiendo de los resultados obtenidos, el análisis de metilación de regiones promotoras podría complementar el algoritmo de diagnóstico que se utiliza actualmente para clasificar a los pacientes de LAM en Uruguay. Por otro lado, la técnica diseñada en este trabajo de tesis podría ser potencialmente relevante en otras investigaciones, ya que los genes seleccionados para este trabajo están implicados en una gran diversidad de patologías y diferentes tipos de cánceres. Por esta razón, el análisis de metilación diferencial de estas regiones promotoras resulta potencialmente útil para otras investigaciones tanto en cáncer como en patologías en donde estos genes también estén involucrados.

9. Conclusiones

Como conclusión principal se logró analizar el estado de metilación de las regiones promotoras seleccionadas de los genes *KIT*, *TET2* y *PTEN* asociados a LAM en pacientes de Uruguay.

Se puso a punto de forma eficiente la amplificación de las regiones promotoras de los genes *KIT*, *TET2* y *PTEN*. Además, se evaluó el estado de metilación de los sitios CpGs dentro de las regiones seleccionadas mediante secuenciación y el uso de herramientas bioinformáticas, pudiendo comparar el nivel de metilación entre los controles, pacientes con LAM y pacientes con LAM severos.

Mediante el análisis de metilación diferencial en la región promotora del gen *KIT* se hallaron sitios CpGs específicos hipermetilados aislados en los pacientes con LAM severos en comparación con el control sano y el resto de los pacientes con LAM.

Por otro lado, en la región promotora del gen *TET2* el análisis de metilación diferencial muestra sitios CpGs hipermetilados específicos en los pacientes con LAM en comparación con control sano. Además, se observó que no existen diferencias entre los niveles de metilación de los pacientes con LAM severos y los pacientes con LAM para el gen *TET2*.

Para el gen *PTEN*, se observó una hipometilación con un nivel de metilación similar al descrito en la bibliografía para los pacientes con LAM.

10. Bibliografía

- Akalin, A., Garrett-Bakelman, F. E., Kormaksson, M., Busuttil, J., Zhang, L., Khrebtukova, I., Milne, T. A., Huang, Y., Biswas, D., Hess, J. L., Allis, C. D., Roeder, R. G., Valk, P. J. M., Löwenberg, B., Delwel, R., Fernandez, H. F., Paietta, E., Tallman, M. S., Schroth, G. P., ... Figueroa, M. E. (2012). Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS Genetics*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002781>
- Amor-Vigil, A. M., & Hernandez-Miranda, L. L. (2019). La biología molecular en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda. *Revista Cubana de Hemetología, Inmunología y Hemoterapia.*, 35(3), 1–12.
- Boada, M. (2020). *Presentación datos registro leucemia año 2020*. Monitora Sociedad Hematología Del Uruguay. http://www.shu.com.uy/info_util_registro_leucemias.html
- Cappetta, M., Pereyra, S., Dell'Oca, N., Salvarrey, F., Neumann, R., May, C., Elizondo, V., Manrique, G., Pérez, V., Bertoni, B., & Zubillaga, M. N. (2021). Searching for epigenetic markers with prognostic value in acute myeloblastic leukemia patients of uruguay. *American Society of Human Genetics*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32820.12161>
- Dell'Oca, N., Elizondo, V., Manrique, G., Pérez, V., Tort, J. F., Cappetta, M., & Zubillaga, M. N. (2018). Searching for molecular markers in acute myeloblastic leukemia patients of Uruguay. *International Congress of Genetics 2018*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21639.65446>
- Duy, C., Béguelin, W., & Melnick, A. (2020). Epigenetic mechanisms in leukemias and lymphomas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(12), 1–29.
- Elizondo, V. (2020). *Primera aproximación metodológica de secuenciación masiva mediante panel de genes en pacientes uruguayos portadores de leucemia aguda mieloblástica*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología, Universidad ORT Uruguay.
- Figueroa, M. E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P. J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., Campagne, F., Mazumdar, M., Grealley, J. M., Valk, P. J. M., Löwenberg, B., Delwel, R., & Melnick, A. (2010). DNA Methylation Signatures Identify

- Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, 17(1), 13–27.
- J.Clark, S., Harrison, J., Paul, C. L., & Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22, 2990–2997.
- Joshi, K., Liu, S., Breslin S.J, P., & Zhang, J. (2022). Mechanisms that regulate the activities of TET proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04396-x>
- Kalinkova, L., Sevcikova, A., Stevurkova, V., Fridrichova, I., & Ciernikova, S. (2023). Targeting DNA Methylation in Leukemia, Myelodysplastic Syndrome, and Lymphoma: A Potential Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Tool. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010633>
- Krali, O., Palle, J., Bäcklin, C. L., Abrahamsson, J., Norén-Nyström, U., Hasle, H., Jahnukainen, K., Jónsson, Ó. G., Hovland, R., Lausen, B., Larsson, R., Palmqvist, L., Staffas, A., Zeller, B., & Nordlund, J. (2021). Dna methylation signatures predict cytogenetic subtype and outcome in pediatric acute myeloid leukemia (Aml). *Genes*, 12(6), 1–16.
- Lawrence, M., Gentleman, R., & Carey, V. (2009). rtracklayer: An R package for interfacing with genome browsers. *Bioinformatics*, 25(14), 1841–1842.
- Lawrence, M., Huber, W., Pagès, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M. T., & Carey, V. J. (2013). Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Computational Biology*, 9(8), 1–10.
- Lee, P., Yim, R., Miu, K. K., Fung, S. H., Liao, J. J., Wang, Z., Li, J., Yung, Y., Chu, H. T., Yip, P. K., Lee, E., Tse, E., Kwong, Y. L., & Gill, H. (2022). Epigenetic Silencing of PTEN and Epi-Transcriptional Silencing of MDM2 Underlied Progression to Secondary Acute Myeloid Leukemia in Myelodysplastic Syndrome Treated with Hypomethylating Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105670>
- Magi, A., Mattei, G., Mingrino, A., Caprioli, C., Ronchini, C., Frigè, G. M., Semeraro, R., Bolognini, D., Rambaldi, A., Candoni, A., Colombo, E., Mazzarella, L., & Pelicci, P. G. (2023). High-resolution Nanopore methylome-maps reveal random hyper-methylation at CpG-poor regions as driver of chemoresistance in leukemias. *Communications Biology*, 6(1), 1–11.

- Makkar, H., Majhi, R. K., Goel, H., Gupta, A. K., Chopra, A., & Tanwar, P. (2023). *Acute myeloid leukemia : novel mutations and their clinical implications*. *Am J Blood Res*, 13(1), 12–27.
- Morotti, A., Panuzzo, C., Crivellaro, S., Carrà, G., Torti, D., Guerrasio, A., & Saglio, G. (2015). The role of PTEN in myeloid malignancies. *Hematology Reports*, 7(4), 84–87.
- Nabil, R., Hassan, N. M., Abdellateif, M. S., Gawdat, R. M., & Elshazly, S. S. (2023). The prognostic role of C-KIT, TET1 and TET2 gene expression in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 641–653.
- NIH. (2023). *Datos estadísticos sobre el cáncer: leucemia: leucemia mieloide aguda (LMA)*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
- Nishiyama, A., & Nakanishi, M. (2021). Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends in Genetics*, 37(11), 1012–1027.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O’Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., ... Campbell, P. J. (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209–2221.
- Pereyra, S., Neumann, R., May, C., Salvarrey, F., Sardina, A., Dell’oca, N., Zubillaga, M. N., Sapiro, R., Bertoni, B., & Cappetta, M. (2020). Promoter methylation analysis in candidate genes of complex human diseases. *Nanopore Community Meeting*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36457.83046/1>
- Roussel, X., Daguindau, E., Berceanu, A., Desbrosses, Y., Warda, W., Neto da Rocha, M., Trad, R., Deconinck, E., Deschamps, M., & Ferrand, C. (2020). Acute Myeloid Leukemia: From Biology to Clinical Practices Through Development and Pre-Clinical Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10(December), 1–24.
- Sargas, C., Ayala, R., Larráyoz, M. J., Chillón, M. C., Carrillo-Cruz, E., Bilbao-Sieyro, C., Prados de la Torre, E., Martínez-Cuadrón, D., Rodríguez-Veiga, R., Boluda, B., Gil, C., Bernal, T., Bergua, J. M., Algarra, L., Tormo, M., Martínez-Sánchez, P., Soria, E., Serrano, J., Alonso-Domínguez, J. M., ... Montesinos, P. (2023). Molecular Landscape and Validation of New Genomic Classification

- in 2668 Adult AML Patients: Real Life Data from the PETHEMA Registry. *Cancers*, 15(2), 438.
<https://doi.org/10.3390/cancers15020438>
- Spencer, D. H., Russler-Germain, D. A., Ketkar, S., Helton, N. M., Lamprecht, T. L., Fulton, R. S., Fronick, C. C., O’Laughlin, M., Heath, S. E., Shinawi, M., Westervelt, P., Payton, J. E., Wartman, L. D., Welch, J. S., Wilson, R. K., Walter, M. J., Link, D. C., DiPersio, J. F., & Ley, T. J. (2017). CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. *Cell*, 168(5), 801-816.e13.
- Tazi, Y., Arango-Ossa, J. E., Zhou, Y., Bernard, E., Thomas, I., Gilkes, A., Freeman, S., Pradat, Y., Johnson, S. J., Hills, R., Dillon, R., Levine, M. F., Leongamornlert, D., Butler, A., Ganser, A., Bullinger, L., Döhner, K., Ottmann, O., Adams, R., ... Papaemmanuil, E. (2022). Unified classification and risk-stratification in Acute Myeloid Leukemia. *Nature Communications*, 13(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32103-8>
- Uriarte, M. del R. (2009). *Desarrollo de nuevas tecnologías citomoleculares que permiten una caracterización genética precisa de las Leucemias Mieloblásticas Agudas con impacto en el diagnóstico y tratamiento*. ANII PR FSS-2009-1-1614.
- Uriarte, M. del R. (2014). *Relevancia pronóstica del perfil genético y epigenético integrado en Leucemia Mieloide Aguda*. ALI_2_2013_1_4204.
- Verma, S., Dhanda, H., Singh, A., Rishi, B., Tanwar, P., Chaudhry, S., Siraj, F., & Misra, A. (2021). Systematic review of epigenetic targets in acute myeloid leukemia. *American Journal of Blood Research*, 11(5), 458–471.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Gráficos elegantes para el análisis de datos*. Springer-Verlag Nueva York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Yang, Y., Sebra, R., Pullman, B. S., Qiao, W., Peter, I., Desnick, R. J., Geyer, C. R., DeCoteau, J. F., & Scott, S. A. (2015). Quantitative and multiplexed DNA methylation analysis using long-read single-molecule real-time bisulfite sequencing (SMRT-BS). *BMC Genomics*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1572-7>
- Zjablovskaja, P., & Florian, M. C. (2020). Acute myeloid leukemia: Aging and epigenetics. *Cancers*, 12(1), 1–18.