

PERSPECTIVA



Utilidad de RT-PCR multiplex en el diagnóstico de leucemias.

Valdez-Gaxiola CA*, Gaxiola-Rubio A**

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta a los leucocitos, caracterizado por un aumento exacerbado en la producción de células inmaduras provenientes de la médula ósea. Descrita por primera vez por Valpeu en 1847 pero adquiriendo el nombre de leucemia hasta 1845 por el patólogo alemán Rudolf Virchow llamando a esta “sangre blanca” por visualizar una “sustancia semejante al pus” en los vasos sanguíneos durante una necropsia convirtiéndose desde entonces en una línea de investigación médica prioritaria a nivel mundial debido a sus trágicas manifestaciones clínicas y alta incidencia e impacto en la niñez. La leucemia se divide en cuatro tipos principales, dependiendo la estirpe celular afectada y rapidez en el desarrollo de la enfermedad. En base a lo anterior se clasifican en: leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica y leucemia linfocítica crónica¹⁻³.

Las leucemias agudas se identifican por progresar muy rápidamente, tener una producción desregulada con acumulación de células inmaduras de las estirpes mieloides o linfoides provenientes de médula ósea, deteriorando la salud del individuo de forma súbita. Por otra parte, las leucemias crónicas se caracterizan por una evolución lenta donde las células proliferantes maduran más en comparación con las leucemias agudas, sintomatología inespecífica y variable afectando principalmente a adultos de edad avanzada^{4,5}.

El diagnóstico presuntivo de leucemia inicia con las manifestaciones clínicas (fatiga, disnea, artralgia y fiebre), la exploración física del paciente (hepatomegalia, esplenomegalia, palidez y hemorragias a nivel piel) junto a la determinación de una leucocitosis en el hemograma (>11,000

determinación de una leucocitosis en el hemograma (>11,000 leucocitos/mm³). Sin embargo, estos estudios no son suficientes para descartar o confirmar esta patología, ya que se requiere de una biopsia y/o aspirado de médula ósea, procedimientos altamente invasivos que pueden resultar en complicaciones. El dictamen se basa en la citopatología de células sanguíneas mutadas tanto de sangre periférica como de médula ósea que son observadas a través de frotis sanguíneo y se conjuntan con estudios de citogenética convencional pero solo detectan una pequeña parte de los casos debido a que se basa en análisis de metafases. Aunque hoy en día existe un gran avance en el entendimiento de las aberraciones genéticas, moleculares y genotípicas en los afectados, su comprensión es insuficiente a causa de su diagnóstico de rutina actual porque se basan en la experiencia de quien analiza obteniendo datos ambiguos aun cuando se pueden apoyar en algoritmos de diagnósticos como los presentes en la guía de práctica clínica IMSS-142-04, estos son propensos a errores en la correcta estimación diagnóstico/tratamiento que pudieran ser fatales al momento de otorgar una valoración final^{6,7}.

Dentro del diagnóstico de las leucemias agudas es necesario descubrir las alteraciones citogenéticas y moleculares para adecuar el tratamiento del paciente o en los que se les administrarán medicamentos específicos e identificar la enfermedad mínima residual y suministrar la medicación correspondiente^{8,9}.

* Licenciado en Biomedicina. Pasante de Servicio Social de la Universidad Autónoma de Sinaloa. correo: abygailgaxiola@gmail.com

Este artículo podrá ser consultado en Inbiomed, Latindex, Periódica y en www.hgculiacan.com

Utilidad de RT-PCR multiplex en el diagnóstico de leucemias.

Sinaloa es uno de los estados con mayor incidencia de leucemias en México, siendo en 2012 el cáncer de órganos hematopoyéticos la principal causa de morbilidad hospitalaria en pacientes menores de 20 años (42.3% en hombres y 57.1% en mujeres) y más del 50% de las mujeres menores de 20 años que egresaron de un hospital por cáncer es debido a leucemia, lamentablemente, en las instituciones públicas y privadas la prospección habitual en cada paciente con leucemia es limitada por la tecnología y los costos implicados¹⁰.

Los kits comerciales de tipo reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) multiplex facilitan un test que ofrece una descripción más detallada de las translocaciones cromosómicas con una muy alta sensibilidad (>99%) y especificidad (>99%) sin comprometer la integridad del paciente ya que solo se necesita una muestra de sangre periférica⁹. Como ejemplo, a continuación se muestra el procedimiento del kit HemaVision-28N® el cual identifica 28 alteraciones genéticas causantes de leucemia (Tabla 1), incluyendo más de 145 “puntos de ruptura” en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y sus variantes de ácido ribonucleico mensajero (ARNm). En dicha prueba se pueden obtener resultados inclusive en un día, dependiendo de la habilidad del profesional que lo realiza.

importante realizar la extracción dentro de las primeras dos horas en las que se toma la muestra de sangre ya que es fácilmente degradado por los componentes de la misma.

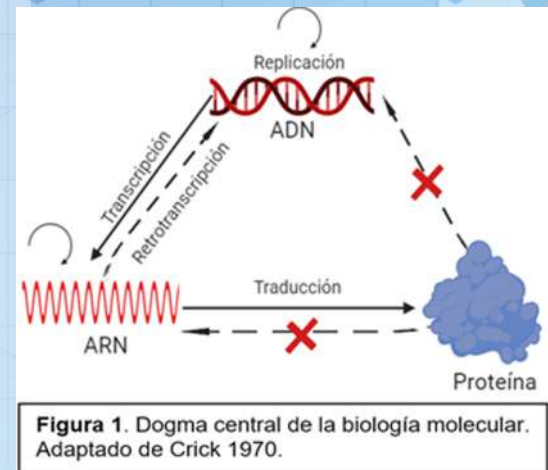


Figura 1. Dogma central de la biología molecular. Adaptado de Crick 1970.

Una técnica para extracción de ARN relativamente sencilla y barata es por el método TRIzol®, una solución de fenol y de isotiocianato de guanidina que solubiliza material biológico y desnaturaliza las proteínas. Después de la solubilización, la adición de cloroformo causa una separación de fases donde la proteína es extraída en la fase orgánica, el ADN en la interfase y el ARN queda en la fase acuosa de donde posteriormente es transferido en otro recipiente y lavado con alcohol para aumentar su pureza¹¹.

Posterior a la extracción de ARN se requiere sintetizar ADNc de doble cadena ya que esto lo hace más estable teniendo una menor probabilidad de que sufra degradación a la vez que se necesita para efectuar los siguientes pasos. A esta parte se le conoce como “retrotranscripción” (Figura 2) y se realiza gracias a una enzima llamada retrotranscriptasa.

del(1p32) (STIL-TAL1)	t(3;21) (q26;q22) (RUNX1-MECOM)	t(6;11) (q27;q23.3) (KMT2A-AFDN)
t(9;12) (q34;p13) (ETV6-ABL1)	t(11;19) (q23.3;p13.1) (KMT2A-ELL)	inv(16) (p13;q22) (CBFB-MYH11)
t(1;11) (p32;q23.3) (KMT2A-EPS15)	t(4;11) (q21;q23.3) (KMT2A-AFF1)	t(16;21) (p11;q22) (FUS-ERG)
t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1)	t(11;19) (q23.3;p13.3) (KMT2A-MLL1)	t(8;21) (q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1)
t(1;11) (q21;q23.3) (KMT2A-MLL1)	t(5;12) (q33;p13) (ETV6-PDGFRB)	t(9;9) (q34;q34) (SET-NUP214)
t(10;11) (p12;q23.3) (KMT2A-MLL10)	t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1)	t(17;19) (q22;p13) (TCF3-HLF)
t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1)	t(5;17) (q35;q21) (NPM1-RARA)	t(9;11) (p21.3;q23.3) (KMT2A-MLL3)
t(11;17) (q23.3;q21) (KMT2A-MLL6)	t(12;22) (p13;q11) (ETV6-MN1)	t(X;11) (q13;q23.3) (KMT2A-FOXO4)
t(3;5) (q25;q34) (NPM1-MLF1)	t(6;9) (p23;q34) (DEK-NUP214)	
t(11;17) (q23;q21) (ZBTB16-RARA)	t(15;17) (q24;q21) (PML-RARA)	

Tabla 1. Translocaciones que detecta el kit HemaVision® -28N. Adaptado de USER MANUAL for HemaVision® -28N.

HemaVision® -28N:

1.- Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).

El ARN se utiliza como molde para todas las reacciones de la prueba, ya que es ahí donde se detecta con mayor precisión las anomalías en los cromosomas, genes y exones puesto que el ARN contiene la información genética proveniente del ADN, determinando el orden en el que se unirán los aminoácidos para la síntesis de proteínas (Figura 1). Es importante realizar la extracción dentro de las primeras dos horas en las que se toma la muestra de sangre ya que es fácilmente degra-

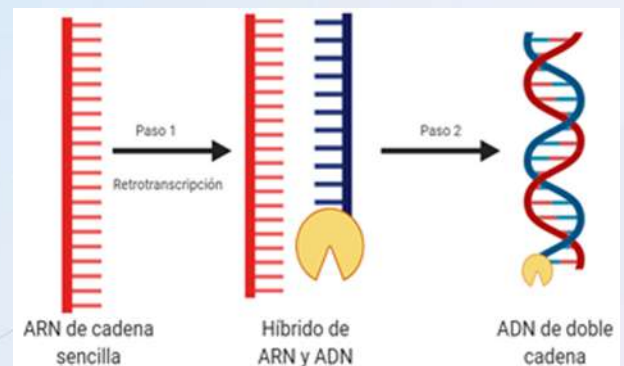


Figura 2. Representación gráfica de la síntesis de ADN complementario por parte de la retrotranscriptasa.

Utilidad de RT-PCR multiplex en el diagnóstico de leucemias.

La importancia de sintetizar ADNc radica en que se obtiene la misma secuencia proveniente del ARNm del cual se ha hecho la retrotranscripción pero sin la presencia de intrones por lo que se eliminan todas esas secciones no codificantes.

2.- PCR Master

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene como objetivo la replicación de un fragmento de ADN diana que se pretende analizar. El método consiste en ciclos repetitivos con variaciones de temperatura que inician a 95°C en la fase de desnaturalización, por consiguiente se da la alineación en un rango de 55°C a 65°C, dependiendo de la longitud y cantidad de guaninas y citosinas presentes en los primers específicos de la región a analizar, posteriormente se lleva a cabo la extensión de la nueva cadena de ADN a 72°C, donde al final de cada ciclo el fragmento amplificado o amplicón alcanza concentraciones exponenciales generando millones de copias del fragmento deseado al final de la n cantidad de ciclos a los que se somete¹² (Figura 3).

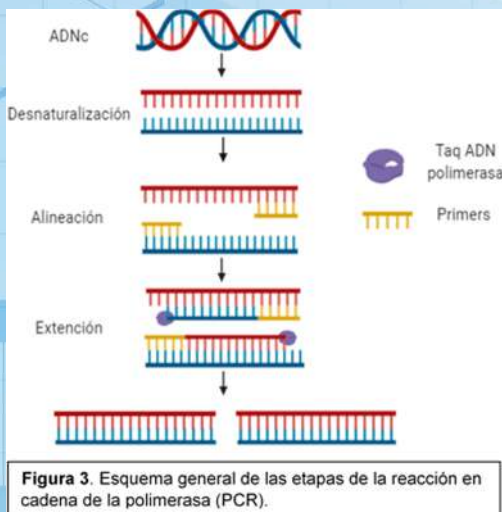


Figura 3. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADNc obtenido en el paso anterior se utiliza para las reacciones de PCR punto final y anidada (PCR-I y PCR-II). La PCR-II es llamada anidada puesto que se realiza usando como molde el producto de PCR obtenido en la primera reacción (PCR-I) con un par de primers para una región más pequeña incluida dentro de la primera región amplificada¹³ obteniendo un fragmento más específico. Para ambas reacciones se preparan mezclas adicionando primers proviéndolos en el paquete por el fabricante, la enzima Taq ADN polimerasa encargada de añadir los desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs) a la nueva cadena y buffer 10X que aporta factores de mantenimiento de la reacción. Una vez completadas las PCRs se necesita comprobar su funcionalidad y visualizar si existe positividad para una translocación.

para una translocación. Para esto, se someten los productos de la PCR-II a una electroforesis, la cual se basa en la separación de moléculas por su peso molecular y carga¹⁴. El gel donde se depositan las muestras se elabora de agarosa o poliacrilamida, estos funcionan como una red por donde las moléculas cruzan dependiendo su tamaño molecular y quedan atrapadas por la porosidad del mismo, también se añade al gel la tinción bromuro de etidio, un intercalante en las moléculas ADN. Se inicia agregando los productos de PCR-II con una mezcla de colorantes en el gel, este es sumergido en el buffer de corrimiento que aporta los iones necesarios para la movilidad por cargas ya que es situado en un campo eléctrico provocando el movimiento de ADN al polo positivo (el ADN tiene carga negativa por los grupos fosfato). Al término de la electroforesis se expone el gel a luz ultravioleta (UV) revelando un patrón de bandas debido a que el bromuro de etidio es excitado a longitud de onda corta de la luz UV. A partir de ello se logra visualizar una banda de 911 pares de bases (pb) correspondiente al control interno e indicador de la integridad del ARN utilizado y funcionalidad de PCR-I y PCR-II. Por otro lado, la presencia de una banda con otro peso molecular indica positividad para alguna translocación, confirmada por medio del siguiente paso (Figura 4).

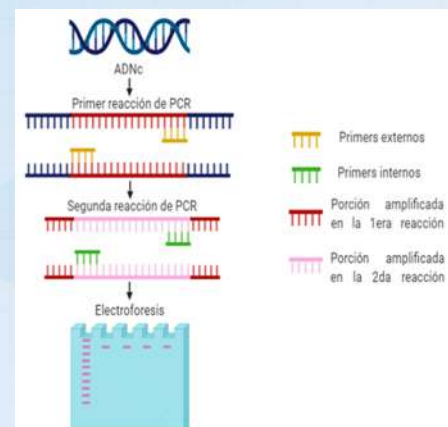


Figura 4. Esquema general del procedimiento de PCR anidada.

3.- PCR Split-Out

Las reacciones de PCR Split-Out se llevan a cabo utilizando el ADNc, además se añaden un par de primers específicos de cada translocación y para el control de la reacción. Al finalizar la PCR Split-Out I se procede a efectuar la PCR anidada (PCR Split-Out II), utilizando los productos de la anterior, donde los productos de la PCR-Split-Out II son sometidos para su análisis a electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (Figura 4).

Utilidad de RT-PCR multiplex en el diagnóstico de leucemias.

Interpretación de resultados

La determinación del resultado se basa en el patrón de bandeado obtenido, es decir, si al visualizar el gel de la PCR Master solo se observan las bandas del control de reacción (911pb) corresponde a un resultado negativo. Una muestra es positiva a una translocación cuando en ambos gels (PCR Master y PCR Split-Out) se visualizan bandas del mismo peso molecular además de las bandas control. El punto de ruptura es identificado por el número de reacción utilizado en la PCR Split-Out y el peso molecular del amplicón de la translocación específica con el apoyo de la tabla proporcionada por el fabricante.

Perspectivas

Se han obtenido resultados favorables en el uso de la técnica de RT-PCR multiplex para el diagnóstico de leucemias, en donde los autores mencionan la utilidad que tiene al momento de proveer información de anomalías genéticas rápidamente y al brindar una asistencia para tomar una decisión terapéutica acertada en los pacientes^{9,15,16}.

En el estado de Sinaloa existe un incremento de la incidencia anual de cáncer en niños y ya que hasta el 70% de ellos son detectados en una etapa avanzada, son necesarias nuevas formas de diagnóstico que precisen de un apoyo en el dictamen médico para definir la forma de tratamiento y de pronóstico al paciente y el uso de la metodología descrita anteriormente favorecería tanto a los pacientes pediátricos como a los de edad más avanzada. Añadiendo que Sinaloa es uno de los principales estados agrícolas de México, el uso de los plaguicidas es indispensable en éste rubro y se ha asociado su exposición ocupacional con enfermedades neoplásicas (incluyendo leucemia), la alta heterogeneidad genética de la población sinaloense y la falta de estudios sobre la frecuencia y características de los pacientes con leucemias agudas y alteraciones moleculares, el contar con estos datos disminuiría el tiempo para proporcionar un diagnóstico confirmatorio al paciente a la vez que podrían clasificarse con mayor precisión los tipos y subtipos de leucemia^{10,17}.

El uso de RT-PCR multiplex sirve como una prueba rápida, con alta especificidad, sensibilidad y con un gran rango costo/beneficio para garantizar al especialista la translocación específica que origina leucemia en el paciente, que, con los métodos convencionales de diagnóstico sería muy difícil encontrar, además, consigue descubrir nuevas alteraciones cromosómicas que de otra manera no fuese posible

posible descubrir. Constituye un perfecto complemento de asistencia con las pruebas de citogenética convencional e inmunofenotipo para aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes al acrecentar la eficacia, el número de casos detectados y asegurar el tratamiento correcto.

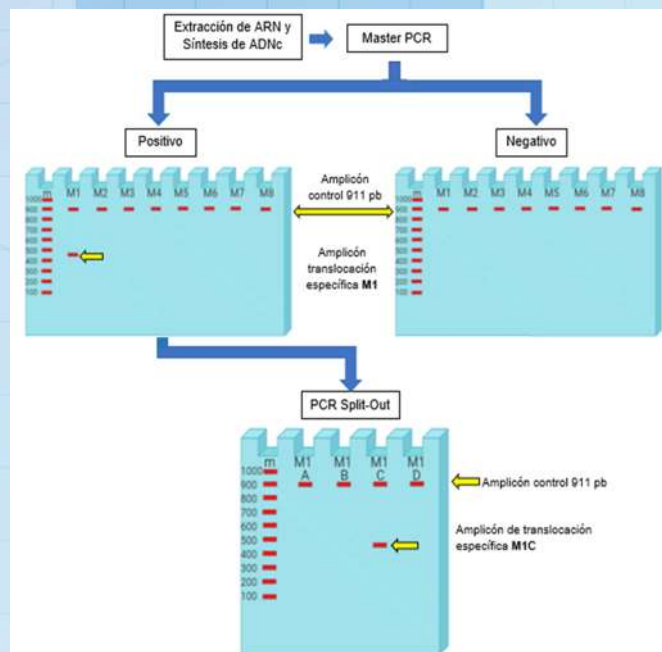


Figura 4. Diagrama de flujo de RT-PCR multiplex para el diagnóstico de leucemias. Resumen de los pasos de la prueba. El ejemplo expone el siguiente resultado: Positivo M1 y M1C, amplicón de 463 pb. Conclusión: la translocación detectada es t(11;19)(q23;q13.1) con punto de ruptura en el exón 9 del gen KMT2A y el exón 2 del gen ELL, generando una proteína de fusión leucemógena asociado a leucemia mieloide aguda (AML) M5¹⁸ de acuerdo a la Clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB) de la AML con un mal pronóstico de recuperación¹⁸.

REFERENCIAS

1. Jiménez-Bonilla, R. (2004). *Historia e investigación de la leucemia en Costa Rica*. Rev. Biol. Trop., [Internet] (52), pp. 559-569. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300018 [Consultado 24 Nov. 2019].
2. Raitts, TH. (1991). *Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias*. Cell Press, [Internet] (67), pp. 641-644. Disponible en: <https://www.cell.com/> [Consultado 20 Nov. 2019].
3. Merino A. (2010). *Clasificación de las leucemias agudas mieloides*. Rev Del Laboratorio Clínico, [internet] (3), pp. 139-147. Disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-clasificacion-leucemias-agudas-mieloides-S1888400810000358>: [Consultado 20 Nov. 2019].
4. *Leukemia and Lymphoma Society*. (2012). *La leucemia*. [Internet], pp. 8-15. Disponible en: <https://www.lls.org/> [Consultado 4 Dic. 2019].
5. Arber, DA., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, MJ., Le Beau, MM., Bloomfield, CD., Cazzola, M. y Vardiman JW. (2016). *The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, [Internet] (127), pp. 2391-2405. Disponible en: <https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revisi-on-to-the-World-Health-Organization> [Consultado 22 Nov. 2019].

Utilidad de RT-PCR multiplex en el diagnóstico de leucemias.

6. Rodríguez, L., González-Llano, O., Mancías, C., Pompa, T., González, G., Sandoval, A., Palafox, MT., Tamez, L. y Tovar, C. (2010). Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex*, [Internet] (11), pp. 78-81. Disponible en: <https://revistadehematologia.org.mx/> [Consultado 4 Dic. 2019].
7. Quintás-Cardama A., Cortes JÉ. (2006). *Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment*. *Mayo Clin Proc*, [Internet] (81), pp. 973-988. Disponible en: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(11\)61490-0/pdf](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(11)61490-0/pdf) [Consultado 3 Dic. 2019].
8. Fajardo-Gutiérrez, A., Rendón-Macías, ME., Mejía-Aranguré, JM. (2011). Epidemiología del cáncer en niños mexicanos: Resultados globales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, [Internet], pp. 43-70. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ims/ims-2011/ims111f.pdf> [Consultado 22 Nov. 2019].
9. Zapata-Tarres, M., Sánchez-Huerta, JL., Angeles-Florian, T., Parra-Ortega, I., Klunder-Klunder, M., Vilchis-Ordoñez, A., Dorantes-Acosta, E., Juárez-Villegas, L., Sánchez-Urbina, R. y López-Martínez, B. (2017). Identificación de alteraciones moleculares en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda. *Rev Hematol Mex*, [Internet] (18), pp. 47-57. Disponible en: <https://revistadehematologia.org.mx/> [Consultado 5 Dic. 2019].
10. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (30 de Enero de 2015). Estadísticas a Propósito del día mundial del cáncer, datos en Sinaloa, [Internet]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2015/cancer25.pdf> [Consultado 30 Nov. 2019].
11. Rio, DC., Ares Jr, M., Hannon, GJ. y Nilsen, TW. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, [Internet], pp. 1-3. Disponible en: <http://csbprotocols.cshlp.org/content/2010/6/prot5439.full.pdf+html> [Consultado 23 Nov. 2019].
12. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, [Internet] (51), pp. 263-273. Disponible en: <http://symposium.cshlp.org/content/51/263.long> [Consultado 25 Nov. 2019].
13. Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S. y Medina-Sansón, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, [Internet] (12), pp. 162-173. Disponible en: <https://www.elsevier.es/revista-gaceta-mexicana-oncologia-305> [Consultado 21 Nov. 2019].
14. Drabik A., Bodzón-Kuśkowska A. y Silberring J. (2016). Gel electrophoresis. En: P. Ciborowski y J. Silberring, ed., *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 2da ed. [Internet] P. Ciborowski y J. Silberring, pp. 115-143. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444636881/proteomic-profiling-and-analytical-chemistry?via=ihub=#book-description> [Consultado 20 Nov. 2019].
15. Young-Uk, C., Hyun-Sook, C., Seongsoo, J., Eul-Ju, S., Jung-Hee, L., Je-Hwan, L., Jong-Jin, S., Kyoo-Hyung, L. y Chan-Jeoung, P. (2008). The Molecular Screening Using Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction and the Comparison with Cytogenetic Analysis in the Prognostic Stratification of Acute Leukemia. *Blood*, [Internet] (112), pp. 4868. Disponible en: <https://ashpublications.org/blood/article/112/11/4868/61684/The-Molecular-Screening-Using-Multiplex-Reverse> [Consultado 4 Dic. 2019].
16. Lacayo-Leñero, D., Crespo-Solis, E., Guzmán-Urbe, P., Tussie-Luna MI., Tussie-Luna MT., Rosas-López, A., Cerrillo-Hinojosa M. y Segura-Kato Y. (2014). Experience on the Application of a Commercial RT-PCR Kit on the Diagnosis of 28 Chromosomal Translocations Associated with Acute Leukemia in Adults. *Blood*, [Internet] (124), pp. 5323. Disponible en: https://www.researchgate.net/journal/0006-4971_Blood [Consultado 3 Dic. 2019].
17. Centro Nacional para la Salud y Adolescencia. (15 de abril de 2019) *Cáncer Infantil en México*. [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/o7Censia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956> [Consultado 23 Nov. 2019].
18. Kakihana, K., Kubo, F., Wakabayashi, S., Kurosu, T., Miki, T., Murakami, N. y Miura, O. (2008). A novel variant form of MLL-ELL fusion transcript with t(11;19)(q23;p13.1) in chronic myelomonocytic leukemia transforming to acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, [Internet] (184), pp.109-112. Disponible en: [https://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608\(08\)00229-X/fulltext](https://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608(08)00229-X/fulltext) [Consultado 3 Dic. 2019].
19. Huret, JL. (12 de 1997). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. [Internet]. Disponible en: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1119ELLID1029.html> [Consultado 24 Nov. 2019].
16. Lacayo-Leñero, D., Crespo-Solis, E., Guzmán-Urbe, P., Tussie-Luna MI.