

# Estandarización de la técnica PCR anidada para la detección de las translocaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL* en pacientes con leucemia mieloide aguda remitidos a la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit

Standardization of the nested PCR technique for the detection of *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* and *BCR/ABL* translocations in patients with acute myeloid leukemia referred to Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit

Thais Rivodó<sup>1a</sup>, Juan M. Núñez<sup>2c</sup>, Betania V. Rodríguez<sup>3a</sup>, María A. Duarte<sup>4a</sup>, Antonietta Porco<sup>5d</sup>, Daniela A. Escobar<sup>6a</sup>, Ana F. Convit<sup>7a,b\*</sup>

## RESUMEN

*La detección de alteraciones genéticas en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) permite un mejor pronóstico de la enfermedad y de la respuesta clínica de los pacientes. A través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa*

*(RT-PCR, por sus siglas en inglés) anidada, es posible detectar hasta 1 célula mutada/10<sup>6</sup> células sanas, de las translocaciones cromosómicas más frecuentes en pacientes con LMA: t(15;17), t(8;21) y t(9;22). La sensibilidad y eficacia de esta técnica depende fundamentalmente del diseño de los cebadores utilizados en la reacción. Por ello, en la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) se llevó a cabo la estandarización de la PCR anidada y evaluación de cebadores previamente notificados en la literatura para la detección de las mutaciones más comunes en pacientes con LMA, con el fin de validar y confirmar la especificidad de los cebadores empleados en el diagnóstico realizado en esta Unidad. Los productos evaluados para cada variante en estudio fueron secuenciados mediante el método de Sanger y analizados utilizando herramientas bioinformáticas (PCR virtual, MegaX y BLASTN). Nuestros resultados evidencian altos porcentajes de identidad y cobertura para las mutaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL*. Adicionalmente, las secuencias obtenidas fueron publicadas en GenBank. Los resultados, confirman la especificidad y eficiencia de los cebadores siendo adecuados para el diagnóstico molecular en pacientes con LMA en la UDM-FJC, y pudiendo ser referencia para otros laboratorios en la*

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2023.131.3.9>

<sup>1</sup>Licenciada en Biología, Mención Biología Celular, <sup>2</sup>Licenciado en Biología, Mención Biología Celular, <sup>3</sup>Licenciada en Bioanálisis, <sup>4</sup>PhD en Ciencias, Mención Inmunología, <sup>5</sup>PhD en Ciencias, Mención Biología Molecular, <sup>6</sup>Licenciada en Ciencias Biológicas, <sup>7</sup>Magíster en Gerencia Pública.

<sup>a</sup>Unidad de Diagnóstico Molecular, Fundación Jacinto Convit, Caracas, Venezuela, <sup>b</sup>Jacinto Convit World Organization, Inc., California, EUA, <sup>c</sup>Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, <sup>d</sup>Laboratorio de Genética Molecular Humana, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. E-mail: \*publicaciones@jacintoconvit.org

Recibido: 5 de diciembre 2022

Aceptado: 29 de junio 2023

*detección de las mutaciones genéticas más frecuentes en este tipo de leucemia.*

**Palabras clave:** *Leucemia mieloide aguda, RT-PCR anidada, BCR/ABL, PML/RARA $\alpha$ , RUNX1/RUNX1T1, secuenciación de Sanger.*

## SUMMARY

*The detection of genetic alterations in patients with acute myeloid leukemia (AML) allows a better prognosis of the disease and clinical response of patients. Through the nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, it is possible to detect up to 1 mutated cell /10<sup>6</sup> healthy cells of the most frequent chromosomal translocations in patients with AML: t(15;17), t(8;21) and t(9;22). The sensitivity and efficacy of this technique depend fundamentally on the design of the primers used in the reaction. For this reason, the Unidad de Diagnóstico Molecular of Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) carried out the nested PCR standardization and evaluation of primers previously described in the literature for the detection of the most common mutations in patients with AML, to validate and confirm the specificity of the primers used in the diagnosis provided by this unit. The products evaluated for each of the studied variants were sequenced using the Sanger method and analyzed using bioinformatics tools (virtual PCR, MegaX, and BLASTN). Our results showed high percentages of identity and coverage of the variants found for the PML/RAR $\alpha$ , RUNX1/RUNX1T1, and BCR/ABL mutations. Additionally, the achieved sequences were published in GenBank. The results confirm the specificity and efficiency of the primers, being suitable for the molecular diagnosis of patients with AML at UDM-FJC and may be a reference to other laboratories in the detection of the most frequent genetic mutations for this type of leukemia.*

**Keywords:** *Acute myeloid leukemia, nested RT-PCR, BCR/ABL, PML/RARA $\alpha$ , RUNX1/RUNX1T1, Sanger sequencing.*

## INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) comprende un grupo de trastornos hematológicos malignos heterogéneos de progresión rápida, caracterizados por la proliferación desregulada de células inmaduras de la línea mieloide (1). La LMA representa un 23,1 % del total de los casos de leucemia a nivel mundial (2) y, a pesar de que es el tipo más común de leucemia aguda

en adultos, también está presente en niños, representando hasta el 20 % del total de casos globales de leucemia pediátrica (3).

En Venezuela, para el año 2020, se estimaron 1 317 nuevos casos de leucemia en la población general, con aproximadamente 996 fallecidos (4). No obstante, las cifras estadísticas actuales de incidencia de LMA en la población general en el país se desconocen.

Las características morfológicas y citogenéticas de las células malignas de los pacientes con LMA son los factores pronósticos más importantes que se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes, así como en la comprensión de su fisiopatología.

En aproximadamente el 50 %-60 % de los pacientes diagnosticados con LMA se detectan anomalías citogenéticas o rearrreglos cromosómicos no aleatorios, mientras que en otro subgrupo de pacientes con LMA (alrededor de 40 %-50 % de adultos y 35 % de niños) se presenta una citogenética normal, pero cuenta con mutaciones que desregulan la expresión genética (5). Todas estas alteraciones no solo son responsables del desarrollo de la leucemia, sino que además constituyen marcadores que brindan información pronóstica que permite estratificar por riesgo a los pacientes y orientar su tratamiento (1).

La identificación de genes de fusión relevantes es imprescindible para llevar a cabo el proceso de diagnóstico de rutina según los más avanzados protocolos clínicos para pacientes con leucemia, ya sea para la estratificación de riesgo, tratamientos específicos y/o como marcadores para monitorear la enfermedad mínima residual (EMR) durante el tratamiento. Los transcritos de fusión generados a partir de translocaciones cromosómicas pueden ser detectados por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el crecimiento celular desregulado y la heterogeneidad clínica están presentes en las enfermedades hematológicas, incluso en subgrupos genéticamente homogéneos caracterizados por el mismo transcrito de fusión (5). Las alteraciones cromosómicas más comunes en la LMA incluyen t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22) y t(9;22)(q34;q11) (6).

La t(15;17)(q22;q21), que resulta en el gen de fusión *PML/RAR $\alpha$* , es una alteración de buen pronóstico y se encuentra en el 90 % de los pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA). Esta alteración representa un subtipo de leucemia que constituye entre el 5 % y el 10 % de los casos de LMA, para la cual se emplea el ácido transretinoico (ATRA, por sus siglas en inglés) como terapia dirigida (7,8).

Por su parte, la t(8;21)(q22;q22), que genera el gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1*, está presente en el 10 % de los casos de LMA. Dicha translocación es una de las mutaciones más prevalentes en LMA pediátrica que muestra una respuesta positiva a la quimioterapia convencional con arabinósido de citosina (9) y está asociada a un pronóstico favorable cuando no están presentes otras anomalías genéticas (10-12).

Finalmente, la t(9;22)(q34;q11), que genera el gen de fusión *BCR/ABL1* o cromosoma Filadelfia, a pesar de estar más frecuentemente asociada a una enfermedad más agresiva en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide crónica (LMC) (13,14), también ha estado relacionada con el desarrollo de LMA con rangos de incidencia de 0,5 % a 3 % (15). Esta última translocación se encuentra asociada a una enfermedad más agresiva, aunque la supervivencia de estos pacientes ha aumentado por el uso de inhibidores de tirosina quinasa (TKI, por sus siglas en inglés) (16,17).

El uso de una combinación de técnicas moleculares sensibles y específicas como RT-PCR, permite detectar de manera eficaz y rápida las mutaciones más comunes en pacientes con LMA, particularmente cuando es RT-PCR anidada (de dos rondas), cuya sensibilidad detecta una célula positiva dentro de un contexto de  $10^5$ - $10^7$  células normales (18). En esta metodología se realizan dos rondas de amplificación secuencial, cada una con su respectivo par de cebadores (18), constituyendo una de las variantes más específicas y sensibles de PCR, ideal para amplificar copias de ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero (ARNm) que se encuentre en poca cantidad en una muestra clínica y que contenga una población heterogénea integrada por varios tipos celulares (19). Por tal razón, es fundamental el correcto diseño y uso de los cebadores, ya que se pueden generar productos inespecíficos

y formar estructuras secundarias o dímeros que disminuyen la eficiencia de la reacción (17), lo que puede afectar significativamente el resultado del diagnóstico de un paciente.

Para garantizar un resultado fiable es necesario validar los cebadores que se utilizan en la prueba. La validación de los cebadores se puede realizar a través de herramientas bioinformáticas y la evaluación experimental en el laboratorio, a partir de la verificación de los productos obtenidos por RT-PCR anidada (19-22). Esto último se logra mediante la determinación del tamaño de los fragmentos, a través de electroforesis en geles de agarosa y secuenciación de los mismos. Las secuencias obtenidas son comparadas con la base de datos para evaluar el porcentaje de identidad y cobertura, lo cual permite la identificación de genes y variantes (23).

Debido a lo expuesto, la UDM-FJC —que brinda un servicio de diagnóstico molecular gratuito a la población oncológica más vulnerable que acude a hospitales públicos de Venezuela— se propuso llevar a cabo la estandarización de la técnica de PCR anidada, como método de diagnóstico molecular de las translocaciones más frecuentes reportadas en pacientes con LMA y la validación de los cebadores previamente descritos en la literatura (17), para ser empleados en la detección de las mutaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL* mediante RT-PCR anidada en pacientes con LMA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras

#### 1.1. Muestras biológicas

Se utilizó ADNc obtenido previamente mediante transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) a partir del ARN aislado de muestras de sangre periférica o médula ósea de los pacientes (2 muestras de sangre periférica y 2 muestras de aspirado de médula ósea), y en los que previamente se detectó la presencia de las translocaciones a evaluar. Estas muestras se procesaron en la UDM-FJC, procedentes de los servicios de hemato-oncología de los centros con los cuales la FJC ha suscrito convenios, como: el Hospital Universitario de Caracas, el Hospital de Niños “J. M. de los Ríos”, la

Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera y el Instituto Autónomo del Hospital Universitario de Los Andes. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado firmado por los representantes de los pacientes, autorizando la realización del diagnóstico del panel LMA (*PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL*) y estudios de investigación a partir de dichas muestras. Dicho consentimiento informado cuenta con el aval del respectivo Comité de Bioética o de la autoridad competente de cada institución hospitalaria indicada: del Hospital de Niños “J.M. de los Ríos”, obtenido en fecha 1 de marzo de 2016; de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera, el 25 de septiembre de 2018; y del Instituto Autónomo del Hospital Universitario de Los Andes, el 22 de marzo de 2019. El presente estudio guarda relación directa con la condición clínica que motivó la extracción original de la muestra.

## 1.2. Líneas celulares

Se realizó extracción de ARN y síntesis de ADNc proveniente de las líneas celulares NB4, Kasumi-1, OP-1 y K562, las cuales poseen las translocaciones *PML/RAR $\alpha$*  variante *bcr1/2*, *RUNX1/RUNX1T1*, *BCR/ABL* variante *p190* y *BCR/ABL* variante *p210*, respectivamente. Estas líneas celulares fueron donadas por el St. Jude Children’s Research Hospital de Estados Unidos de América (EUA).

## 2. PCR virtual

En el Cuadro 1, se muestran las secuencias de los cebadores empleados en la UDM-FJC, previamente notificados en la literatura (17). El sitio de hibridación de estos cebadores fue evaluado *in silico* mediante una PCR virtual con el software Sequence Extractor (24), usando secuencias de referencia reportadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los EUA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) como molde (Cuadro 2).

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR anidada del gen *GAPDH* y las mutaciones *PML/RAR $\alpha$  bcr1*, *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL p190* y *BCR/ABL p210*

Gen y mutaciones	Ronda de PCR	Secuencia 5'→3'
<i>GAPDH</i>		CATCAAGAAGGTGGTGAA GGGTCTTACTCCTTGGAG
<i>PML/RAR<math>\alpha</math> bcr1/2(32)</i>	1era Ronda	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA GCTTGTAGATGCGGGGTAGA
	2da Ronda	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT
<i>RUNX1/RUNX1T1(32)</i>	1era Ronda	CTACCGCAGCCATGAAGAACC AGAGGAAGGCCCATTTGCTGAA
	2da Ronda	ATGACCTCAGGTTTGTTCGGTCC TGAAGTGGTCTTGGAGCTCCT
<i>BCR/ABL p210(32)</i>	1era Ronda	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC GTTTGGGCTTCACACCATTC
	2da Ronda	CAGATGCTGACCAACTCGTGT TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA

Cuadro 2. Secuencias empleadas como molde para la PCR virtual

Alteración cromosómica	Gen	Número de acceso Gen Bank*	Fecha de publicación
t(15;17)	<i>PML</i>	NM_033238.3	22 Ago 2021
	<i>RARA</i>	NM_000964.4	08 Nov 2021
t(8;21)	<i>RUNX1</i>	NM_001754.5	30 Nov 2021
	<i>RUNX1T1</i>	NM_004349.4	17 Oct 2021
t(9;22) variante <i>p190</i>	<i>BCR</i>	NM_021574.3	03 Oct 2021
	<i>ABL</i>	NM_007313.2	22 Nov 2021
t(9;22) variante <i>p210</i>	<i>BCR</i>	NM_004327.4	03 Oct 2021
	<i>ABL</i>	NM_007313.2	22 Nov 2021

\* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

### 3. Extracción del ARN

La extracción del material genético se realizó mediante el uso del reactivo TRIZOL®. Cada una de las muestras en estudio (1 mL de volumen inicial) fue diluida en buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) 1X en una proporción 1:1. Luego la dilución fue colocada en medio de gradiente de densidad, permitiendo el aislamiento de células mononucleares por acción de la centrifugación a 1 800 rpm (290 g) durante 30 minutos. El anillo de glóbulos blancos obtenido, fue inmediatamente aislado y centrifugado en frío (4 °C) a 9 000 rpm (7 245 g) durante 5 minutos; luego de lo cual se añadió el reactivo TRIZOL® (en una proporción de 1 mL para una población de 10<sup>7</sup> células), se homogenizó levemente por pipeteo y se incubó en frío (-80 °C) durante un mínimo de 2 horas, con la finalidad de inactivar las proteínas e inhibir las nucleasas, permitiendo la separación de las muestras en dos fases, una fase orgánica donde queda solubilizado el ADN, y una fase acuosa donde se encuentra contenido el ARN de interés. Posteriormente se agregó cloroformo a la mezcla (en una proporción de 0,5 mL para un volumen de 1 mL de muestra homogenizada en TRIZOL®). Dicha mezcla fue centrifugada en frío (4 °C) a 12 000 rpm (12 879 g) durante 5 minutos, luego de lo cual se recuperó la fase acuosa y se combinó con isopropanol en una proporción 1:1. Esta mezcla fue incubada a 25 °C durante 10 minutos e inmediatamente centrifugada a 12 000 rpm (12 879 g) durante 15 minutos. El sedimento recuperado, luego de

la centrifugación, fue lavado con solución de etanol al 70 % y centrifugado a 12 000 rpm (12 879 g) durante 5 minutos. El sedimento obtenido fue incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos; posteriormente fue solubilizado en agua libre de ARNasas e incubado a 56 °C durante 15 minutos. Todas las muestras de ARN aisladas en el presente estudio fueron criopreservadas a -80 °C hasta su uso.

### 4. Síntesis de ADNc

A partir de las muestras de ARN aisladas, se realizó la síntesis de ADNc de cada una de ellas. Durante la primera etapa de este protocolo, se llevó a cabo la reacción de pre-síntesis de ADNc, mezclando 200 ng de ARNm con 20 µg/mL Random Primer (Promega) en 3 µL de agua libre de ARNasas (IBI). Las muestras preparadas fueron incubadas a 65 °C durante 5 minutos; posteriormente, fueron colocadas en bloque de enfriamiento, realizándose a continuación la adición de los siguientes reactivos, hasta completar un volumen final de 20 µL: buffer de reacción (250 nM Tris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> [50 mM DTT], RNAsin [1U/µL], enzima M-MLV RT [10U] y dNTPs [2 mM]) (Promega). Las muestras fueron llevadas al termociclador y la RT programada bajo el siguiente esquema: 25 °C de hibridación durante 5 minutos, seguido de una fase de polimerización a 42 °C por 60 minutos y una extensión final a 70 °C durante 5 minutos.



### 5. Reacción de PCR anidada y visualización de productos

La calidad del ADNc obtenido se confirmó amplificando por PCR el gen constitutivo *GAPDH*, con los cebadores *GAPDH* “Up/Down” descritos en el Cuadro 1. Para ello, se prepararon las mezclas de reacción de PCR en un volumen de 11,2  $\mu$ L de agua, para un volumen final de 20  $\mu$ L: buffer de reacción 5X ([Cf]= 1X),  $MgCl_2$  (1,5 mM), dNTPs (150  $\mu$ M), cebadores de *GAPDH* “Up/Down” (0,25  $\mu$ M), enzima Taq Pol G2 Flexi (1U) (Promega) y 200 ng de ADNc. Las muestras fueron incubadas en el termociclador durante 5 minutos a 95 °C. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos de amplificación programados a 95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; y se realizó una ronda de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La reacción se realizó en un termociclador de triple bloque (Applied Biosystems), y los productos de amplificación fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa preparados al 2,5 %, teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel stain y visualizados con el equipo Axygen® Gel Documentation System y fotodocumentados con Axygen Imaging.

La PCR para la amplificación de cada transcrito de fusión se realizó por separado para cada mutación analizada en este estudio. Las reacciones fueron llevadas a cabo siguiendo las condiciones descritas a continuación: 95 °C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, terminando con una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los cebadores empleados para la amplificación de los genes de fusión *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNXIT1* *BCR/ABL p190* y *BCR/ABL p210*, se encuentran descritos en el Cuadro 1. La primera y segunda ronda de amplificación fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones de reacción descritas previamente.

Se incorporaron en la PCR anidada, controles positivos (pacientes con la mutación en estudio), controles sanos (individuos sin la patología) y controles negativos (sin templado). Los productos amplificados por RT-PCR anidada fueron evaluados a través de electroforesis en geles de

agarosa al 2,5 % teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel stain, visualizados con el equipo Axygen® Gel Documentation System y fotodocumentados con Axygen Imaging.

### 6. Purificación de productos y secuenciación automatizada

Los productos de RT-PCR anidada obtenidos por separado para cada mutación analizada en este estudio, con los cebadores previamente mencionados en el Cuadro 1, fueron purificados empleando el Kit comercial FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp). Para ello se cortó, con ayuda de un bisturí, la banda de amplificación visualizada en el gel de agarosa y se transfirieron aproximadamente 300 mg de gel a un tubo estéril de 1,5 mL. El fragmento extraído fue solubilizado en 500  $\mu$ L de buffer de lisis FADF provisto en el kit y homogenizado brevemente con ayuda de un vórtex. La mezcla homogenizada fue incubada durante 10 minutos a 55 °C, agitándola cada 2 minutos durante la incubación para favorecer la completa disolución del gel en el buffer. La mezcla fue transferida a una columna de filtración FADF, la cual fue colocada en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y centrifugada a 12 000 rpm (12 879 g) durante 30 segundos. Tras este proceso, el sobrenadante fue descartado. La columna fue lavada con 750  $\mu$ L de buffer de lavado complementado con solución de etanol, y centrifugada a 12 000 rpm (12 879 g) durante 30 segundos. Para favorecer el completo secado de la columna e incrementar la pureza de las muestras purificadas, la columna fue centrifugada por 3 minutos adicionales a una velocidad de 18 000 rpm (18 879 g); luego de lo cual fue transferida a un tubo de colección estéril de 2 mL donde se le adicionaron 40  $\mu$ L de agua grado biología molecular (IBI), directamente al centro de la membrana de filtración. La columna fue dejada en reposo durante 1 minuto para finalmente realizar la elución del ADN por centrifugación a 18 000 rpm (18 879 g), por 1 minuto adicional. Los productos purificados fueron visualizados con electroforesis en geles de agarosa y posteriormente secuenciados en Molecular Cloning Laboratories (MCLAB), C.A. (San Francisco, EUA) con el empleo de cebadores sentido y antisentido listados en el Cuadro 1.

## 7. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de MCLAB fueron visualizadas y analizadas empleando el software Mega versión X, y alineadas usando el algoritmo ClustalW. Las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas y comparadas con secuencias reportadas en GenBank, por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool - BLASTN; esto con el fin de evaluar el porcentaje de identidad y cobertura de cada una de ellas.

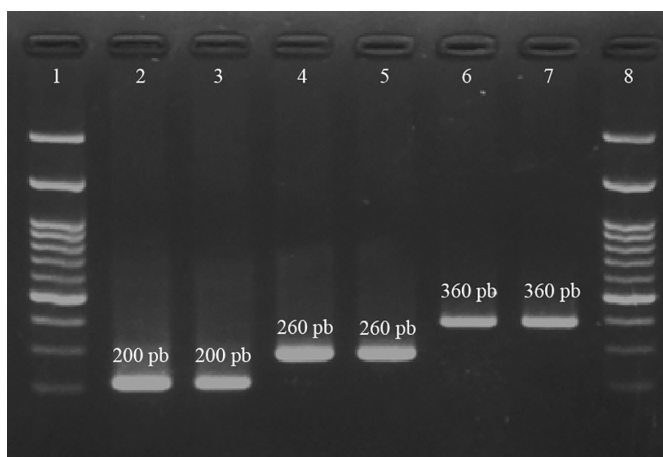
## RESULTADOS

### Transcritos de fusión obtenidos con RT-PCR anidada

Los resultados de la amplificación mediante RT-PCR anidada para la detección de los transcritos de fusión para la LMA coincidieron con los obtenidos en la PCR virtual (Cuadro 3).

Tabla 3. Cuadro comparativo de los tamaños del producto amplificado por PCR anidada para cada transcrito de fusión, en comparación con los tamaños obtenido por PCR virtual

Translocación	Tamaño en PCR virtual	Tamaño obtenido por RT-PCR	% cobertura e identidad	N° de acceso GenBank
<i>BCR/ABL</i> variante <i>p190</i>	380 pb	381 pb	100	MH743144.1
<i>BCR/ABL</i> variante <i>p210</i>	360 pb	360 pb	99	MH401089.1
<i>PML/RAR<math>\alpha</math></i>	178 pb	200 pb	100	OK063981
<i>RUNX1/RUNX1T1</i>	260 pb	260 pb	100	OK063978



**Figura 1.** Visualización de los productos de amplificación para los transcritos de fusión del panel LMA. Se visualizan los patrones de bandas obtenidos para cada transcrito de fusión en conjunto con el control positivo de cada translocación. Los controles negativos y sanos para cada transcrito fueron igualmente evaluados. Carril 1 y 8: marcador de tamaño molecular (Promega, 1kb). Carril 2: línea celular NB4, empleada como control positivo para la translocación *PML-RAR $\alpha$* . Carril 3: paciente seleccionado como control positivo para la translocación *PML-RAR $\alpha$*  (muestra de sangre periférica). Carril 4: línea celular Kasumi-1, empleada como control positivo para la translocación *AML-ETO*. Carril 5: paciente seleccionado como control positivo para la translocación *AML-ETO* (muestra de aspirado de médula ósea). Carril 6: línea celular K562, empleada como control positivo para la translocación *BCR-ABL* variante *p210*. Carril 7: paciente seleccionado como control positivo para la translocación *BCR-ABL*, variante *p210* (muestra de sangre periférica).

La amplificación por RT-PCR anidada de la variante *bcr1* del transcrito de fusión *PML/RAR $\alpha$*  reveló la presencia de una banda cercana a los 200 pares de bases (pb) aproximadamente

(Figura 1). Este tamaño es cercano al que se obtuvo de 178 pb mediante la PCR virtual empleando la secuencia de referencia *bcr1* de *PML/RAR $\alpha$*  (Cuadro 2). La secuencia consenso

obtenida se denominó proteína de fusión *PML/RAR $\alpha$*  y se publicó en GenBank bajo el número de acceso OK063981. Asimismo, se analizó la secuencia consenso con BLASTN y se obtuvo una cobertura e identidad de un 100 % en ambos casos, al comparar la secuencia consenso con otras reportadas (NG\_029036.1). Finalmente, se identificó el punto de corte para *PML-RAR $\alpha$ -Bcr1* en los exones 6 y 3 de las secuencias de *PML* y *RAR $\alpha$*  (NM\_033238.3 y NM\_000964.4), respectivamente, y se confirmó la presencia de la variante *bcr1* de *PML/RAR $\alpha$* .

En relación con la amplificación del transcrito de fusión *RUNX1/RUNX1T1*, reveló una banda de 260 pb aproximadamente (Figura 1), cuyo tamaño se corresponde con el obtenido mediante la PCR virtual (260 pb) empleando la secuencia de referencia para los genes *RUNX1* y *RUNX1T1* (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenida se denominó proteína de fusión *RUNX1/RUNX1T1* y fue publicada en GenBank bajo el número de acceso OK063978. Adicionalmente, se analizó la secuencia consenso con BLASTN y se obtuvo una cobertura e identidad de un 100 % en ambos parámetros, en relación con otras secuencias para el gen *RUNX1* y *RUNX1T1* reportadas (MG551956.1, MG551955.1, KJ189470.1). De igual manera, se identificó el punto de corte para la proteína de fusión *RUNX1/RUNX1T1* en el exón 5 de *RUNX1* (NM\_001754.5) y en el exón 2 de *RUNX1T1* (NM\_004349.4).

La amplificación por RT-PCR anidada para la detección de la variante *p190* del transcrito de fusión *BCR/ABL* reveló la presencia de una banda de 380 pb aproximadamente (Figura 1), cuyo tamaño es cercano al que se obtuvo de 381 pb mediante la PCR virtual con el empleo de la secuencia de referencia de la variante *e1a2* (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenida con Mega X se denominó proteína de fusión *BCR-ABL* variante *p190* y se publicó en GenBank bajo el número de acceso MH743144.1. Posteriormente, con BLASTN se obtuvo una cobertura e identidad del 100 % al comparar *FJC-BCR-ABL-p190* con otras secuencias publicadas (AF113911). Asimismo, se identificó el punto de corte de la secuencia consenso en el exón 1 de *BCR* (NM\_021574.3) y exones 1 y 2 de *ABL* (NM\_007313.2), respectivamente, confirmando la variante *e1a2* de *BCR/ABL1*.

El análisis para la detección de la variante *p210* del transcrito de fusión *BCR/ABL* evidenció una banda de aproximadamente 360 pb (Figura 1), coincidiendo con el tamaño de 360 pb que se obtuvo por la PCR virtual al emplear la secuencia de referencia de la variante *b3a2* (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenida con Mega X se denominó *BCR-ABL* variante *p210* y se publicó en GenBank con el número de acceso MH401089.1. La secuencia consenso se analizó con BLASTN y se obtuvo una cobertura e identidad del 99 %, al comparar la secuencia consenso con otras reportadas para la variante *b3a2* de *BCR/ABL* (AJ131466.1, M25946.1, EU216071.1). Finalmente, se identificó el punto de corte de *FJC-BCR-ABL1-p210* en el exón 14 de *BCR* (NM\_004327.4) y exón 2 de *ABL* (NM\_007313.2), respectivamente, con lo que se confirmó la presencia de la variante *b3a2* de *BCR/ABL*.

## DISCUSIÓN

La identificación de las mutaciones en LMA ha facilitado la discriminación a nivel biológico y clínico de la enfermedad en distintos subtipos, y ha permitido mejorar la predicción de los diagnósticos, así como las opciones de tratamiento para los pacientes (1,25). La detección de mutaciones genéticas en LMA ha ocasionado que la sobrevivencia de los pacientes con la enfermedad haya incrementado hasta el 63 % en la última década (26).

Contar con una combinación de técnicas altamente sensibles y específicas como RT-PCR anidada, capaz de detectar de manera eficaz y rápida algunas de las mutaciones más comunes en pacientes con LMA, tales como t(15;17), t(8;21) y t(9;22), es de gran importancia. Estudios similares demuestran que la RT-PCR anidada es una combinación de técnicas de biología molecular que se continúa empleando para la detección de dichas mutaciones en pacientes con la enfermedad (27-30).

La sensibilidad y eficacia de la RT-PCR anidada depende en gran parte de los cebadores utilizados (31). Múltiples estudios a nivel internacional han descrito la importancia de la



validación de los cebadores para su uso en RT-PCR anidada (32,33). Para dicha validación, una de las técnicas de laboratorio más empleada es la secuenciación, la cual permite la identificación de genes y variantes (17). La secuenciación por el método de Sanger es la técnica estándar de oro, que proporciona la información definitiva para confirmar las variantes de pequeño tamaño mediante el uso de herramientas bioinformáticas (17,32).

En este trabajo se estandarizó la técnica de PCR anidada, y se validaron y confirmaron los cebadores que se emplean en la detección de las mutaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL* en pacientes con LMA, a través de la secuenciación por Sanger de los productos de RT-PCR anidada de dichas translocaciones y el empleo de programas bioinformáticos.

En el caso de *PML/RAR $\alpha$* , los cebadores permitieron detectar la variante *bcr1*, siendo esta una de las variantes encontradas con mayor frecuencia en pacientes con LPA en una proporción de 55 % (34,35). Un diagnóstico temprano de *PML/RAR $\alpha$*  es de suma importancia, ya que gran parte de los pacientes con LPA *de novo* entran en remisión de la enfermedad al ser tratados con ATRA (36). Para *RUNX1/RUNX1T1*, se logró la detección del transcrito de interés que concuerda con lo descrito en la literatura (37). La fusión del gen *AML1 (RUNX1)*, esencial para una hematopoyesis normal con el gen correpresor transcripcional *ETO (RUNX1T1 o MTG8)*, deriva en una proteína anormal con múltiples efectos en la proliferación, diferenciación y viabilidad de las células leucémicas. La presencia de esta alteración molecular en los pacientes con LMA, le confiere particularidades clínicas y biológicas que han permitido caracterizarlos como LMA con anomalías genéticas recidivantes (9). La detección temprana de este transcrito de fusión resulta vital en términos del porcentaje de supervivencia y respuesta al tratamiento en pacientes positivos para esta translocación. Por último, se detectaron las variantes *p190* y *p210* de *BCR/ABL1*, consideradas como las anomalías genéticas más comunes en los pacientes con leucemia y que se encuentran asociadas a todos los tipos de leucemia, incluyendo LMA (38, 39).

Es importante resaltar que existen varios estudios a nivel mundial sobre *PML/RAR $\alpha$* ,

*RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL*, en los cuales se secuencian los productos de RT-PCR anidada obtenidos para confirmar la especificidad de la reacción (40-43). En este sentido, las secuencias obtenidas en este trabajo fueron publicadas en GenBank, aportando información de relevancia para el avance de la investigación científica a nivel mundial. Los trabajos de secuenciación llevados a cabo para la presente publicación fueron realizados con el único fin de comprobar y validar la especificidad de los cebadores empleados en la Unidad y reportados previamente en la literatura; con lo cual, no es necesario incluir la secuenciación de los productos de amplificación como parte del protocolo de rutina para pruebas de diagnóstico y detección molecular de oncogenes en laboratorios de biología molecular.

En resumen, los cebadores previamente descritos en la literatura y utilizados en la UDM-FJC para la detección de las mutaciones t(15;17), t(8;21) y t(9;22), presentan una alta especificidad y eficiencia, y pueden ser utilizados para el diagnóstico de las mutaciones más comunes en pacientes con LMA.

La metodología estandarizada en esta Unidad resulta de muy bajo costo en comparación con los diversos estuches comerciales disponibles en el mercado actualmente, lo que permite disminuir y optimizar el uso de recursos en los laboratorios diagnósticos y alcanzar a un mayor número de beneficiarios. De igual manera, mediante esta metodología es posible ajustar y adecuar las condiciones de amplificación con base en los requerimientos de cada laboratorio y los objetivos planteados que se deseen alcanzar.

Finalmente, los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica presentada, permitirán llevar a cabo el desarrollo de una metodología de PCR Multiplex, para la amplificación simultánea de todas las translocaciones evaluadas para el panel de LMA, en muestras de pacientes que acuden a la FJC; permitiendo un mejor uso de recursos, disminuyendo las horas hombre y acortando significativamente el tiempo de respuesta y entrega de resultados, sin comprometer la efectividad y especificidad de la técnica, y garantizando la confiabilidad y precisión de los resultados.

## CONCLUSIÓN

En la UDM-FJC se estandarizó la técnica de PCR anidada, y se validó y confirmó que los cebadores notificados por van Dongen y col. en 1999 (17), pueden usarse de manera confiable para la detección de las mutaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1*, *BCR/ABL* variante *p210* y *BCR/ABL* variante *p190* en los casos de pacientes referidos a la Unidad.

La determinación de dichas mutaciones se emplea para el diagnóstico y clasificación molecular de la LMA en la población, lo que contribuye fundamentalmente a la estratificación del riesgo de la enfermedad, y permite brindar al paciente una terapia personalizada que incide de manera importante en sus niveles de sobrevida.

Este estudio sirve como referencia para otros laboratorios de diagnóstico molecular, debido a que se confirma que los cebadores previamente notificados en la literatura y validados por la UDM-FJC, presentan una alta especificidad y eficiencia en la detección de las mutaciones más frecuentes en pacientes con LMA.

Cabe destacar que las secuencias obtenidas y publicadas en GenBank por la UDM-FJC son una referencia de las translocaciones en pacientes con LMA en Venezuela. La proporción de los diferentes tipos de leucemia aguda que prevalecen en el país permite hacer comparaciones con otros países del mundo, en comportamiento y desenlace, lo que proporciona información útil de esta patología.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los servicios de hemato-oncología de los centros de salud en convenio con la FJC y al St. Jude Children's Research Hospital por la donación de las líneas celulares que fueron usadas como controles positivos en el presente estudio. Adicionalmente, los autores extienden un especial agradecimiento a la Dra. Jeismar Carballo por sus importantes aportes en la revisión y edición del manuscrito. El financiamiento de este trabajo fue realizado por la Fundación Jacinto Convit y Jacinto Convit World Organization, Inc.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

1. Lagunas-Rangel FA. Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gac Mex Oncol.* 2016;15(3):150-157.
2. Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9(14):1-11.
3. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med.* 2018;24(1):103-112.
4. Globocan WHO. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. World Health Organ Int Agency Res Cancer. Disponible en: <https://www.iarc.fr/news-events/latest-world-cancer-statistics-globocan-2012-estimated-cancer-incidence-mortality-and-prevalence-worldwide-in-2012>.
5. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hashemi AS, Hekmatimoghaddam S. Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2231-2253.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405.
7. Wafa A, Moassass F, Liehr T, Al-Ablog A, Al-Achkar W. Acute promyelocytic leukemia with the translocation t(15; 17)(q22; q21) associated with t(1; 2)(q42~43; q11.2~12): A case report. *J Med Case Reports.* 2016;10(1):203.
8. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2017;31(1):63-76.
9. Garrote SH, Amor VAM, Díaz AC, et al. Gen de fusión AML1-ETO: particularidades en la leucemia mieloide aguda. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2014;30(2):98-107.
10. Abreu JC, Fontes RM, Matos JC, Jorge FG, Lima DS. Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21) variant: What is the value on clinical outcome? *Int J Contemp Pediatr.* 2017;4(5):1890-1893.
11. Schessl C, Rawat VPS, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, et al. The *AML1-ETO* fusion

- gene and the *FLT3* length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2159-2168.
12. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud Ø. Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: Clinical consequences and biological implications. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:104631.
  13. Neuendorff NR, Burmeister T, Dörken B, Westermann J. BCR-ABL-positive acute myeloid leukemia: a new entity? Analysis of clinical and molecular features. *Ann Hematol*. 2016;95(8):1211-1221.
  14. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-1918.
  15. Wasserman L. A nested RT-PCR assay to detect BCR/abl. *Molecular Diagnosis of Cancer*. 2004:181-190.
  16. Koo HH. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Korean J Pediatr*. 2011;54(3):106.
  17. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-1928.
  18. Kumar A, Chordia N. In silico PCR primer designing and validation. In: *PCR Primer Design*. Springer; 2015.p.143-151.
  19. Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet*. 2018;34(9):666-681.
  20. Totomoch-Serra A, Márquez MF, Cervantes-Barragán DE. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research*. 2017;6.
  21. Godoy M. Estudio molecular de la leucemia mieloide aguda en Venezuela [Tesis Doctoral]. [Caracas, Venezuela]: Universidad Simón Bolívar; 2013.
  22. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003;3(1):18.
  23. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410.
  24. Sequence Extractor. Disponible en: <https://www.bioinformatics.org/seqext/>
  25. Medrano MDC, Melchor OYL. Diseño, validación y aplicación de un set de primers para la detección de Hepatitis viral A. *Av Investig En Inocuidad Aliment*. 2018;1(1).
  26. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551.
  27. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-1738.
  28. Jing Y. The PML-RAR $\alpha$  Fusion Protein and Targeted Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(4):639-648.
  29. Mohajeri K, Cantsilieris S, Huddleston J, Nelson BJ, Coe BP, Campbell CD, et al. Interchromosomal core duplicons drive both evolutionary instability and disease susceptibility of the Chromosome 8p23. 1 region. *Genome Res*. 2016;26(11):1453-1467.
  30. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
  31. Kalendar R, Muterko A, Shamekova M, Zhambakin K. In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *Methods in molecular biology*. 2017;1620:1-31.
  32. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diagnóstico Prenat*. 2012;23(2):56-66.
  33. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood J Am Soc Hematol*. 2000;96(10):3343-3356.
  34. Zhang X, Yang C, Peng X, Chen X, Feng Y. Acute WT1-positive promyelocytic leukemia with hypogranular variant morphology, bcr-3 isoform of PML-RAR $\alpha$  and Flt3-ITD mutation: A rare case report. *Sao Paulo Med J*. 2017;135(2):179-184.
  35. Han J-Y, Kim K-E, Kim K-H, Park J-I, Kim J-S. Identification of PML-RARA rearrangement by RT-PCR and sequencing in an acute promyelocytic leukemia without t(15; 17) on G-banding and FISH. *Leuk Res*. 2007;31(2):239-243.
  36. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*. 1992;80(2):492-497.
  37. Grinev VV, Migas AA, Kirsanova AD, Mishkova OA, Siomava N, Ramanouskaya TV, et al. Decoding of exon splicing patterns in the human RUNX1-RUNX1T1 fusion gene. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;68:48-58.
  38. Siegele BJ, Nardi V. Laboratory testing in BCR-ABL1-like (Philadelphia-like) B- lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Hematol*. 2018;93(7):971-977.
  39. Zhang JG, Goldman JM, Cross NCP. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid

- leukaemia by PCR. *Br J Haematol.* 1995;90(1):138-146.
40. Niemöller C, Renz N, Bleul S, Blagitko-Dorfs N, Greil C, Yoshida K, et al. Single cell genotyping of exome sequencing-identified mutations to characterize the clonal composition and evolution of inv(16) AML in a CBL mutated clonal hematopoiesis. *Leuk Res.* 2016;47:41-46.
  41. Corradi B, Fazio G, Palmi C, Rossi V, Biondi A, Cazzaniga G. Efficient detection of leukemia-related fusion transcripts by multiplex PCR applied on a microelectronic platform. *Leukemia.* 2008;22:294-302.
  42. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577-e577.
  43. Mu W, Lu H-M, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. *J Mol Diagn.* 2016;18(6):923-932.