

## La biología molecular en la precisión diagnóstica de las leucemias

### Molecular biology in the diagnostic accuracy of leukemia

Ana María Amor Vigil, Lóndy Lorena Hernández Miranda, Carmen Alina Díaz Alonso, Lesbia Fernández Martínez, Vera Ruíz Moleón, Heidys Garrote Santana

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

Los estudios de citogenética y biología molecular permiten correlacionar la presencia de determinadas anomalías cromosómicas y moleculares con tipos específicos de leucemias y linfomas. Este conocimiento ha hecho posible el perfeccionamiento progresivo del sistema de clasificación de las enfermedades oncohematológicas. Actualmente la presencia de ciertas anomalías citogenéticas o moleculares son suficientes para identificar algunas de estas entidades y en ocasiones, el diagnóstico cambia después de un análisis integrado de la citomorfología con la citogenética y la biología molecular. Este reporte pretende resaltar la importancia del estudio molecular cuando la citomorfología es compleja y propicia diagnósticos erróneos. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa, previa reverso-transcripción del ARN aislado de sangre medular, se estudiaron cuatro biomarcadores: los genes de fusión AML1-ETO, BCR-ABL, CBF $\beta$ -MYH11 y PML-RAR $\alpha$ . Fueron estudiados 14 pacientes con diagnósticos inicial citomorfológico de: leucemia promielocítica (n= 6), leucemia aguda de linaje indefinido (n= 3) y dudoso entre leucemia mieloide crónica en crisis blástica mieloide y leucemia mieloide aguda (LMA) (n= 5). Al culminar la caracterización molecular todos fueron diagnosticados como LMA. Los resultados ilustran la importancia del estudio molecular en la clasificación de las leucemias, lo cual redundaría en que el paciente reciba el tratamiento más adecuado y alcance una mejor respuesta.

**Palabras clave:** diagnóstico; leucemia; biología molecular; AML1-ETO; BCR-ABL; CBF $\beta$ -MYH11; PML-RAR $\alpha$ .

## ABSTRACT

Cytogenetic and molecular studies have correlated the presence of certain chromosomal and molecular anomalies with leukemia and lymphomas specific types. These evidences have allowed the progressive improvement of the system of classification of the oncohematological entities. Currently, the presence of certain cytogenetic or molecular anomalies is sufficient to identify specific entities and, in some occasions, the diagnostic changes after an integral analysis of cytomorfologic, cytogenetic and molecular studies. T This report aims to highlight the importance of molecular study when cytomorphology is complex and leads to erroneous diagnoses. Through polymerase chain reaction, prior reverse transcription of the RNA isolated from medullary blood, four biomarkers were studied: the fusion genes AML1-ETO, BCR-ABL, CBF $\beta$ -MYH11 and PML-RAR $\alpha$ . Fourteen patients with initial diagnosis of: promyelocytic leukemia (n= 6), acute leukemia without lineage definition (n= 3) and chronic myeloid leukemia in myeloid blastic crisis or acute myeloid leukemia (AML) (n= 5) were studied. At the end of the molecular characterization all were diagnosed as AML. These results enlightened the role of the molecular studies in the classification of leukemia, which permit the patient receives the more appropriate treatment and achieve a better response.

**Keywords:** diagnostic; leukemia; molecular biology; AML1-ETO; BCR-ABL; CBF $\beta$ -MYH11; PML-RAR $\alpha$ .

## INTRODUCCIÓN

El sistema de clasificación de las enfermedades oncohematológicas se ha perfeccionado de manera progresiva junto a los avances tecnológicos. La primera propuesta de clasificación, elaborada en 1976 por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), se basó en las características citomorfológicas e histoquímicas del extendido celular sanguíneo.<sup>1</sup> Sin embargo, desde el inicio de su aplicación se reconoció que características citomorfológicas muy similares, no respondían de igual manera a los tratamientos y que por tanto era necesario profundizar y encontrar las causas de la respuesta desigual.

Los estudios de citogenética evidenciaron y correlacionaron la presencia de determinadas anomalías cromosómicas con tipos específicos de leucemias y linfomas. Esto conllevó a que en el

año 2002 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propusiera un nuevo sistema de clasificación que incorporaba la información citogenética.<sup>2</sup>



El desarrollo experimentado por la biología molecular en los últimos años, ha permitido profundizar en el fundamento molecular de múltiples enfermedades. Actualmente se conocen alteraciones moleculares que originan una determinada entidad. La oncohematología se ha beneficiado de estos conocimientos tanto para arribar a diagnósticos más precisos como para aplicar esquemas terapéuticos más certeros y, en más de un caso, estos conocimientos han permitido diseñar terapias dianas. Ejemplo de ello son: la leucemia mieloide crónica (LMC) y el tratamiento con inhibidores de la tirosinquinasa<sup>3</sup> y la leucemia promielocítica (LPM) con el uso del ácido transretinoico y el trióxido de arsénico.<sup>4</sup>

La LMC fue la primera entidad de la que se conocieron sus bases moleculares. La citogenética demostró la presencia de un cromosoma formado a causa de una traslocación entre los cromosomas 9 y 22, al que se nombró Filadelfia. La biología molecular permitió descubrir que por la unión de los dos cromosomas, que dan lugar al cromosoma híbrido, se forma el gen de fusión BCR-ABL y que este se traduce en una proteína quimérica del mismo nombre con actividad tirosina quinasa (TK, por su denominación en inglés) activada constitutivamente. Progresivamente, se han llegado a conocer los procesos celulares que se alteran en presencia de esta proteína y que producen proliferación celular descontrolada e inhibición de la apoptosis.<sup>3</sup> En cuanto a la LPM, también la citogenética encontró una anomalía cromosómica muy frecuente, la t(15;17). Posteriormente, la biología molecular permitió identificar que en la unión de los cromosomas 15 y 17 se forma el gen de fusión PML-RARα. Se supo que la expresión de este gen se traduce en una proteína quimérica del mismo nombre que afecta fundamentalmente la expresión de factores de transcripción con importante función en la diferenciación celular. Se han descrito otras alteraciones moleculares o citogenéticas que pueden estar presentes en la LPM, pero todas tienen en común la implicación del gen RARα.<sup>5</sup> Dicho gen codifica para una de las proteínas del complejo receptor del ácido retinoico (AR). Este receptor, en presencia de su ligando AR, activa la transcripción de muchos de los genes involucrados en la diferenciación.<sup>6</sup> Determinar la presencia de esta anomalía, mediante la citogenética o la biología molecular, permite el diagnóstico certero de la LPM y la rápida aplicación del tratamiento.

El avance en el conocimiento de las leucemias, también hizo posible correlacionar la existencia de ciertas alteraciones citogenéticas y moleculares con diferentes subtipos de leucemia mieloide aguda (LMA). De esta manera, la t(8;21) se observó frecuentemente asociada al subtipo M2 según la clasificación FAB. Mientras que la inversión del cromosoma 16[inv(16)] o t(16;16), se asoció frecuentemente con el subtipo M4. Sin embargo, no todas las LMA M2 portan dicha alteración y lo mismo sucede con la M4 y la inv(16) o t(16;16). Los estudios moleculares permitieron conocer las bases moleculares implicadas en estas dos anomalías citogenéticas. Hoy se sabe que en la unión de los cromosomas 8 y 21 se forma el gen de fusión AML1-ETO (conocido también como RUNX1-RUNX1T1) que da lugar a la proteína quimérica del mismo nombre y que afecta la función de un complejo proteico denominado factor de unión al núcleo (CBF por su denominación en inglés). Un fenómeno similar ocurre cuando está presente la inv(16) o t(16;16) que da lugar al gen de fusión CBFβ-MYH11, que genera la proteína quimérica del mismo nombre situada también en el CBF. Las proteínas quiméricas que pasan a formar parte

de este complejo alteran su funcionamiento de tal manera que frenan los procesos de diferenciación celular y apoptosis.<sup>7,8</sup>

Hasta los años 70 del pasado siglo, el diagnóstico de las leucemias se basaba únicamente en el examen histológico y citológico de la médula ósea.<sup>1</sup> No fue hasta los años 90 que se introdujeron paulatinamente las técnicas inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares, por lo que fue propicia una nueva clasificación de las neoplasias hematológicas.<sup>9-11</sup> En 1985, el grupo FAB emitió nuevas propuestas para la clasificación de las LMA.<sup>12</sup> En 2008, la OMS amplió el número de anomalías citogenéticas ligadas a la clasificación de las neoplasias hematológicas e incluyó anomalías moleculares recurrentes asociadas a subtipos específicos de LMA.<sup>13</sup> Entre estas alteraciones moleculares se encuentran los genes de fusión AML1-ETO y CBFb-MYH11 que se reconocen hoy como definitorios de subtipos de LMA, independientemente de las características citomorfológicas que se manifiesten.

Las recomendaciones de la OMS para la clasificación de las neoplasias hematológicas fueron actualizadas en el 2016.<sup>14</sup> En estas se incluyeron nuevos marcadores moleculares y citogenéticos, que propiciaron diagnósticos más certeros y un mejor manejo.

El estudio de biomarcadores en las leucemias se ha ampliado progresivamente en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI). El presente reporte, resalta la importancia del estudio molecular en la clasificación de las leucemias cuando las características citomorfológicas propician diagnósticos erróneos o difíciles de definir.

## MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por 14 pacientes con diferentes diagnósticos citomorfológicos. Seis de ellos habían sido clasificados como LPM, tres como LA de linaje celular no definido y cinco tenían un diagnóstico controversial entre LMA y LMC en CB. A partir de una muestra de sangre medular de cada paciente, se extrajo ácido ribonucleico (ARN), que fue sometido a reacción de reverso transcripción para obtener ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Con este material se amplificaron, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su denominación en inglés) y con los cebadores específicos para cada biomarcador, los genes de fusión AML1-ETO, BCR-ABL, CBFb-MYH11 y PML-RARa.<sup>15</sup> El análisis del producto de las PCR se realizó de manera cualitativa mediante electroforesis capilar.

## RESULTADOS

Mediante el estudio molecular se pudo precisar el diagnóstico de LMA en los 14 pacientes que mostraron imprecisión en el diagnóstico proporcionado por el estudio citomorfológico.

En la tabla se aprecia el diagnóstico inicial que recibieron los pacientes mediante el estudio citomorfológico. Los seis pacientes que habían sido diagnosticados como LPM fueron negativos al gen de fusión PML-RAR $\alpha$ . El estudio de las alteraciones de moleculares características de LMA no LPM permitió identificarlos como tal, ya que cuatro de ellos fueron positivos al gen de fusión AML1-ETO y dos al CBF $\beta$ -MYH11.

**Tabla.** Definición del diagnóstico como leucemia mieloide aguda no promielocítica mediante el estudio molecular

Alteración molecular de LMA	Diagnóstico inicial por citomorfolología		
	LPM (PML-RAR $\alpha$ neg) (n = 6)	LMA o LMC en CB (BCR-ABL neg) (n = 5)	LA (indefinida) (n = 3)
AML1-ETO	4	1	3
CBF $\beta$ -MYH11	2	–	–
Negativo para alteraciones de LMA	–	4	–

LMA: leucemia mieloide aguda, LPM: leucemia promielocítica, LMC: leucemia mieloide crónica, CB: crisis blástica, LA: leucemia aguda.

Los cinco pacientes con características citomorfológicas que hacían dudar entre una LMA *de novo* o una LMC en CB mieloide fueron definidos como LMA, al ser negativos al gen de fusión BCR-ABL; de ellos uno fue positivo al AML1-ETO.

Finalmente, los tres pacientes con diagnóstico citomorfológico de LA indefinida, culminaron con diagnóstico de LMA al ser positivos al gen de fusión AML1-ETO.

## DISCUSIÓN

Según la clasificación más actualizada de los síndromes mieloproliferativos, la mera presencia de determinadas alteraciones moleculares define el diagnóstico de muchas entidades hematológicas.<sup>14</sup> De esta manera, frente a una morfología que puede resultar dudosa, es posible discernir, con el estudio molecular, el tipo de leucemia que se presenta e incluso el subtipo cuando se trata de una LMA.

Entre los pacientes con diagnóstico inicial de LPM se estudió primeramente el gen de fusión PML-RAR $\alpha$ . Sin embargo, al ser negativa esta gen existía la posibilidad de que se tratara de LPM positiva a otra de las aberraciones descritas en esta entidad.<sup>5</sup> Ante la imposibilidad de estudiarlas y pensando en descartar otro subtipo de LMA, se completó el estudio con los genes de fusión AML1-ETO y CBF $\beta$ -MYH11. De esta manera, se pudo discernir que ninguno de estos pacientes era portador de LPM. Sino que en los seis se manifestó una LMA tipo CBF, las cuales

fueron definidas como subtipos particulares de LMA por lo OMS desde 2008 y, ratificadas como tal en 2016.<sup>14</sup>

Los cinco pacientes en los que se presentó la disyuntiva entre una LMC en CB mieloide o una LMA, fueron negativos al BCR-ABL. Al ser estudiados como LMA *de novo* se demostró la existencia del gen de fusión AML1-ETO en uno de los pacientes. Los otros cuatro fueron negativos a los genes de fusión estudiados para las LMA. Sin embargo, la certeza de un proceso mieloide agudo y la negatividad al BCR-ABL permitieron llegar a la conclusión diagnóstica de LMA.

Por último, tres pacientes presentaron LA con características citomorfológicas que no permitían definir si originan linfocítico o mieloide. Ante la disyuntiva, fueron estudiados los biomarcadores moleculares tanto de LLA como de LMA. Dado que los tres fueron positivos al AML1-ETO, se determinó que eran portadores de LMA y de esta forma recibieron el tratamiento correspondiente.

Estos ejemplos ilustran la importancia del estudio molecular como una de las herramientas que permiten alcanzar mayor precisión en el diagnóstico de las leucemias. Actualmente, los laboratorios de biología molecular son el área diagnóstica de mayor dinamismo y crecimiento dentro del laboratorio clínico; y han revolucionado el sistema de salud, liderando la investigación biomédica y optimizando los tratamientos médicos.<sup>16</sup>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. Br J Haematol. 1976 Aug;33(4):451-8.
- 2- Vardiman JW, Lee Harris N, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; 100:2292-302. doi:10.1182/blood-2002-04-1199
- 3- Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Jan;97:263-74. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.020.
- 4- Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 2013 Jul;369(2):111-21. doi: 10.1056/NEJMoa1300874
- 5- De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. Expert Rev Hematol. 2014;7(3):347-57.
- 6- Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2017;31:63-76.

- 7- Mosna F, Gottardi M. Stem cell modeling of core binding factor acute myeloid leukemia. *StemCellsInt*. 2016;2016:7625827.doi: 10.1155/2016/7625827
- 8- Duployez N, Willekens C, Marceau-Renaut A, Boudry-labis E. Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: current and emerging factors. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(1):43-56.
- 9- Terstrappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*. 1990;4:657-63.
- 10- Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18:115-36.
- 11- Thompson MA. Molecular genetics of acute leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 1791-807.
- 12- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985 Oct;103(4):620-5.
- 13- Swerdlow S, Campo E, Harris N, editors. *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissue*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- 14- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, BorowitzMJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127:2391-405.
- 15- 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. Report of BIOMED-1 Concerted Action. *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):1901-28.
- 16- Mauricio JF. Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico molecular. *Rev Med Clin Las Condes* 2015;26:788-93. Doi: 10.1016/j.rmclc.2015.11.007.

Recibido: 30 de noviembre de 2017.

Aprobado: 30 de agosto de 2018.

*DraC. Ana María Amor Vigil*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba.

Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu