

## GENETICA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO HEMATOLOGICO

Dra. Margarita Bragós

Cátedra de Hematología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.  
Suipacha 531 S2002LRK. Rosario. Universidad Nacional de Rosario. Argentina

### Resumen

El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico. El desarrollo de tecnologías rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el equipo clínico en directo beneficio del paciente. En la década del 80, el quizá mayor invento científico de la biología molecular, originó un punto de inflexión en el diagnóstico molecular. El Dr. Kary B. Mullis recibió el premio Nobel de química en 1993 por diseñar la reacción en cadena de la polimerasa.

### Summary

Molecular diagnosis is a dynamic area in constant development that has revolutionized clinical diagnosis. The development of fast and accurate technologies has made molecular diagnostics a key tool for the clinical team in direct patient benefit. In the 1980s, perhaps the greatest scientific invention of molecular biology, gave rise to a turning point in molecular diagnosis. Dr. Kary B. Mullis received the Nobel Prize in chemistry in 1993 for designing the polymerase chain reaction.

Palabras claves: Hematología, Biología Molecular

-El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico. (1)

-La detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud, especialmente en las áreas de las enfermedades infecciosas, el cáncer y las enfermedades genéticas.

-El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el equipo clínico en directo beneficio del paciente.

-Mediante técnicas de hibridación de *Southern blot*, utilizando fragmentos de ADN, fue posible detectar la presencia de una región de ADN que contenía una secuencia complementaria a la sonda en una muestra problema. (2)

-La utilización de enzimas de restricción, tijeras moleculares que cortan el ADN en regiones específicas, junto con el desarrollo de métodos de secuenciación simples, amplió el número de técnicas disponibles.

Una de las principales limitaciones de estas técnicas eran los días de arduo trabajo con personal de alto desarrollo técnico, lo que impedía su aplicación masiva en la práctica clínica. En la década del 80, el quizá mayor invento

científico de la biología molecular, originó un punto de inflexión en el diagnóstico molecular.

El Dr. Kary B. Mullis recibió el premio Nobel de química en 1993 por diseñar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la amplificación de una región específica de ADN utilizando *primers* o secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación. A partir de una copia de la región a amplificar se obtienen millones de copias, lo que permite su detección y de esta forma se evidencia la presencia de la región de ADN en una muestra determinada. Dada la naturaleza de la técnica, la alta especificidad de la PCR viene dada por la hibridación de los *primers* complementarios a la secuencia blanco y su elevada sensibilidad a la baja cantidad de ADN que requiere para iniciar la amplificación. (3)

### **Campos de actuación**

#### **Patologías adquiridas**

Diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedad residual mínima (ERM) en leucemias agudas y crónicas, Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas y Síndromes Linfoproliferativos Crónicos.

#### **Patologías hereditarias**

Hemocromatosis

Hemoglobinopatías

Trombofilias

El diagnóstico hematológico se ha transformado en un gran desafío, principalmente por el número de alteraciones genéticas descritas, la búsqueda de herramientas que permitan predecir la evolución de la neoplasia y la elección del tratamiento farmacológico adecuado.

En nuestro laboratorio, mediante técnicas de diagnóstico molecular detectamos la fusión BCR-ABL que indica la presencia del cromosoma Filadelfia en Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Además, mediante técnicas de PCR cuantitativa monitoreamos la enfermedad cuantificando los transcritos de fusión BCR-ABL normalizados con la expresión del gen ABL. (4)

En leucemia linfoblástica aguda, aplicando los protocolos publicados en Leukemia (1999), en muestras de RNA de sangre periférica o médula ósea, determinamos los siguientes rearrreglos: BCR/ABL t(9;22) p190; BCR/ABL t(9;22) p210; MLL/AF4 t(4;11); TEL/AML1 t(12;21); E2A/PBX1 t(1;19) y SIL/TAL microdelección 1p32. (5)

En leucemia mieloblástica aguda, también siguiendo las indicaciones de BIOMED I (5), en muestras de RNA de sangre periférica o médula ósea (MO), determinamos los siguientes rearrreglos: AML1/ETO t(8;21); CBFB/MYH11 Inv(16); BCR/ABL t(9;22); DEK/CAN t(6;9); FLT3-ITD (6) y NPM1 (7). Para el diagnóstico, sólo realizamos un *round* de PCR, mientras que para el

seguimiento de ERM realizamos PCR *nested*. La determinación de FLT3 no está recomendada para monitorear ERM.

En leucemia promielocítica aguda, además de la detección del rearrreglo PML/RARa t(15;17) (5), realizamos inmunocitoquímica en extendido de sangre periférica (si tiene expresión) o MO, según la técnica publicada por Falini y col. que permite un diagnóstico rápido y certero de M3. (8). Esta técnica sólo se aplica al diagnóstico.

En aquellos pacientes con diagnóstico de LMC que debutan en fase acelerada o crisis blástica, en los resistentes al tratamiento o en los que han perdido la respuesta molecular mayor, realizamos mediante la técnica sugerida por Susan Branford el estudio de mutaciones en el gen ABL involucrado en el rearrreglo BCR/ABL. (9). También buscamos la mutación T315I mediante ASO-PCR.

En síndromes mieloproliferativos crónicos cromosoma Philadelphia negativos buscamos en ADN, las mutaciones Jak2 V617F, Jak2 exón 12 (en médula ósea), MPL W515L/W515K y Calreticulina (CALR). Para la detección de Jak2 realizamos una adaptación del método publicado por Jones et al. (10); para MPL, un diseño de la Dra. Arianna Pratti, docente de nuestra Cátedra (11) y para CALR la publicación de N Engl J Med. (12)

En Hemocromatosis Hereditaria sabemos que el análisis del DNA contribuye significativamente a su diagnóstico. La prueba de ADN permite la detección inequívoca tanto de personas portadoras de una copia de la mutación, con riesgo de tener hijos con la enfermedad, como de personas con dos copias de la mutación que ya presenta la enfermedad o que la desarrollarán con una alta probabilidad en el futuro. Los porcentajes de las mutaciones hallados en nuestro medio difieren de los publicados en países del norte de Europa donde la mutación C282Y es la mayor causa de HH, teniendo presumiblemente un origen celta. La mutación H63D tiene una distribución mundial más amplia. Nuestras frecuencias concuerdan más con las publicadas por países del Mediterráneo (sobre todo Italia), donde la mutación C282Y no es tan común como la H63D. El diagnóstico lo llevamos a cabo mediante técnicas de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). (13)

En cuanto a la aplicación de las técnicas de biología molecular al diagnóstico de anemias, procedemos con una investigación en tres pasos:

1-Índices hematimétricos completos,

2-Tests hematológicos especiales seguidos de,

3-Análisis mutacional del DNA.

Para el análisis mutacional, en el caso de sospecha de alfa talasemia (generalmente anemia microcítica hipocrómica, electroforesis de Hbs normal y estudio de Fe normal) utilizamos las técnicas de GAP-PCR y PCR seguida de corte con enzimas de restricción (RFLP). (14-15)

Para el diagnóstico molecular de beta talasemias (sólo después de haber realizado la electrophoresis de Hbs) utilizamos la técnica PCR-ARMS. (16). De no hallar la mutación responsable con esta técnica, procedemos a la secuenciación del gen beta.

La talasemia delta/beta siciliana la detectamos mediante la técnica publicada en Blood. (17)

#### Bibliografía:

1- Mauricio Farfán. Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. Revista Médica Clínica Las Condes 2015; 6:788-793.

2- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98:503-517.

3- G.J. Tsongalis, L.M. Silverman. Molecular diagnostics: a historical perspective. Clin Chim Acta 2006; 2:188-192.

4- S Branford, NCP Cross, A Hochhaus, J Radich, G Saglio, J Kaeda, J Goldman and T Hughes. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia (2006) 20, 1925–1930.

5- JJM van Dongen, EA Macintyre, JA Gabert 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, 1901–1928.

6- Noguera NI, Breccia M, Divona M et al. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. Leukemia. 2002 Nov;16(11):2185-9.

7- Karina Lucrecia Calvo, Mara Jorgelina Ojeda, Emanuele Ammatuna et al. Detection of the nucleophosmin gene mutations in acute myelogenous leukemia through RT-PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. Eur J Haematol. 2009;82:69-72.

8- Brunangelo Falini, Leonardo Flenghi, Marta Fagioli et al. Immunocytochemical Diagnosis of Acute Promyelocytic Leukemia (M3) With the Monoclonal Antibody PG-M3 (Anti-PML) Blood 1997 90:4046-4053.

9- Susan Branford, Zbigniew Rudzki, Sonya Walsh et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. Blood 2002 99:3472-3475.

10- Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2162-8.

11-Mara Jorgelina Ojeda, Irma Margarita Bragós, Karina Lucrecia Calvo, Gladis Marcela Williams, María Magdalena Carbonell & Arianna Flavia Pratti. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology* <http://dx.doi.org/10.1080/10245332.2017.1385891>

12-Thorsten Klampfl, Heinz Gisslinger, Ashot S. Harutyunyan. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369:2379-90.

13- T.M. Oliveira; F.P. Souza; A.C.G. Jardim et al. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2006) 39: 1575-1580.

14- Smetanina NS, Huisman TH. Detection of alpha-thalassemia-2 (-3.7 kb) and its corresponding triplication (alpha)(alpha)(alpha) (anti-3.7 kb) by PCR: an improved technical change. *Am J Hematol.* 1996; 53(3):202-3.

15- S. Ayala, D. Colomer, M. Aymerich et al. Nondeletional  $\alpha$ -thalassemia: First description of  $\alpha$ Hph $\alpha$  and  $\alpha$ Nco $\alpha$  mutations in a Spanish population. *American Journal of Hematology* 1996; 52:144-149.

16- Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia: Studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *The Lancet.* 1990; 336:834-37.

17- J.E. Craig, R.A. Barnetson, J. Prioret al. Rapid Detection of Deletions Causing  $\delta\beta$  Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by Enzymatic Amplification. *Blood.* 1994; 6:1673-1682.