

Cinco décadas de la biología molecular y la citogenética aplicadas a la hematología cubana

Five decades of molecular biology and cytogenetic applied to cuban hematology

Heidys Garrote Santana, Kalia Lavaut-Sánchez, Ana María Amor Vigil, Carmen Díaz Alonso, Lesbia Fernández Martínez, Vera Ruiz Moleón, Norbelys Hernández Aguilar, René A. Rivero Jiménez

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La biología molecular (BM) es una ciencia que ha revolucionado el desarrollo científico en los últimos años. En el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) también ha evolucionado progresivamente conforme al avance tecnológico y adecuándose cada vez más al contexto científico internacional. Su historia se remonta al año 1966, con la creación del IHI y posteriormente del laboratorio de BM. En el año 2012, el departamento de BM y el laboratorio de citogenética, pasaron a formar parte de lo que hoy es el Centro de Tecnologías de Avanzada, un área con tecnología de punta que ha permitido actualizar la mayoría de las técnicas moleculares que se empleaban previamente, lo que garantiza mayor rapidez y confiabilidad de los resultados. Se introdujeron y perfeccionaron técnicas como la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos, la electroforesis capilar y el FISH (del inglés: *Fluorescence In Situ Hybridization*) y se adquirieron modernas máquinas termocicladoras para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), materiales y reactivos. Con este esfuerzo mancomunado en estos 50 años, se han podido beneficiar hasta la fecha: 5 460 pacientes, estudiados en el laboratorio de BM, donde se determinan actualmente 10 marcadores moleculares, 12 estudios de FISH; además del cariotipo convencional y los estudios de quimerismo. Se ha alcanzado una media anual de 317 pacientes estudiados, en los últimos 5 años. Se cuenta con profesionales de alta calificación, lo que ha posibilitado liderar y colaborar en proyectos de investigación nacionales e internacionales, publicar innumerables artículos científicos, obtener premios relevantes y formar a los residentes de la especialidad de Hematología. Las perspectivas comprenden la incorporación de la PCR en tiempo real y la secuenciación

para completar un nivel de diagnóstico a la altura de cualquier prestigioso centro internacional y así poder ofrecer un servicio de calidad a los pacientes.

Palabras clave: biología molecular; técnicas moleculares; diagnóstico.

ABSTRACT

Molecular biology (MB) is a science that has revolutionized scientific development in recent years. It has also increasing progressively at the Institute of Hematology and Immunology (IHI) as adapting to technological advances and international scientific context. Its history dates back to 1966, with the IHI creation and subsequently the MB laboratory. Since then they have been many achievements in the field of diagnosis and research in Hematology. In 2012, the MB department with the cytogenetic laboratory was part of the Center for Advanced Technologies; an area with modern technology that has allowed change old studies by updated molecular techniques, ensuring greater speed and reliability of results. Techniques such as extraction and quantification of nucleic acids (NA), capillary electrophoresis and the FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) were introduced, and modern thermocyclers for polymerase chain reaction (PCR), materials and reagents were acquired too. In these 50 years, 5 460 patients have been benefited to date. We study about 10 molecular markers, 12 FISH study, in addition to conventional karyotyping and chimerism studies in the MB lab at this moment. It has gone an annual average of 317 patients in the last 5 years. We have highly qualified professionals, which has made possible to lead and collaborate on national and international research, publishing numerous scientific articles, obtain relevant prizes of science and technology forum and directly contribute to the residents' formation in Hematology. Our future perspectives include the new technologies incorporation such as real-time PCR and sequencing, to complete a similar diagnostic level to any prestigious international center so we can provide quality service to our patients.

Keywords: molecular biology, molecular techniques, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La biología molecular (BM) es una ciencia que ha revolucionado el desarrollo científico en los últimos años. En el campo de la medicina y en particular de la Hematología, se constata su amplia aplicación al ser una poderosa herramienta de diagnóstico, pronóstico y seguimiento para los pacientes. El desarrollo de la BM en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) también ha evolucionado progresivamente conforme al avance tecnológico y adecuándose cada vez más al contexto científico internacional.

Su historia se remonta al año 1966, con la creación del IHI. Tres años después se creó el departamento de Bioquímica dedicado fundamentalmente al estudio de las hemoglobinopatías y con la intención de explorar dicha entidad profundamente, incluyendo sus bases moleculares; pero no es hasta 1982, que se introdujeron las

técnicas de biología molecular lo que proporcionó un nuevo perfil de diagnóstico e investigación en el centro¹.

ALGO DE HISTORIA

La primera aplicación clínica realizada en el país de dicha tecnología fue el diagnóstico prenatal de la drepanocitosis (popularmente llamada en Cuba: sickleemia). También se incursionó en el campo de la hemofilia, las talasemias, la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal y la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, con notables logros en la práctica médica y con múltiples reconocimientos a los aportes científicos realizados¹.

En 1985, se comenzó el estudio molecular de las hemopatías malignas, que incluyó el estudio del reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de las células T, profundizando en el conocimiento de los síndromes linfoproliferativos. Con posterioridad se fueron incorporando nuevas determinaciones como los genes de fusión BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica (LMC) y el PML-RAR α en la leucemia promielocítica aguda (LPA)¹.

A finales del 2010, el laboratorio de BM pasó a formar parte del departamento de Biología Celular y Molecular junto con las áreas de: Citogenética, Hemoglobinas y Enzimas. Para esa fecha se incrementaron los marcadores moleculares dedicados al estudio de las leucemias agudas y se introdujo el quimerismo para evaluar el éxito de los trasplantes de médula. Por otra parte, el laboratorio de citogenética mediante el estudio del cariotipo de bandas G y el estudio cromosómico con agentes clastogénicos, aportaba información genética valiosa para el diagnóstico de algunas enfermedades hematológicas².

En el año 2012, con la incorporación de nuevas tecnologías al IHI, el departamento de BM junto con el laboratorio de citogenética, formaron parte de lo que hoy es el Centro de Tecnologías de Avanzada. Un área con tecnología de punta que ha permitido actualizar la mayoría de las técnicas moleculares que se empleaban en el departamento, garantizando así un mayor grado de rapidez y confiabilidad de los resultados.

LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS

La metodología para la extracción de ácidos nucleicos (AN) se perfeccionó. Históricamente el método más empleado en el laboratorio era la extracción con la mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (modificado), con el que se obtiene un buen rendimiento, pero el procedimiento es engorroso y requiere de muchas horas de manipulación lo que retarda las exploraciones subsiguientes que dependen del material extraído³⁻⁵.

La introducción de nuevas tecnologías, permitió modernizar este procedimiento y se estandarizaron los métodos de extracción por columnas y de manera automatizada. Ya sea de manera manual, mediante estuches de diagnósticos habilitados al respecto o totalmente automatizado, una vez que se toma la muestra al paciente, con el innovador QIAcube (Quiagen, Alemania) de tecnología avanzada⁶.

Otro de los procedimientos que se introdujeron fue la cuantificación de AN mediante espectrofotómetro de volumen múltiple, lo que ha hecho posible determinar con exactitud la concentración y pureza de los AN extraídos, permitiendo una mejor planificación de los volúmenes a utilizar, mayor uniformidad en el trabajo y empleo racional de las muestras biológicas⁷.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), indispensable en la actividad diaria, también se pudo optimizar al incorporar nuevas máquinas termocicladoras y un equipo de electroforesis capilar destinado a la interpretación de los productos de la PCR. Esto contribuye a mayor precisión y exactitud de los resultados y la posibilidad de analizar un número superior de muestras al mismo tiempo⁸.

Por otra parte, la introducción en el 2014, de la técnica FISH (del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*), ofrece numerosas ventajas en oncohematología. A diferencia de la citogenética convencional, no precisa de células tumorales en división, por lo que es de gran ayuda en neoplasias con bajo índice mitótico, presenta una alta sensibilidad y especificidad, análisis de un gran número de células y rapidez en el resultado⁹⁻¹⁰.

Todas estas modificaciones tecnológicas han permitido dar una continuidad al trabajo que se viene realizando desde hace 50 años en el centro y dar un salto vertiginoso en los últimos 5 años, con la introducción de nuevos conocimientos y metodologías moleculares de diagnóstico empleados a nivel mundial.

Con la introducción de dicha tecnología, el IHI constituye la referencia nacional para este tipo de investigaciones dando cobertura a todos los centros del país donde se traten pacientes hematológicos. Gracias al desarrollo tecnológico de los materiales de consumo y reactivos que se emplean, también se ha garantizado el traslado de las muestras de regiones distantes de la capital y que lleguen en óptimas condiciones para ser procesadas y ofrecer un resultado de calidad.

Con este esfuerzo mancomunado por muchos profesionales y técnicos, se han podido beneficiar hasta la fecha: 5 460 pacientes, muchos de ellos a los que ha sido necesario realizar múltiples determinaciones y seguirlos durante toda la evolución de la enfermedad. En estos momentos en el laboratorio se determinan 10 marcadores moleculares, 12 estudios de FISH, además del cariotipo convencional y los estudios de quimerismo (tabla).

La media de pacientes estudiados anualmente en el laboratorio era de 97 casos. Sin embargo, en los últimos 5 años la media anual se ha incrementado a 317 pacientes. La mayoría de ellos requiriendo varias determinaciones moleculares en el transcurso de su enfermedad. Esto conlleva a un diagnóstico más preciso de las enfermedades hematológicas que se estudian en el centro y facilita una mejor clasificación del riesgo, con la consecuente selección de los esquemas de tratamiento y estadía hospitalaria requeridos en cada caso, lo que repercute de manera positiva desde el punto de vista social en este grupo vulnerable de pacientes.

Tabla. Estudios que se realizan actualmente en el Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología

Alteraciones citogenéticas (FISH)	Alteraciones moleculares estudiadas por PCR	Hemopatías
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1	LMA
inv(16)(p13.1q22) t(16;16)(p13.1;q22)	CBFβ-MYH11	LMA
t(15;17)(q22;q 21)	PML-RARα	LPA
-	NPM1mutA	LMA
-	FLT3-ITD	LMA
t(v;11)(v;q23)	-	LMA, LLA, SMD
-5 / del(5q)	-	LMA, SMD
-7	-	LMA, SMD
t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1	LLA
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	LLA, LMC, otros SMPC
t(1;19)(q23;p13)	TCF3-PBX1	LLA
Alteraciones del (8q)	-	MM
-	MLL-AF4	LLA
-	JAK2V617F	PV, otros SMPC
Alteraciones del (13q)	-	LLC, MM
Alteraciones del (17p)	-	LLC, MM
Cariotipo banda G	-	LLA, LMA, SMPC, SMD, SLPC
-	Quimerismo	Trasplante de médula

LMA. Leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfocítica aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda; SMD: síndromes mielodisplásicos; LMC: leucemia mieloide crónica; SMPC: síndromes mieloproliferativos crónicos; LLC: leucemia linfocítica crónica; MM: mieloma múltiple.

El desarrollo tecnológico también ha permitido facilitar los procedimientos y el trabajo de meseta para el personal del laboratorio, se ha reducido la exposición a sustancias nocivas para la salud y ha exigido un alto grado de preparación y superación por parte de todo el colectivo.

CONSIDERACIONES FINALES

En estos momentos se cuenta con profesionales de alta calificación, lo que ha hecho posible liderar y colaborar en múltiples proyectos de investigación en estos últimos años no solo institucionales sino también con prestigiosos centros nacionales y

foráneos como el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), el *MD Anderson Cancer Center* de Madrid y el Banco de Sangre y Tejido de Barcelona.

Se han publicado innumerables artículos en revistas nacionales e internacionales, se cuenta con tres premios relevantes en fórum de ciencia y técnica en los últimos años y se participa de manera directa a la formación de los residentes de la especialidad de Hematología.

Una vez cumplido el propósito de modernizar y elevar la calidad tecnológica del laboratorio de BM, el próximo paso es incorporar nuevas tecnologías que permitan completar la total cobertura de estudios moleculares necesarios en las leucemias agudas, los síndromes mielodisplásicos y los mieloproliferativos crónicos; así como introducir el diagnóstico molecular y el FISH en los síndromes linfoproliferativos crónicos.

La PCR en tiempo real y la secuenciación, permitirán ampliar el diagnóstico que se ofrece estos momentos y mejorar el seguimiento de los pacientes con el estudio de la enfermedad mínima residual¹¹⁻¹².

Además de la necesidad de completar el diagnóstico molecular en la parte oncohematológica, el laboratorio tiene como perspectiva futura ampliar esta herramienta de diagnóstico a otros trastornos hematológicos como los desórdenes de la coagulación, anemias de difícil diagnóstico, las inmunodeficiencias primarias y perfeccionar los métodos moleculares para evaluar la efectividad de los trasplantes medulares.

Las recientes actualizaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el campo de las neoplasias mieloides y linfoides, no dejan dudas que la biología molecular lidera en estos momentos el diagnóstico y manejo de muchas entidades hematológicas¹³⁻¹⁴. Entonces es necesario alcanzar un nivel de diagnóstico, que permita estar a la altura de cualquier prestigioso centro internacional y así poder ofrecer un servicio de calidad a los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Queremos que en este breve recuento de lo que ha sido la biología molecular en el centro, se vean representadas todas las personas nacionales e internacionales, instituciones, organizaciones y demás, que de una forma u otra han contribuido con el desarrollo de esta rama de la ciencia a lo largo de estos años. Nuestro agradecimiento a todos lo que han forjado los cimientos que han dado la solidez necesaria para que el laboratorio pueda seguir creciendo y afrontar con alto nivel científico y tecnológico nuevos retos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Antuña G, Hernández-Hernández A, Corral Abascal L, Muñiz Fernández A, Hernández Martínez A. Biología molecular en hemoglobinopatías y hemopatías malignas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 1996; 12(2):81-5
2. Amor-Vigil AM, Martínez-Antuña G, Lavaut-Sánchez K, Pérez-Diez de los Ríos G, Hernández-Martínez A, Estrada-del Cueto M. Resultados relevantes en biología molecular, enzimopatías y citogenética en el período 1996-2010. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2011 Mar [citado 2016 Ago 01]; 27(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000100004&lng=es
3. van Dongen JJ, 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 the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999 Dec; 13(12):1901-28.
4. Amaru R, Peñaloza R, Miguez H, Torres G, Cuevas H. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Rev. Cuadernos.* 2008; 53(1):38-43.
5. Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, Ekstrom K. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol.* 2012 Apr; 50(4):278-86.
6. Díaz-Alonso C, Garrote-Santana H, Amor-Vigil AM, Suárez-González Y, Fernández-Martínez L, Ruiz-Moleón V. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [revista en Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 24]; 31(4): Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/349>
7. Diaz Alonso C, Garrote Santana H, Amor Vigil AM, Suárez González Y, González-Mugica Romero R. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica en el IHI.. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot* [revista en Internet]. 2013 [citado 2016 Ago 1]; 29(3): Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/81>
8. Kostal V, Katzenmeyer J, Arriaga J. Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Chem.* 2008; 80: 4533-50.
9. Campbell LJ, Oei P, Brookwell R, Shortt J, Eddy N, Ng A et al. FISH Detection of PML-RARA Fusion in ins(15;17) Acute Promyelocytic Leukaemia Depends on Probe Size. *Biomed Res Int.* 2013 Mar; 2013:1-4 doi: 10.1155/2013/164501
10. Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res.* 2014 Feb 5; 2(1):3.
11. Venditti A, Del Principe M I, Maurillo L, Buccisano F, Amadori S. Minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia: does flow cytometry score a point over molecular biology? *Transl Pediatr.* 2013 Jan; 2(1):43-45.

12. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct; 11(10):685-96.

13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M J, Le Beau M et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May; 127 (20): 2391-405.

14. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016 May; 127 (20): 2375-90.

Recibido: agosto 11, 2016.

Aceptado: octubre 21, 2016.

Dra. Heidys Garrote Santana . Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Email: rhematologia@infomed.sld.cu