

Duplicación interna en tándem del gen de la tirosina quinasa 3

Internal tandem duplication of the tyrosine kinase 3 gene

Heidys Garrote Santana^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-8449-1278>

Ana María Amor Vigil¹ <http://orcid.org/0000-0001-9182-2664>

Lesbia Fernández Martínez¹ <http://orcid.org/0000-0002-8359-3061>

Carmen Alina Díaz Alonso¹ <http://orcid.org/0000-0001-6544-0662>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: hgarrote@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La reacción en cadena de la polimerasa requiere de varios procedimientos y controles para garantizar la eficacia del estudio. Se debe realizar un control de calidad a la reverso transcripción con el fin de determinar la efectividad del proceso y pasar a la siguiente etapa. Se comprueba con la amplificación de un gen normal, que se interpreta mediante electroforesis. Por dificultades en la importación de reactivos, se propuso sustituir este paso por la identificación del gen de la tirosina quinasa 3, que en la leucemia mieloide aguda puede afectarse por una mutación del tipo duplicación interna en tándem.

Objetivo: Evaluar si el biomarcador duplicación interna en tándem del gen de la tirosina quinasa 3 es útil como control del proceso de reverso transcripción dentro de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para los estudios moleculares.

Métodos: Se analizaron 235 muestras de aspirado medular de pacientes hematológicos, en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología entre junio de 2017 y junio de 2019.

Resultados: El 85,53 % presentó solo una banda en la electroforesis capilar, correspondiente al alelo salvaje, y en el resto se observaron la banda normal y la correspondiente al alelo mutado. De esta forma, se comprobó la presencia de ADN complementario en todas las muestras.

Conclusiones: La sustitución del control basado en un gen normal, por el biomarcador duplicación interna en tándem del gen de la tirosina quinasa 3 dentro de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se realiza como parte del protocolo de laboratorio para el estudio de pacientes con enfermedades oncohematológicas.

Palabras clave: PCR; FLT3; biomarcador.

ABSTRACT

Introduction: The polymerase chain reaction requires several procedures and controls to ensure the quality of the study. Quality control must be performed on the reverse transcript in order to determine the effectiveness of the process and move to the next step. It is checked with the amplification of a normal gene, which is interpreted by electrophoresis. Due to difficulties in importing reagents, it was proposed to replace this step with the identification of the tyrosine kinase 3 gene, which in acute myeloid leukemia can be affected by an internal tandem duplication type mutation.

Objective: To evaluate whether the biomarker internal tandem duplication of the tyrosine kinase 3 gene is useful as a control of the reverse transcription process within the polymerase chain reaction technique for molecular studies.

Methods: 235 bone marrow aspirate samples from hematological patients were analyzed in the molecular biology laboratory of the Institute of Hematology and Immunology between June 2017 and June 2019.

Results: 85.53 % presented only one band in capillary electrophoresis, corresponding to the wild-type allele, and in the rest, the normal band and the band corresponding to the mutated allele were observed. Thus, the presence of cDNA was verified in all samples.

Conclusions: The substitution of the control based on a normal gene, by the biomarker internal tandem duplication of the tyrosine kinase 3 gene, within the polymerase chain reaction technique, is possible and, moreover, useful as part of the laboratory protocol for the study of patients with oncohematological diseases.

Keywords: PCR; FLT3; biomarker.

Recibido: 09/04/2021

Aceptado: 20/05/2021

Introducción

Dentro de los métodos de diagnóstico en hematología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una poderosa herramienta para el diagnóstico inicial y el seguimiento de los pacientes.^(1,2,3,4) La estratificación de los enfermos en diferentes grupos de riesgo y el estudio de la enfermedad mínima residual para supervisar la respuesta al tratamiento resultan posibles gracias a la sensibilidad de esta técnica.^(4,5,6,7,8)

Para el estudio de biomarcadores oncohematológicos específicos, como las traslocaciones, se extrae de la muestra biológica el ácido desoxirribonucleico (ARN), el cual se convierte mediante la PCR con reverso transcripción (RT-PCR) a ADN complementario (ADNc) y se utiliza en la PCR convencional para amplificar el transcrito de fusión. Se deben realizar varios procedimientos y controles para garantizar la eficacia del estudio. Un paso crítico resulta la reverso transcripción. El ARN se degrada con facilidad durante la manipulación por ser un material muy sensible; en consecuencia, cuando finaliza el proceso de reverso transcripción se debe controlar la calidad para identificar la efectividad del proceso y verificar si se generó el ADNc, requerido para el siguiente paso.⁽⁹⁾

Tradicionalmente se comprueba mediante la PCR de un gen normal, que se interpreta mediante la electroforesis en gel de agarosa o capilar. El receptor de ácido retinoico (RAR) constituye uno de los genes más utilizados como referencia dentro del estudio molecular. Este gen codifica para un tipo de receptor nuclear que se activa por las formas *trans* y la forma 9-*cis* del ácido retinoico.⁽¹⁰⁾

Por dificultades en la importación de reactivos se propuso sustituir este paso por la identificación de un biomarcador de la leucemia mieloide aguda. El gen FLT3 codifica para una proteína de igual nombre, presente en células precursoras; pero en la leucemia mieloide aguda se afecta por una duplicación interna en *tándem* (FLT3-ITD). Esto implica un mal pronóstico al paciente.^(11,12)

En condiciones normales la amplificación por PCR del biomarcador FLT3-ITD revela una banda simple en la electroforesis; sin embargo, cuando se duplica de manera patológica se constatan dos bandas: una correspondiente al alelo mutado y otra al alelo sano. Basados en esa dualidad del biomarcador, se decidió sustituir el paso de control de la reverso transcripción con la amplificación del RAR normal por la del biomarcador FLT3-ITD.^(11,12) El objetivo del presente artículo fue evaluar la utilidad del biomarcador FLT3-ITD como control del proceso de reverso transcripción dentro de la técnica de PCR para los estudios moleculares.

Métodos

Se evaluaron 235 muestras de pacientes con enfermedades oncohematológicas en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología desde junio de 2017 hasta mayo de 2019. Se extrajeron entre 2 y 7 ml de aspirado de médula ósea en un frasco nuevo, estéril, con ácido etilendiamino tetraacético como anticoagulante.

Se obtuvo y se purificó el ARN con los *KITs* de extracción. La cuantificación se hizo en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Se utilizaron 2 μ L de muestra de ARN en la plataforma Take3. Los datos se procesaron con el *software* Gen5TM. Se leyó la densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente, según las recomendaciones de los fabricantes.

Confirmada la funcionalidad del ARN extraído, se procedió a la técnica de RT-PCR para la obtención del ADNc.⁽⁹⁾ Para comprobar el éxito del proceso anterior y optimizar los recursos del laboratorio, se sustituyó la amplificación del gen RAR normal por la FLT3-ITD⁽¹³⁾ y se procedió a la interpretación mediante la electroforesis capilar de acuerdo con el sistema *QIAxcel® Advanced*.⁽¹⁴⁾

Los datos para la investigación se obtuvieron del libro registro y la libreta de trabajo del laboratorio. La información se recogió y almacenó en una base de datos computarizada. Este estudio pertenece al proyecto “Comportamiento de biomarcadores oncohematológicos en pacientes cubanos”, aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la investigación del Instituto de Hematología e Inmunología.

Resultados

Presentaron solo una banda en la electroforesis capilar 201 muestras (85,53 %), correspondiente al alelo salvaje, y 34 (14,47 %) mostraron la banda normal y la del alelo mutado. Se comprobó la existencia de ADNc y el éxito de la reverso transcripción. A partir de este paso se completaron las PCR con los cebadores diseñados para los biomarcadores específicos, de acuerdo con el protocolo internacional BIOMED-1 y el diagnóstico inicial de cada paciente. Se validó y se protocolizó el empleo de la FLT3-ITD para el control de la reverso transcripción, como parte de los métodos del laboratorio de biología molecular del centro en el diagnóstico de pacientes oncohematológicos del país.

Conclusiones

Se puede sustituir el control basado en el gen RAR normal por el biomarcador FLT3-ITD dentro de la técnica de PCR. Además, resulta útil como parte del protocolo de laboratorio para el estudio de pacientes con patologías oncohematológicas.

Referencias bibliográficas

1. Koutsi A, Vervesou EC. Diagnostic molecular techniques in haematology: recent advances. *Ann Transl Med.* 2018;6(12):1-9. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.30>
2. Garrote H, Díaz C. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del “Nobel” a la actualidad. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter.* 2019 [acceso 20/02/2020];35(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892019000400009
3. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424-47. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>

4. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299-312. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>
5. Azad NA, Shah ZA, Pandith AA, Rasool R, Jeelani S. Real-time quantitative PCR: a reliable molecular diagnostic and follow-up tool for 'minimal residual disease' assessment in chronic myeloid leukemia. *Biosci Rep*. 2018;38(5):BSR20180974. DOI: <https://doi.org/10.1042/bsr20180974>
6. Hrabovsky S, Folber F, Horacek JM, Stehlikova O, Jelinkova H, Salek C, *et al*. Comparison of real-time quantitative polymerase chain reaction and eight-color flow cytometry in assessment of minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(11):743-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.06.030>
7. Hsu CC, Huang CE, Wu YY, Chen YY, Lung J, Leu YW, *et al*. Quantitative competitive allele-specific TaqMan duplex PCR (qCAST-Duplex PCR) assay: a refined method for highly sensitive and specific detection of JAK2V617F mutant allele burdens. *Haematol*. 2018;103(10):e450-4. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.187989>
8. Garrote H, Lavaut K, Amor AM, Díaz CA, Fernández L, Ruiz V, *et al*. Cinco décadas de la biología molecular y la citogenética aplicadas a la hematología cubana. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2017 [acceso 20/02/2020];33(1):1-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892017000100004
9. 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;13(12):1901-28. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2401592>
10. Belyaeva OV, Adams MK, Popov KM, Kedishvili NY. Generation of retinaldehyde for retinoic acid biosynthesis. *Biomolec*. 2020;10(5):1-17. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fbiom10010005>
11. Sánchez D, Gargallo P, Romano V, Montero V, Cabrerizo R. Determinación de la mutación FLT3-ITD por dos métodos en pacientes con leucemia mieloide aguda: comparación e implementación de un nuevo método. *Rev Hematol*. 2018 [acceso 20/02/2020];22(2):134-43. Disponible en: <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/17>

12. Nakao M, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-8.

13. Ruiz V, Garrote H, Díaz CA, Fernández L, Amor AM. Electroforesis capilar: nueva técnica en el Instituto de Hematología e Inmunología para el análisis de marcadores oncohematológicos. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter*. 2017 [acceso 20/02/2020];33(3). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/538>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.