

Detección molecular del gen *BCR-ABL* por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia

Gerardo Jiménez-Arce¹, Juan Carrillo², Mario Chaves¹, Rafael Jiménez^{1,3}, Mario Vargas⁴, Liliana Campos¹, Ana de la Guardia¹ & Berta Valverde³

1. Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica.
2. Servicio de Hematología, Hospital Nacional de Niños.
3. Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños.
4. Laboratorio de Hematología, Hospital Nacional de Niños. Correspondencia: gerardo.jimenez@ucr.ac.cr

Recibido 24-X-2007. Corregido 30-VI-2008. Aceptado 31-VII-2008.

Abstract: Molecular detection of the *BCR-ABL* gen by RT-PCR In Costa Rican children with leukemia.

Many leukemias could have chromosomic translocations and according to the transcripts formed by the genes involved, the patients present an specific phenotype of the leukemia. We show the first results of the investigation of the gen *BCR-ABL* using RT-PCR, in order to look for the t(9;22)(q34;q11) in pediatric leukemic children. We studied in total 55 patients, 6 (10.9%) of them were positive for that translocation. Two (3.63%) of the positive children had ALL and the other 4 (7.27%) presented CML, the genotyping analysis of the transcript was studied in these children. With the introduction of this methodology as part of the routine studies, the leukemic children could get in the future an specific diagnosis, that will be important to classify them in prognostic categories and to improve the detection of minimal residual disease. Rev. Biol. Trop. 56 (4): 1613-1618. Epub 2008 December 12.

Key words: *BCR-ABL*, RT-PCR, LLA, Leukemia, genotype, Costa Rica.

El cromosoma Philadelphia (Ph+) fue la primera anomalía cromosómica asociada con una enfermedad maligna específica en humanos: la leucemia mielocítica crónica (LMC) (Nowell y Hungerford 1960). Cuando se presenta la t(9;22)(q34;q11) se produce una activación oncogénica, debido a la traslocación del oncogén ABL localizado en el cromosoma 9, con el oncogén BCR del cromosoma 22, formando un gen de fusión híbrido *BCR-ABL*, que codifica para una proteína que aumenta la actividad tirosina quinasa con potencial neoplásico. Más del 95% de los pacientes con LMC portadores de la traslocación t(9;22)(q34;q11), presentan el gen quimérico *BCR-ABL*. Este rearrreglo cromosómico *BCR-ABL*, también se puede encontrar en niños y adultos con leucemia linfocítica aguda (LLA) entre el 2-5% y 10-20% respectivamente, asociándose a mal pronóstico.

El mecanismo por el cual la fusión anormal de genes, tales como el *BCR-ABL* puede dar origen a diferentes leucemias, se atribuye a la función de estos genes en el desarrollo y función de las células de las líneas mieloides y linfoides, así como a la codificación de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, señales de traducción, genes receptores de inmunoglobulinas y genes receptores de las células T (Rabbitts 1994 ; Look 1997).

Según Pane *et al.* (1996) la localización precisa del punto de ruptura en el gen *BCR* y en el gen *ABL*, así como la composición de la proteína producto de la fusión *BCR-ABL* puede servir para determinar el fenotipo de la enfermedad y por tanto, para orientarse en la estrategia terapéutica a seguir.

En nuestro país, la mayoría de estudios moleculares realizados en leucemia, han sido

principalmente a nivel citogenético; entre los cuales se encuentran los elaborados por Castro *et al.* 1993, Solis *et al.* 2000 y Venegas *et al.* 2004. Sin embargo, la detección de la traslocación t(9;22)(q34;q11), por métodos citogenéticos convencionales no siempre es posible, lo que se atribuye generalmente a una muestra pobre de médula ósea, metafases insuficientes e inadecuadas y a una sobrepoblación de la actividad mitótica de las células no-leucémicas sobre las células leucémicas (Wu *et al.* 2003, Venegas y Rivera 2004).

En 1996, Campos, utilizó el método de Southern blot con el fin de diagnosticar el Cromosoma Filadelfia en Leucemia Mieloide Crónica. No obstante, ésta es una metodología rápida y segura para monitorear un alto número de pacientes afectados, el estudio sugiere la utilización del método de PCR por su mayor sensibilidad y menor duración.

Así, las técnicas moleculares de diagnóstico de esa traslocación específica se vuelven indispensables para su detección, lo cual permite un manejo clínico del paciente más racional (Westbrook *et al.* 1992).

La técnica molecular de la transcriptasa reversa (RT-PCR) es considerada como exacta por el hecho de hacer uso de la tecnología del ADN, que permite caracterizar los transcritos formados por las traslocaciones desencadenantes de las leucemias, como son los puntos de ruptura en las regiones de los genes *BCR* y *ABL*, las cuales están asociados a la presentación clínica de la LMC y la LLA. Este diagnóstico de mayor precisión, determina la estructura y composición de las proteínas por fusión de genes producidos por los distintos rearrreglos genómicos, y por tanto, el fenotipo de la leucemia. (Saglio *et al.* 1990, Chissoe *et al.* 1995). Los puntos de rupturas más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones 1(e1), 12(b2), 13(b3) y 19(e19) y el punto de ruptura en el gen *ABL* habitualmente se produce en el exon 2(a2). Cuando se da la unión de los exones b3a2 y/o b2a2 se codifica para una proteína de 210kD (p210^{BCR-ABL}); si los exones e1 y e2 son removidos por el corte y empalme (*splicing*) la unión de e1a2 se transcribe en una proteína

de 190kD (p190^{BCR-ABL}). Estos transcritos se asocian a la LLA y a la LMC respectivamente (Deininger *et al.* 2000, Pane *et al.* 1996, Melo 1996).

Actualmente, en Costa Rica se dispone de técnicas cada vez más precisas y exactas para el correcto diagnóstico de la enfermedad leucémica en el niño, como son la citomorfología, la citogenética y el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo, que se pueden ver complementadas con la utilización de la tecnología de la RT-PCR.

Debido a la ausencia de información existente en nuestro medio sobre el diagnóstico molecular en leucemias, en el presente trabajo nos propusimos detectar transcritos de fusión del gen *BCR-ABL*, con el objetivo de implementar la determinación de dichos transcritos por RT-PCR y por genotipo. Este es el primer trabajo de este tipo que se realiza en Centro América aplicado a niños con leucemia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Del año 2002 al 2004 se recibieron en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA); previo a obtener el respectivo Consentimiento Informado, aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica, 55 muestras de médula ósea de pacientes menores de 13 años de edad con diagnóstico de leucemia, tratados en el Servicio de Hematología del Hospital Nacional de Niños. A las muestras se les realizó la extracción del ARN_T usando un juego comercial de reactivos de la casa Promega® (Cat. N° Z3100). A los ARN_T se les hizo prueba de integridad y abundancia por electroforesis de agarosa. Los que resultaron óptimos se les hizo la retrotranscripción a ADNc utilizando un juego comercial de reactivos de la casa Fermentas® (Cat. K1632). Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del gen constitutivo *ABL* para probar que no hubiera inhibición de la PCR. A las muestras que dieron positivas se les hizo PCR y genotipo. Para la amplificación del transcrita *BCR-ABL* se usaron iniciadores fluoromarcados específicos para

la t(9;22). Para su detección se usó un secuenciador automático 310 de Applied Biosystems y el *software* GeneScan para la interpretación (Marín *et al.* 2001).

Para determinar cuál de los transcritos del gen *BCR-ABL* se estaba expresando, se hizo otra PCR de las muestras positivas a t(9;22)(q34;q11) obtenidas por genotipo, para lo cual se usaron iniciadores específicos para determinar exactamente los exones participantes en las traslocaciones y así la proteína que se estaría formando, p190^{BCR-ABL} o p210^{BCR-ABL} (van Dongen *et al.* 1999).

RESULTADOS

A las 55 muestras recibidas se les efectuó RT-PCR. Al analizarlas con el GeneScan se encontraron 6 (10.9%) positivas para t(9;22)(q34;q11). De ellas, 2 (3.63%) eran pacientes con LLA y 4 (7.27%) eran pacientes con LMC.

Como se aprecia en la Figura 1 y como se mencionó anteriormente, por presentarse diferentes sitios de ruptura y fusión entre los genes *BCR-ABL*, fue común obtener bandas de diferentes tamaños para una misma traslocación al usar la RT-PCR, por lo que al tener acceso a realizar el genotipaje de dichos rearrreglos usando la secuenciación automática, facilitó en gran medida la interpretación de los resultados.

Al hacer la detección del transcrito *BCR-ABL* de las 6 muestras positivas con t(9;22)(q34;q11), se encontró que 2 presentaban el rearrreglo de los exones b3a2 y/o b2a2, pudiendo clasificarse una como LLA t(9;22)(q34;q11) p210^{BCR-ABL} y otra como LMC t(9;22)(q34;q11) p210^{BCR-ABL}. En otro caso se encontró el e1a2 en un niño con LMC t(9;22) p190^{BCR-ABL}, y la presencia simultánea de p210 y p190 se observó en una LMC. En otros dos casos (uno con LLA y otro con LMC) por falta de ADNc no fue posible establecer el rearrreglo.

DISCUSIÓN

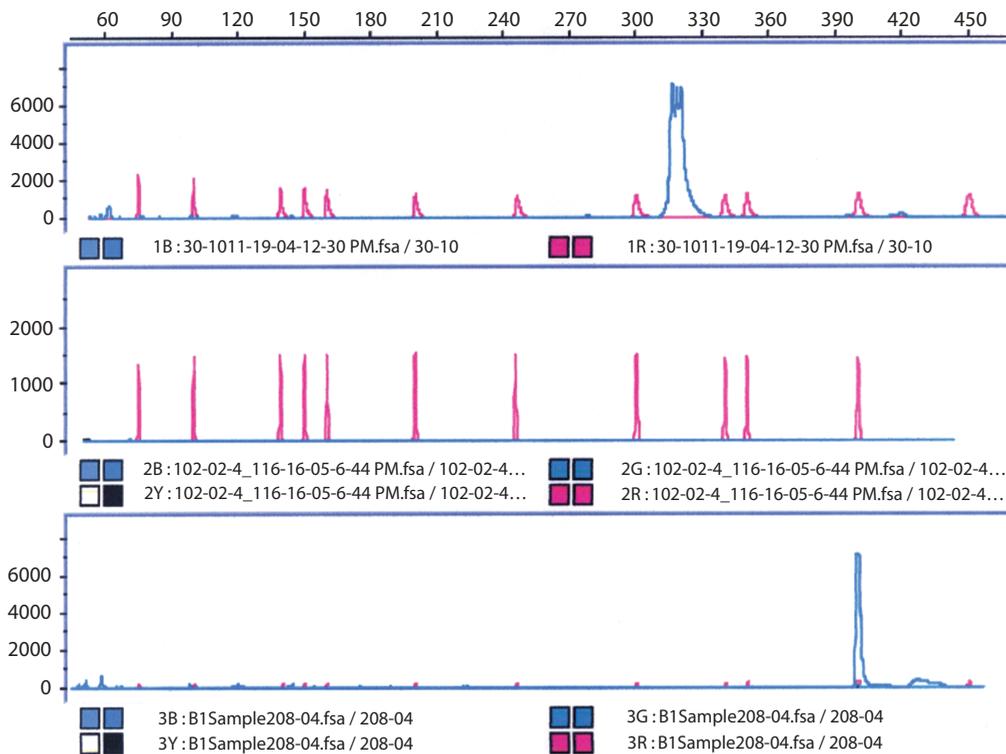
La posición de los puntos de ruptura en los genes *BCR* y *ABL* se asocian con características

clínicas-morfológicas de la LMC y LLA Ph+, determinadas por el efecto de la composición y estructura de las proteínas de fusión producidas por los diferentes rearrreglos genómicos, producto de la t(9;22)(q34;q11) (Pane *et al.* 1996).

El uso de la técnica molecular RT-PCR, nos ha permitido la determinación de la t(9;22)(q34;q11) en muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia, profundizando en el diagnóstico biológico de esta entidad hematológica, lo cual es una guía útil para el médico en lo que respecta a las posibilidades de tratamiento y el pronóstico, siendo además útil para el seguimiento de la enfermedad mínima residual, cuando por otros métodos diagnósticos no es posible realizarla.

Como se mencionó, la t(9;22)(q34;q11) es poco frecuente en leucemias pediátricas, por lo que el hecho de haber encontrado sólo seis muestras positivas está de acuerdo con la literatura (Westbrook *et al.* 1992, Melo 1996).

Se encontraron dos rearrreglos genómicos: uno en un caso de LLA y otro en una LMC, lográndose determinar en ambos casos la fusión del gen p210^{BCR-ABL}. Según menciona Pane *et al.* (1996), dicho rearrreglo se asocia a buen pronóstico, se presenta en una minoría de casos, y se asocia más con hiperleucocitosis y expansión neoplásica de las líneas granulocítica y megacariocítica; no así en los que presentan la p190^{BCR-ABL}, que se encontró en una paciente con LMC quien falleció por falla al tratamiento. Se ha reportado en niños, que la p190^{BCR-ABL} es muy común en la LLA Ph+ y cuando habita en la LMC Ph+, esta tiene un comportamiento biológico muy agresivo y es de mal pronóstico (Li *et al.* 1999, Cazzaniga *et al.* 2002). Se encontró un caso de LMC en donde se expresaban a la vez la p210 y la p190^{BCR-ABL}, que de acuerdo a la literatura es posible detectarlo en la mayoría de los pacientes con LMC y hasta en un 30% con LLA Ph+, situación que se presenta por el "splicing" alternativo del ARNm (van Rhee *et al.* 1996). Aunque no se pudo determinar el gen de fusión preciso que portaban dos de nuestros casos positivos (uno con LLA y otro con LMC) para la t(9;22)(q34;q11), por haberse acabado el ADNc, es



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
■ 1B, 4	19.69	316.28	7236	129949	5370
■ 1B, 5	19.75	318.36	7336	85827	5385
■ 1B, 6	19.80	320.30	7257	168492	5399
■ 3B, 63	22.35	400.00	7169	151781	6095

Fig. 1. Determinación de la t(9;22)(q34;q11) por genotipo usando el secuenciador automático ABI-Prism 310. A) Control positivo (pico en azul) correspondiente a la línea celular SD1. B) Control negativo donde se aprecian únicamente los picos (en rojo) del marcador interno de peso molecular TAMRA. C) Paciente 1 portador de la t(9;22)(q34;q11).

de presumir que portaban la p190^{BCR-ABL}, pues ambos niños fallecieron a los pocos días de iniciado el tratamiento, situación conocida que se asocia a la presencia de dicho rearrreglo (Cazzaniga *et al.* 2002).

Los resultados con pacientes adultos, en estudios similares en Chile y México, demuestran que la utilización de las diferentes técnicas diagnósticas disponibles para la leucemia (análisis morfológico, citoquímico e inmunofenotípico), unido al diagnóstico

molecular provee una herramienta sensible, específica y rápida para el correcto diagnóstico biológico de esta entidad hematológica. Con el uso rutinario de esta tecnología, se podrá hacer una mejor clasificación de las leucemias. Por lo tanto, la caracterización molecular de las formas p190^{BCR-ABL} y p210^{BCR-ABL} a partir de ADNc permitirá determinar el fenotipo de las leucemias, el pronóstico y ser una guía específica para su manejo y tratamiento (Artigas *et al.* 2003; Rosas-Cabral *et al.* 2003).

En conclusión, este trabajo pone a disposición en Costa Rica las técnicas RT-PCR y genotipo para consolidar el diagnóstico de las leucemias, lo que resultará en un beneficio directo al niño con leucemia, ya que siendo estas técnicas más sensibles y específicas brindan mayor información sobre la naturaleza y alcance del defecto molecular. Este procedimiento viene a complementar los protocolos de diagnóstico existentes, con lo que se puede mejorar el tratamiento y el pronóstico de los pacientes infantiles con leucemia.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (registrado bajo el N° 807-98-307) y por la Empresa Florida Ice and Farm, al otorgarle el premio Aportes a la Creatividad y la Excelencia del 2002.

RESUMEN

Muchas leucemias pueden presentar traslocaciones cromosómicas, las cuales, de acuerdo a los transcritos formados por los genes involucrados, originará un fenotipo leucémico variable. En este trabajo se muestran los primeros resultados de pacientes pediátricos con leucemia, a los cuales se les hizo el estudio molecular por RT-PCR y el genotipaje para el gen BCR-ABL producto de la t(9;22)(q34;q11). De las 55 muestras estudiadas, 6 (10.9%) fueron positivas para el transcrito mencionado. De las 6 positivas, 2(3.63%) de esos pacientes tenían LLA y 4 (7.27%) eran LMC. La introducción de esta metodología en el manejo rutinario de los niños con leucemia, servirá para establecer un diagnóstico más preciso, un pronóstico más certero y un seguimiento adecuado de la enfermedad mínima residual.

Palabras claves: BCR-ABL, RT-PCR, LLA, Leucemia, Genotipo.

REFERENCIAS

Artigas C.G., A. Melo, J.C. Roa, I. Roa, I. Quijada, C. Vittini, M.E. Cabrera & C. Risueño. 2003. Transcritos de fusión del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia mieloide crónica. *Int. J. Morphol.*, 21:205-209.

Campos M. 1996. Diagnóstico molecular del cromosoma Filadelfia en pacientes afectados por leucemia mieloide crónica. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Castro I, C. Montero & G. Jiménez. 1993. Características cromosómicas asociadas con leucemias y otras hematopatías en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 41: 385-392.

Cazzaniga G, M. Lanciotti, V. Rossi, D. Di Martino, M. Arico, M.G. Valsecchi, G. Basso, G. Masera, C. Micalizzi & A. Biondi. 2002. Prospective molecular monitoring of BCR-ABL transcript in children with Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *British J. Haemat.* 119:445-453.

Chisoe, S.L., A. Bodenteich, Y.F. Wang, Y.P. Wang, D. Burian, S.W. Clifton, J. Crabtree, A. Freeman & K. Iyer. 1995. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27: 67.

Deininger, M., J. Goldman & J. Melo. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343-56.

Li, S., J.R. Ilaria, R.P. Million, G.Q. Daley & R.A. van Etten. 1999. The P190, P210, and P230 forms of the BCR-ABL oncogene induce a simple chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J. Experimental Medicine.* 189:1399-1412.

Look, A.T. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059-1064.

Marín, C., B. Martínez-Delgado, B. Meléndez, M.J. Larrayoz, A. Martínez-Ramírez, M. Robledo, J.C. Cigudosa, M.J. Calasanz & J. Benítez. 2001. Multiplex-polymerase chain reaction assay for the detection of prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 86:1254-1260.

Melo, J.V. 1996. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 88:2375-2384.

Nowell, P.C. & Hungerford D.A. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497.

Pane, F., F. Frigeri, M. Sindona, L. Luciano, F. Ferrara, R. Cimino, G. Meloni, G. Saglio, F. Salvatore & B. Rotol. 1996. Neutrophilic-chronic myelogenous

- leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with c3a2 junction). *Blood* 88: 2410.
- Rabbitts, T.H. 1994. Chromosomal translocation in human cancer. *Nature* 372:143-149.
- Rosas-Cabral, A., M. Martínez-Mancilla, M. Ayala-Sánchez, J. Vela-Ojeda, *et al.* Análisis del tipo de transcrito *ber- abl* y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gac Méd Méx.* 139:553-559.
- Saglio, G., A. Guerrasio, C. Rosso, A. Zacarria, A. Tassinari, A. Serra, G. Cambrin, U. Mazza & F. Gavosto. 1990. New type of BCR-ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 76: 1819.
- Solis, M., M. Alvarado, E. Ruiz, J. Carrillo, M. Navarrete, G. Sánchez & E. Jiménez. 2000. Citogenética e histoquímica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales. *Rev. Biol. Trop.* 48: 707-718.
- van Dongen, J.J., E.A. Macintyre & J.A. Gabert. 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion genes 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*. 13:1901-1928.
- van Rhee, F., A. Hochhaus, F. Lin, J.V. Melo, J.M. Goldman & N.C. Cross. 1996. p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 87:5213–5217.
- Venegas, P. & J. Rivera. 2004. Estudios citogenéticos en niños con Leucemia Linfocítica Aguda-B en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52: 551-558
- Westbrook, C.A., A.L. Hooberman, C. Spino, R.K. Dodge & R.A. Larson. 1992. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 80: 2983.
- Wu, S.Q., K.I. Weinberg, W.J. Joo, J.J. Quinn, J. Franklin, S.E. Siegel & P.S. Gaynon. 2003. Preponderant mitotic activity of nonleukemic cells plays an important role in failures to detect abnormal clone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25: 520-525.